

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

MESTRADO

**CULTIVO IN VITRO E CRIOPRESERVAÇÃO DE
SEMENTES DE GERGELIM (*Sesamum indicum* L.)**

DISSERTAÇÃO

ROGACIANO CIRILO BATISTA

Campina Grande – Paraíba
AGOSTO- 2000





**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA – CCT
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA – DEAg
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA AGRÍCOLA**

**CULTIVO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE
GERGELIM (*Sesamum indicum* L.)**

Rogaciano Cirilo Batista

Campina Grande - PB

Agosto - 2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

CULTIVO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE GERGELIM
(*Sesamum indicum* L.)

ROGACIANO CIRILO BATISTA

Campina Grande - PB

Agosto - 2000

CULTIVO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE GERGELIM
(*Sesamum indicum* L.)

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO CURSO DE MESTRADO EM
ENGENHARIA AGRÍCOLA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA, EM
CUMPRIMENTO AS EXIGÊNCIAS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ARMAZENAMENTO E PROCESSAMENTO DE
PRODUTOS AGRÍCOLAS

ORIENTADOR: Dr. MÁRIO EDUARDO R. MOREIRA CAVALCANTI MATA

CO-ORIENTADORES: Dra. JULITA MARIA FROTA CHAGAS CARVALHO

Dr. FRANCISCO DE ASSIS CARDOSO ALMEIDA

CAMPINA GRANDE - PB

Agosto - 2000



B333c Batista, Rogaciano Cirilo
Cultivo in vitro e criopreservação de sementes de
gergelim (*Sesamum indicum* L.) / Rogaciano Cirilo Batista. -
Campina Grande, 2000.
132 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) -
Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências e
Tecnologia.

1. Biotecnologia 2. Criopreservação 3. Dissertação I.
Mata, Mario Eduardo R. Moreira Cavalcanti, Dr. II.
Carvalho, Julita Maria Frota Chagas, Dra. III. Almeida,
Francisco de Assis Cardoso, Dr. IV. Universidade Federal da
Paraíba - Campina Grande (PB) V. Título

CDU 574.6:633.85(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

COPEAG - PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DO MESTRANDO

ROGACIANO CIRILO BATISTA

Título: "Cultivo In Vitro e Criopreservação de Sementes de Gergelim (*Sesamum Indicum L.*)"

BANCA EXAMINADORA

PARECER

Mário Eduardo R.M.C. Mata

Dr. Mário Eduardo R.M.C. Mata-Orientador

APROVADA

Francisco de Assis C. Almeida

Dr. Francisco de Assis C. Almeida-Co-Orientador

APROVADA

Maria Elita Duarte Braga

Dra. Maria Elita Duarte Braga-Examinadora Interna

APROVADA

Humberto Silva

Dr. Humberto Silva-Examinador Externo

APROVADA

AGOSTO - 2000

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

A DEUS

AOS MEUS PAIS

Cristiano Batista dos Santos e Joana Cirilo de Santana

AOS MEUS IRMÃOS

Genice, Geralcino, Givaldo, Gilberto, Jucélia, Sandra e Geilza Cirilo Batista.

E EM ESPECIAL AO AMIGO

Edmilson Guimarães da Silva

Nenhuma explicação é suficiente

Karl Popper, filósofo austríaco

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal da Paraíba, por minha formação profissional, bem como a PRPG (Pró-Reitoria de Pós-Graduação) pela bolsa de estudo.

De modo muito especial aos meus orientadores: Dr. Mário Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti Mata, Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida e Dra. Julita Maria Frota Chagas Carvalho na orientação deste trabalho.

As professoras: Dra. Maria Elita Duarte Braga, Dra. Rossana Maria Feitosa de Figueiredo e Dra. Josivanda Palmeira Gomes de Gouveia, pelas preciosas contribuições.

Ao Prof. Dr Jürgen W. Precker do Departamento de Física pela colaboração e realização da análise termométrica.

Ao Prof. Egberto Araújo do Departamento de Fitotecnia – UFPB (Campus III – Areia) pela contribuição e realização da análise fitopatológica realizada.

A secretária do DEAg-UFPB, na pessoa de Rivanilda Diniz Sobreiro de Almeida, pelos constantes incentivos e colaborações.

Aos amigos de turma aqui encontrados como: Adjailza, Alana, Ailton, Alessandra, Antonio, Avanir, Bené, Elaine, Elessandra, Fábila, Flávio, Josalice, José Carlos, Márcia, Maristela, Mércia, Michel, Patrícia, Rodrigo, Robson-B, Robson-W, Rildo, Sevé, Waldemir, entre outros.

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 Federal da Paraíba.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa-Algodão) pela realização do trabalho no Laboratório de Biotecnologia.

A auxiliar de laboratório na pessoa de Dione Mércia de Souza pela colaboração durante todo o período de realização do trabalho de pesquisa.

As secretárias da biblioteca: Irismar, Elisabete, Maria das Graças e Cleide; pela simpatia e colaboração.

Ao fotógrafo Sérgio Cobel pelo excelente trabalho.

À todos, meu muito obrigado.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE GRÁFICOS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	x
SUMMARY	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I - CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE GERGELIM	
I. 1 INTRODUÇÃO	4
I. 2 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 Sementes de gergelim (Histórico)	7
2.2 Cultivo <i>in vitro</i>	10
I. 3 MATERIAL e MÉTODOS	17
3.1 Material vegetal	17
3.2 Assepsia de instrumentos	17
3.3 Meios de cultivo	17
3.4 Assepsia das sementes	21
3.5 Identificação dos patógenos	22
3.6 Indução a organogênese	23
3.7 Indução a calogênese	23
I. 4 RESULTADOS e DISCUSSÃO	26
4.1 Assepsia das sementes	26
4.2 Indução a organogênese	39
4.2.1 Ensaio “sem” o pré-tratamento das sementes	40
4.2.2 Ensaio “com” o pré-tratamento das sementes	45
4.3 Indução a calogênese	52
4.3.1 Efeito da calogênese	52
I. 5 CONCLUSÕES	57

CAPÍTULO II – CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE GERGELIM

II . 1 INTRODUÇÃO	59
II . 2 REVISÃO DE LITERATURA	62
2.1 Germinação	62
2.2 Vigor	63
2.3 Criopreservação	64
II . 3 MATERIAL e MÉTODOS	70
3.1 Determinação do Teor de Umidade Limite para Criopreservação - (TULC)	71
3.1.1 Secagem das sementes	72
3.1.2 Umedecimento das sementes	73
3.2 Criopreservação das sementes	76
3.2.1 Análise Termométrica	76
3.2.2 Crioprotetores	77
3.2.3 Processo de descongelamento das sementes	80
3.3 Análise da qualidade fisiológica	80
3.3.1 Teste de germinação (TG)	80
3.3.2 Teste de vigor (TV)	81
3.4 Análise estatística	81
II . 4 RESULTADOS e DISCUSSÃO	82
4.1 Determinação do Teor de Umidade Limite para Criopreservação - (TULC)	83
4.2. Criopreservação das sementes imersas em nitrogênio líquido	85
4.2.1 Crioprotetores	85
4.2.2 Criopreservação utilizando crioprotetores	86
II . 5 CONCLUSÕES	101
CONCLUSÃO GERAL	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
Apêndices	114
Apêndice I – A	114
Apêndice II - B	119

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		Página
1	Meio de cultivo MS utilizado nos ensaios de indução a organogênese	18
2	Fungos identificados no meio de cultivo MS.	37
3	Super brotamento de gergelim, variedades: Seridó-1 (A e B), CNPA-G2 (C) e CNPA-G3; após indução a organogênese “sem” o pré-tratamento das sementes, (MS-líquido).	44
4	Super brotamento do gergelim, variedades: Seridó-1 (A), CNPA G2 (B e C) e CNPA-G3, após indução a organogênese “com” o pré-tratamento das sementes, (MS-líquido).	50
5	Desenvolvimento precoce do gergelim, variedades: Seridó-1 (AeB), CNPA-G2 (C) e CNPA-G3 (D) após indução a organogênese “com” o pré-tratamento das sementes,(MS-líquido).	51
6	Desenvolvimento de calos embrionários das variedades de gergelim Seridó-1 (AeB), CNPA-G2 (C) e CNPA-G3 (D), em meio básico MS.	56
7	Variedades de sementes de gergelim.	70
8	Dessecador utilizado na secagem das sementes de gergelim.	72
9	Recipiente hermético contendo sementes de gergelim.	73
10	Canister de aço inox – padrão.	74
11	Botijão criobiológico, utilizado em processo criogênico.	75
12	Crioprotetor 1 - tubo polietileno.	78
13	Crioprotetor 2 - envelope de alumínio.	79
14	Germinação das sementes de gergelim em placas de Petri.	81

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICOS		Página
1	Curvas da variação dos percentuais de germinação das sementes de gergelim, variedade CNPA-G2, quando submetidas nas concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia e colocadas para germinar nos meios de germinação MS e PG.	31
2	Curvas da variação dos percentuais de vigor das sementes de gergelim, variedade CNPA-G2, quando submetidas nas concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia e colocadas nos meios de germinação MS e PG.	32
3	Curvas da variação dos percentuais de germinação das sementes de gergelim, variedade CNPA-G3, quando submetidas às concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia e colocadas para germinar nos meios de germinação MS e PG.	33
4	Curvas da variação dos percentuais de vigor das sementes de gergelim, variedade CNPA-G3, quando submetidas às concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia e colocadas nos meios de germinação MS e PG.	34
5	Curvas da variação dos percentuais de germinação das sementes de gergelim, variedade Seridó-1, quando submetidas às concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia e colocadas para germinar nos meios de germinação MS e PG.	34
6	Curvas da variação dos percentuais de vigor das sementes de gergelim, variedade Seridó-1, quando submetidas às concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia e colocadas nos meios de germinação MS e PG.	35
7	Efeito da adição de reguladores de crescimento BAP (1 e 2 mg.L ⁻¹) e NAA (0,05 mg.L ⁻¹) ao meio básico MS sobre o incremento de peso do hipocótilo de três variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3), após oito semanas de cultivo.	54
8	Efeito da adição de reguladores de crescimento 2,4D (2,5 e 3,0 mg.L ⁻¹) e Água de côco (15%) no meio básico MS sobre o incremento de peso do hipocótilo de três variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) após oito semanas de cultivo.	55
9	Crioprotetor-3.1 (amido de milho) imerso em nitrogênio líquido.	125
10	Crioprotetor-3.2 (amido de milho) imerso em nitrogênio líquido.	125
11	Crioprotetor-3.3 (amido de milho) imerso em nitrogênio líquido.	126
12	Crioprotetor-1.1 tubo polietileno imerso em nitrogênio líquido.	126
13	Crioprotetor-1.2 tubo polietileno imerso em nitrogênio líquido.	127
14	Crioprotetor-2.1 envelope de alumínio imerso em nitrogênio líquido.	127
15	Crioprotetor-2.2 envelope de alumínio imerso em nitrogênio líquido.	128
16	Crioprotetor-2.3 envelope de alumínio imerso em nitrogênio líquido.	128

LISTA DE TABELAS

TABELAS		Página
1	Composição de sais minerais, componentes orgânicos e vitaminas do meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962).	20
2	Composição das soluções concentradas utilizadas para a preparação do meio de cultivo MS.	20
3	Vitaminas e outros suplementos orgânicos do meio B5 (Gamborg et al. 1968) e da solução concentrada utilizada.	21
4	Análise de variância simplificada da germinação e vigor de 3 variedades de sementes de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3, quando submetidas a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0, 10, 20 30 e 40%) em dois meios de germinação PG e <i>in vitro</i> , utilizando-se o meio básico MS.	27
5	Valores médios da germinação e vigor das sementes de gergelim para os fatores variedades, concentrações de hipoclorito de sódio e meios de germinação.	28
6	Valores médios da germinação e do vigor das sementes de gergelim, para a interação entre os fatores meios de germinação e variedades, após assepsia das sementes nas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.	29
7	Valores médios da germinação de gergelim, variedades CNPA-G2, CNPA-G3 e Seridó-1, para a interação entre os fatores concentração e variedades, após assepsia das sementes, quando submetidas a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0, 10 20, 30 e 40%) em dois meios de germinação PG e <i>in vitro</i> , utilizando o meio básico MS.	30
8	Valores médios da germinação de gergelim, variedades Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3, para a interação entre os fatores meios de germinação e assepsia das sementes de gergelim nas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.	30
9	Patógenos (fungos), presentes em 3 variedades de gergelim, após teste fitopatológico, encontrados em meio de cultivo MS.	38
10	Análise de variância das variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 utilizando o meio de cultivo, MS na indução a organogênese "sem" o pré-tratamento das sementes (MS-líquido), tendo como parâmetro de avaliação o número de explantes vivos (E.V).	39
11	Análise e variância das variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 e o meio de cultivo, MS na indução a organogênese "sem" o pré-tratamento das sementes (MS-líquido), utilizando a variável número de brotos por explantes (B/E).	40
12	Resultados de sobrevivência e número de brotos por explante de três variedades de gergelim segundo a concentração de reguladores de crescimento adicionados ao meio MS, na indução a organogênese "sem" o pré-tratamento das sementes (MS-líquido).	41
13	Análise comparativa entre as variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 e o meio de cultivo, MS, na indução a organogênese com avaliação de gemas axilares dormentes; sendo a variável explantes vivos (E.V).	42

Continuação...

LISTA DE TABELAS

TABELAS		Página
14	Análise comparativa entre as variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 e o meio de cultivo, MS, na indução a organogênese com avaliação de gemas axilares dormentes; sendo a variável nº de brotos por explante (B/E).	42
15	Análise e variância das variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 e o meio de cultivo, MS na indução a organogênese "com" o pré-tratamento das sementes (MS-líquido), utilizando a variável explantes vivos (E.V).	45
16	Análise da variância das variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 e o meio de cultivo, MS na indução a organogênese "com" o pré-tratamento das sementes (MS-líquido), utilizando a variável número de brotos por explantes (B/E).	46
17	Resultados de sobrevivência e número de brotos por explante de três variedades de gergelim segundo a concentração de reguladores de crescimento adicionados ao meio MS, na indução a organogênese "com" o pré-tratamento das sementes (MS-líquido).	47
18	Análise comparativa entre as variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 e o meio de cultivo, MS, na indução a organogênese "com" o pré-tratamento das sementes (MS-líquido), na avaliação de gemas axilares dormentes; sendo a variável explantes vivos (E.V).	48
19	Análise comparativa entre as variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 e o meio de cultivo, MS, na indução a organogênese "com" o pré-tratamento das sementes (MS-líquido), na avaliação de gemas axilares dormentes; sendo a variável: nº de brotos por explantes (E.V).	49
20	Análise de variância da germinação e vigor das sementes de gergelim variedades: Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 com teores de umidade entre 2 e 12% (b.u.), após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido a -196°C por 5 dias de armazenamento.	83
21	Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim depois de submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido a -196°C , por período de 5 dias, para os fatores variedade e teor de umidade.	84
22	Valores médios de germinação das sementes de gergelim para a interação entre os fatores teor de umidade e variedades, depois de submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido a -196°C , por período de 5 dias.	85
23	Valores médios de vigor das sementes de gergelim para a interação entre os fatores teor de umidade e variedades, depois de submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido a -196°C , por um período de 5 dias.	86

Continuação...

LISTA DE TABELAS

TABELAS		Página
24	Valores médios representativos da germinação e vigor das sementes de gergelim, para utilização em técnicas de criopreservação com imersão em nitrogênio líquido à - 196°C, utilizando diversos crioprotetores.	88
25	Análise de variância da germinação e vigor das sementes de gergelim variedades Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 com teor de umidade de 6% (b.u) após criopreservação em nitrogênio líquido entre os fatores descongelamento, crioprotetores, período de armazenagem e suas interações.	89
26	Valores médios da germinação e do vigor das sementes de gergelim variedade Seridó-1, submetida a criopreservação em nitrogênio líquido, com 6% b.u., para os fatores descongelamento, crioprotetores e período de armazenagem.	90
27	Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade Seridó-1 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores crioprotetores e descongelamento.	91
28	Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade Seridó-1 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores período de armazenagem e descongelamento.	92
29	Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade Seridó-1 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores período de armazenagem e crioprotetores.	93
30	Valores médios da germinação e do vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G2, submetida a criopreservação em nitrogênio líquido, com 6% b.u., para os fatores descongelamento, crioprotetores e período de armazenagem.	93
31	Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G2 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores crioprotetores e descongelamento.	95
32	Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G2 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores período de armazenagem e descongelamento.	95
33	Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G2 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores período de armazenagem e crioprotetores.	96
34	Valores médios da germinação e do vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G3, submetida a criopreservação em nitrogênio líquido, com 6% b.u., para os fatores descongelamento, crioprotetores e período de armazenagem.	97

Continuação

LISTA DE TABELAS

TABELAS		Página
35	Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G3 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores crioprotetores e descongelamento.	98
36	Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G3 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores período de armazenagem e descongelamento.	99
37	Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G3 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores período de armazenagem e crioprotetores.	100

RESUMO

O gergelim (*Sesamum indicum* L.) originário da Ásia, passou a ser cultivado no nordeste do Brasil a partir de 1986, entrando pelos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba. Considerando a importância econômica que a espécie representa para a região semi-árida do nordeste brasileiro, o objetivo principal do primeiro capítulo deste trabalho foi o de estudar métodos capazes de viabilizar a sua multiplicação em grande escala mediante cultivo "in vitro". Partiu-se de material procedente de sementes inoculadas em meio básico MS, após realização do tratamento asséptico das mesmas. Foi realizado também um pré-tratamento das sementes que consistiu na utilização do meio MS + BAP (8mg.L^{-1}) por 72 horas para a sua utilização nos ensaios de indução à organogênese, os quais foram avaliados por meio do delineamento inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de $3 \times 2 \times 4$ (3 variedades \times 2 pré-tratamentos e 4 reguladores de crescimento). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional Assisstat. Ainda na utilização dos ensaios de indução à organogênese, agora para a obtenção de calogênese, no intuito de avaliar os reguladores de crescimento no desenvolvimento de calos embrionários foi utilizado o programa computacional Origin 5.0 para análise estatística dos dados. De acordo com os resultados obtidos concluiu-se que: Com relação a assepsia das sementes: a) A variedade CNPA-G2 mostrou-se superior as demais variedades, apresentando os maiores índices de germinação e vigor não diferindo da testemunha; b) A assepsia das sementes de gergelim, variedade CNPA-G2 pode ser feita com a concentração de hipoclorito de sódio variando entre 10 e 40%, indicando-se 10% por ser o valor mais econômico, sendo que o meio recomendado para germinação é o papel germitest, (PG); c) A concentração de hipoclorito que deve ser recomendado para fazer a assepsia da semente de gergelim, variedade CNPA-G3, é de 20%, e o melhor meio para induzir a germinação das sementes é o papel germitest; d) Quanto a assepsia da semente de gergelim variedade Seridó-1, a concentração de hipoclorito de sódio que causa menores danos às sementes está na ordem de 20% e o meio de cultivo recomendado é o meio MS e) Em relação à análise fitopatológica concluiu-se que os fungos encontrados foram *Aspergillus sp*, *Penicillium spp*, *Rhizoctonia* e o *Rhizopus sp* sendo que a variedade Seridó-1 apresentou maior incidência de contaminação de todos esses fungos, evidenciando a maior presença do *Aspergillus sp* em todas as variedades, entretanto a variedade CNPA-G3 foi a que apresentou menor incidência de fungos: Em relação aos processos realizados "sem" e "com" pré-tratamento das sementes na indução à organogênese concluiu-se que: a) Quando realizou-se o pré-tratamento das sementes houve maior incidência de brotos por explantes vivos; b) Na indução à calogênese ocorreu maior formação de calos no meio MS, quando suplementado com os reguladores de crescimento BAP e NAA em todas as variedades de gergelim. No Capítulo II deste trabalho, propôs-se inicialmente a determinação do Teor de Umidade Limite para Criopreservação (TULC) e em seguida foi realizada a avaliação das variedades de gergelim, mediante a germinação e o vigor, submetidas à temperatura de criopreservação de -196°C , utilizando-se 3 crioprotetores (Crioprotetor 1 – Tubo polietileno, Crioprotetor 2 – Envelope de alumínio e Crioprotetor 3 – Amido de milho), duas técnicas de descongelamento (temperatura ambiente e banho termostatizado a 40°C), e 3 períodos de armazenamento (5, 30 e 60 dias). O delineamento experimental utilizado nesta etapa foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial de $3 \times 2 \times 3$ (3 variedades \times 2 métodos de descongelamento \times 4 períodos de armazenagem). De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir, ao se estudar a determinação do teor de umidade limite para criopreservação – TULC, durante 5 dias, afirmamos que: a) o teor de umidade limite para criopreservação das variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 está em torno de 6% (b.u.), apresentando um percentual de germinação de 90% e vigor variando entre 17 e 24%; b) A semente de gergelim variedade CNPA-G3 é que melhor se adapta a criopreservação imersa ao nitrogênio líquido a (-196°C); c) Para a criopreservação da variedade CNPA – G3, pode-se utilizar teores de umidade entre 6 e 8% (b.u.), que a germinação e o vigor das sementes não são afetados. Com relação a criopreservação das sementes pode-se afirmar que: a) Os melhores índices de germinação e vigor para as variedades de gergelim Seridó-1 e CNPA-G2, foram obtidos quando as sementes foram descongeladas a temperatura ambiente entretanto para a variedade CNPA-G3 o melhor índice de vigor foi obtido quando as sementes foram descongeladas a temperatura de 40°C em banho termostatizado; b) Foram obtidos os maiores índices de germinação e vigor, quando as variedades foram criopreservadas utilizando-se como crioprotetor, o envelope de alumínio; c) Os maiores índices de germinação e vigor foram obtidos quando as sementes de gergelim foram criopreservadas pelo período de armazenagem de 60 dias em comparação aos períodos de 5 e 30 dias.

SUMMARY

The sesame (*Sesamum indicum* L.) originating from Asia, it has been cultivated in the northeast of Brasil since 1986, being found in the states of Ceará, Rio Grande do Norte and Paraíba. Considering the economic importance that the species represents for the Brazilian northeastern semi-arid region, the main objective of the first chapter of this study was based upon studying methods to make possible its multiplication in large scale through the "in vitro" cultivation: the study began with material derived from inoculated seeds in a MS basic environment, after its aseptic treatment. It was also carried out a seed pre-treatment that consisted on the use of the a MS+BAP (8mg.L⁻¹) environment for 72 hours so that it could be used on the induction attempts to organogenesis, that were evaluated through the entirely casualized outling, with a factorial arrangement of 3x2x4 (3 varieties x 2 pre-treatment and 4 growing regulators). The statistical analyses were carried out using the Assistat computacional program. Still in the usage of induction attempts to organogenesis, now to obtain calogenesis, on the purpose of evaluate the growing regulators in the development of embryonic callus, the computational program Origin 5.0 was used for the data statistical analysis. According to the results obtained we concluded that: regarding to the seeds assepsy: a) the CNPA-G2 variety was superior to all of them, presenting the largest germination rates and energy not being different from witness; b) the sesame seeds assepsy, CNPA-G2 variety can be done unith the sodium hipoclorite concentration varying from 10 to 40%, through 10% is the most economic one. The germitest paper (GP) is recommended for the germination; c) the hipoclorite concentration to be recommended to do the sesame seeds CNPA-G3 variety is 20% and the best environment to induce the seed germination is the germitest paper (GP); d) regarding to the sesame seeds assepsy, Seridó-1 variety, the sodium hipoclorite concentration that causes less damages to the seeds is in the rate of 20% and the cultivation environment recommended is the MS one; e) regarding to tel fitopatological analysis, we conclude that the fungi found were *Aspergillus sp.*, *Penicillium spp.*, *Rhizoctonia* and *Rhizopus sp.* with Seridó-1 variety presenting biggest incidence of contamination among them, high lighting the biggest presence of *Aspergillus sp.* in all varieties. The CNPA-G3 variety, however, was the one that presented the smallest incidence of fungi. Regarding to the process carried out "with" and "without" seeds pre-treatment induction to organogenesis we concluded that: a) when the seed pre-treatment was carried out, there was a biggest incidence of buds /living explants; b) on the calogenesis induction occurred bigger formation of callus in the MS environment, when it was supplemented the growing regulators BAP and NAA to all sesame varieties. On chapter II of this work, it was suggested the initial determination of humidity limit to cryopreservation (HTLC) and after it was carried out the evaluation of sesame varieties, based on the germination and energy, subjected to the -196°C cryopreservation temperature, using 3 cryoprotectos (Crioprotector 1- polyethilene tube; Crioprotector 2- aluminium envelope and Cryiprotector 3 Corn starch), two techniques at defrosting (environmental temperature and thermostatic bathe (40°C)) and 3 storage periods (5, 30 and 60 days). The experimental underlining used in this step was intirely casual with factorial arrangement of 3x2x3 (3 varieties x 2 methods of defrosting x 4 storage periods). According to the results obtained we can concluded that when you study the determination of the humidity limit tenor to cryopreservation - HLTC, during 5 days it is stated that: a) the humidity tenor to cryopreservation of Seridó-1 sesame, CNPA-G2 and CNPA-G3 is about 6% (b.u), presenting a germination rate of 90% and energy between 17 and 24%; b) the sesame seed variety CNPA-G3 shows a better adaptation to cryopreservation immerse in liquid nitrogen (-196°C); c) for the cryopreservation of variety CNPA-G3 we can use humidity tenor between 6 and 8% (b.u). Both the germination and energy of the seeds won't be affected. Regarding to the seeds cryopreservation of we can state that: a) the best rates of germination and energy for Seridó-1 and CNPA-G2 were obtained when the seeds were defrosted at environmental temperature. The variety CNPA-G3, however, presented a better rate of energy when the seeds were defrosted at 40°C in a thermostatic bathe; b) it was obtained better rates of germanation and energy when he varieties were cryopreserved using as cryoprotector the aluminium envelope, c) the increasing of germination and energy rates were obtained when the sesame seeds were cryopreserved on a 60 day storage period in comparison with period on a 5 and 30 days.

CAPÍTULO I

CULTIVO *IN VITRO* DE GERGELIM



INTRODUÇÃO GERAL

Nosso planeta possui um mundo vegetal rico e diverso, que consiste em um quarto de milhão de espécies, resultado de milhões de anos de evolução.

Devido ao aumento do índice populacional e das necessidades crescentes da oferta e da produção de alimentos, muitos agricultores tem substituído as variedades tradicionais por espécies mais produtivas, que tenham maior adaptabilidade e maior valor de mercado. Como resultado desse procedimento, muitas variedades tradicionais foram abandonadas contribuindo significativamente para a diminuição dos recursos fitogenéticos.

Atualmente a conscientização ambientalista da humanidade e dos pesquisadores, alerta para a necessidade de conservar os recursos fitogenéticos por várias razões, entre elas pode-se citar: a) a necessidade do desenvolvimento de novas culturas, onde as espécies selvagens podem ser de grande importância; b) novas técnicas de manipulação genética e c) a própria identificação da mutação genética ocorrida ao longo do tempo.

De acordo com CHIN (1994) a biotecnologia é um forte mecanismo que a ciência tem para produzir sementes “milagrosas” com todas as características desejáveis para as necessidades do mundo contemporâneo, pois a biotecnologia é uma ferramenta eficiente para induzir mutações, obter híbridos somáticos, regenerar novos genótipos a partir de células transformadas, além do êxito existente na propagação de plântulas por cultura de tecidos.

O cultivo de tecido vegetal teve início nos anos 30, mas só teve um impulso maior nos anos 70, com o crescente interesse, tanto na aplicação a nível comercial (micropropagação) como auxiliar nos programas de melhoramento genético.

Por cultivo *in vitro* ou micropropagação entende-se o conjunto de técnicas e de metodologias que permitem o crescimento e a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de uma planta (explante) sobre um meio nutritivo e em condições assépticas. Utilizam-se recipientes fechados (não herméticos) e o cultivo se realiza sob condições ambientais de iluminação e temperatura controladas. Esta técnica se baseia principalmente no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, 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.

Os cultivos de tecidos vegetais podem ser iniciados com qualquer parte da planta: gemas, raízes, folhas, células isoladas, protoplastos (célula sem parede celular) semente, embriões zigóticos, antera etc. A escolha de um ou de outro explante dependerá dos objetivos desejados e da disponibilidade e capacidade de resposta do material vegetal.

A micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* é utilizada principalmente na limpeza clonal e naquelas plantas de difícil propagação pelos métodos convencionais, como é o caso de algumas mudas de espécies ornamentais, herbáceas e arbustivas. A micropropagação também permite a obtenção de grande número de plantas sadias e geneticamente uniformes, em curto período de tempo.

Uma vez obtidas as novas sementes quer seja utilizando técnicas de cultivo *in vitro* ou no sistema de produção tradicional, essas necessitam ser armazenadas em bancos de germoplasmas para manutenção de suas características fitogenéticas e posterior utilização nos processos produtivos.

A conservação de sementes em bancos de germoplasma tradicional, que consiste em armazenar as sementes em temperaturas em torno de 10°C e umidade relativa em torno de 40% vai sendo substituída gradativamente no mundo todo para Bancos aonde a conservação se dá a temperaturas criogênicas ou seja a temperaturas abaixo de -70°C.

A palavra criogenia deriva do grego “crios” que significa frio e “genia” que significa nascimento. Na prática, a criogenia de acordo com VICENTE (1994), define-se como a ciência dedicada à produção de baixas temperaturas, sendo que o adjetivo “criogênico” é utilizado para denominar gases como o nitrogênio onde, em estado líquido, a sua temperatura é muito baixa (-196°C).

Segundo CHIN (1994), as pesquisas em criogenia demonstram que centenas de espécies de plantas tem sido armazenadas com sucesso quando colocadas em nitrogênio líquido a -196°C para serem criopreservadas.

Desta forma, a criopreservação das sementes é uma técnica onde são utilizadas temperaturas muito baixas de modo a reduzir ou inibir completamente o metabolismo degenerativo em células de plantas e como resultado, as sementes armazenadas podem ser preservadas indefinidamente. Assim como consequência, o armazenamento

criogênico seria, em teoria, o procedimento ideal para a conservação do patrimônio fitogenético das espécies por longos períodos de tempo. Contudo, nem todas as espécies toleram temperaturas baixas na sua preservação, entretanto algumas pesquisas tem sido conduzidas no sentido de investigar alguns crioprotetores para que, praticamente, todo o recurso fitogenético possa ser criopreservado.

As técnicas de armazenamento criogênico oferece outras vantagens além da vida de armazenamento mais longa, entre elas pode-se citar: a) baixos custos, b) menor mão-de-obra, c) baixa manutenção e d) não dependência de eletricidade.

Devido a essas vantagens que a criopreservação oferece, o Laboratório Nacional de Armazenamento de Sementes de Fort Collins dos Estados Unidos, lançou um projeto piloto, para criopreservação de germoplasma de plantas, com o objetivo de dispor à comunidade em geral, de um sistema completo de Bancos de Sementes. Este exemplo está sendo seguido por laboratórios do mundo todo.

Assim, diante do exposto e da relevância dos dois temas, o presente trabalho teve como objetivo estudar no Capítulo I, a micropropagação ou cultivo *in vitro* de sementes de gergelim e no Capítulo II, estudar meios que possibilitem conservar as sementes de gergelim utilizando-se técnicas de criopreservação.

CAPÍTULO I – CULTIVO *IN VITRO* DE GERGELIM

I. 1 INTRODUÇÃO

No mundo, a semente de gergelim é plantada em 6 milhões de hectares, o que lhe confere a nona posição entre as oleaginosas mais cultivadas do planeta. (EMBRAPA, 1999). Apesar de sua importância a produtividade brasileira ainda é baixa, estando em torno de 650 kg.ha⁻¹.

A planta do gergelim (*Sesamum indicum* L.) passou a ser cultivada no nordeste do Brasil a partir de 1986, quando foram estruturados projetos de pesquisa nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba, (BELTRÃO, 1991).

O gergelim possui em média para cada 100g de sementes 593,6 calorias; 13,29% de glicídeos (açúcares); 20,6% de proteínas; 50,9% de lipídeos (óleo); 0,417% de cálcio e 0,560% de fósforo, sendo que o seu óleo é caracterizado por dois lignantes: *sesamim* e *sesamolin*, tendo uma coloração escura e apresentando forte e dominante odor de nozes.

As sementes de gergelim devido as suas características são usadas para fins alimentares e medicinais, sendo fonte de excelente óleo, farinha, farelo, tortas e produtos de confeitaria (GODOY et al., 1985 e SAVY FILHO et al., 1988).

Diante do potencial nutritivo oferecido por esta oleaginosa é necessário a preservação do seu patrimônio genético para que haja uma melhoria na sua produtividade, pois os recursos fitogenéticos proporcionam matéria prima para se obter melhores e novas variedades de plantas, mediante melhoramento vegetal ou através de engenharia genética.

O melhoramento vegetal proporciona a cultura desejada, uma isenção de patógenos que inibem a sua formação; facilita a uniformidade da cultura contribuindo para o desenvolvimento de novas pesquisas e finalmente oferece a obtenção de plantas capazes de receber genes de outras culturas na constituição de material vegetal cada vez mais resistente.

O processo de melhoramento vegetal ou cultura de tecido vegetal é uma técnica de surgimento recente, pois os primeiros passos foram dados já no início do século XX e os

maiores avanços foram notados a partir da segunda metade do século (PASQUAL et al., 1997).

A Cultura de tecidos vegetais compreende um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou um órgão) é isolado e cultivado sob condições de plena assepsia, em um meio nutritivo artificial. O princípio básico da cultura de tecidos é a denominada “totipotencialidade” das células – qualquer célula no organismo vegetal contém toda a informação genética necessária a regeneração de uma planta completa.

Mediante esta técnica é possível a manipulação de explantes em condições físicas, químicas e biológicas ótimas, onde antes do domínio desta técnica era impossível.

A tecnologia da cultura de células, protoplastos e tecidos é uma das áreas de maior sucesso, como parte do complexo da biotecnologia, e vem sendo ampliada dia a dia. A manipulação de células e componentes celulares, o manejo de tecidos, a produção de mudas em grande escala e com grande rapidez e a adoção de técnicas de melhoramento via cultura de tecidos são apenas algumas das áreas da cultura de tecidos que apresentam significativa importância.

A medida que avança o conhecimento sobre a fisiologia da cultura de tecidos vegetais e são aperfeiçoadas as técnicas a ela relacionadas, cresce a gama de aplicações.

No cultivo *in vitro* existem fatores que influenciam no método de obtenção, no procedimento e em seu êxito, como no material vegetal, o meio de cultivo e as condições de incubação, sendo exigido um meio apropriado e, se necessário a adição e utilização de reguladores de crescimento e outras substâncias que sejam benéficas para o desenvolvimento dos explantes.

Diante do conteúdo apresentado, este trabalho tem os seguintes objetivos:

- A) Determinar qual a concentração de hipoclorito de sódio (NaClO) para evitar os agentes contaminantes nas sementes de gergelim variedades (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3), em meios de germinação, PG (papel germitest) e MS (Murashige & Skoog, 1962.);
- B) Identificar os patógenos contaminantes nos meios de germinação das sementes PG (papel germitest) e MS (Murashige & Skoog, 1962).
- C) Desenvolver ensaios de indução a organogênese, “com” e “sem” o pré-tratamento das sementes, para a obtenção de super brotamento de plântulas;
- D) Desenvolver ensaios de indução a calogênese para a obtenção de procedimentos na formação de calos.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SEMENTES DE GERGELIM (Histórico)

De maneira geral, nas regiões do nordeste de maior risco de seca e período chuvoso curto, são recomendadas cultivares de ciclo precoce a médio, porque as cultivares tardias tem, nestas condições produtividade bastante reduzida.

As cultivares de gergelim podem ser diferenciadas por vários atributos, como altura, ciclo, coloração do caule e das sementes e tipo de ramificação. As cultivares que apresentam sementes de coloração branca e amarelo-claro são as de maior valor, pois as sementes escuras não tem valor industrial, mas somente caseiro e medicinal.

A seguir podemos observar um pequeno histórico das variedades de gergelim, utilizadas em nosso trabalho, decorrentes de melhoramento genético e tecnológico, realizado pela Embrapa Algodão (EMBRAPA, 1999).

Seridó -1

Foi obtida, através da seleção massal, a partir dos tipos locais cultivados em Jardim do Seridó-RN. O material foi submetido a três ciclos de seleção massal para produtividade e uniformidade. Como características principais, é adaptada as regiões fisiográficas do Sertão e Seridó do Nordeste. Sementes cinza claro, cultivar de porte alto (até 180 cm), ciclo tardio (130-140 dias) e processo de crescimento ramificado, apresenta fruto/axila com sementes de coloração creme e cinza e possui susceptibilidade às doenças *mancha angular* e *cercosporiose*.

CNPA - G2

Foi obtida através de seleção massal, porém a partir de uma população segregante oriunda do Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi-Árido - CPATSA, identificada como Venezuela 52. O material foi submetido a três ciclos de seleção massal para produtividade e uniformidade. Como características principais a produtividade 56% superior a da IAC-Ouro. Cultivar de porte mediano (até 160 cm), ciclo médio (100 dias) e hábito de crescimento ramificado; apresenta frutos/axila, com sementes de coloração creme, possui tolerância a *mancha angular* e susceptibilidade á *cercosporiose* e *murcha de macrophomina*.

CNPA – G3

Aplicado na cultivar Tegel, a linhagem CNPA 86-362, na qual se efetuou pressão de seleção para resistência a mancha angular, doença causada pelo fungo (*Cylindrosporium sesami Hansford*) e produtividade. Posteriormente, na fase cultivar sob a denominação de CNPA-G3, foi submetida a três ciclos de seleção massal. Cultivar de porte mediano (até 160 cm), ciclo médio (100 dias) e hábito de crescimento ramificado; apresenta fruto/axila, com sementes de coloração creme, possui resistência a mancha angular e susceptibilidade a *cercosporiose* e a mancha de *macrohomina* (EMBRAPA, 1999).

A seguir alguns fatos históricos que evidenciam a evolução da cultura de tecidos vegetais (TORRES et al. 1999).

Em 1838, Schleiden e Schwann levantaram a hipótese de que toda célula tinha a capacidade de gerar um indivíduo, fenômeno que mais tarde seria denominado de “totipotencialidade”.

Em 1892, Sachs definiu que as plantas sintetizavam substâncias capazes de formar órgãos e que apresentam distribuição de forma polar.

Em 1902, Haberlandt tentou demonstrar a totipotencialidade das células das plantas a partir de ensaios com material muito maduro e obteve pouca expansão, o desconhecimento dos reguladores de crescimento contribuiu para este insucesso.

Em 1934, White trabalhou com raízes de tomateiro e observou crescimento contínuo em meio com extrato de levedura e sacarose. Também em 1934, Kogh e colaboradores identificaram o primeiro fito-hormônio, a auxina (ácido indolacético), o que possibilitou o estabelecimento e a manutenção indefinida de cultura de calos). Ainda em 1934, Gautheret observou que raízes de *Salix* e *Populus* cresciam em meio de cultura.

No período de 1939 a 1950, Street identificou a auxina como fator importante na indução do sistema radicular e estabeleceu as primeiras relações copa/raiz.

Em 1941, Van Overbeck e colaboradores promoveram a diferenciação e o crescimento de calo a partir de embriões de *Datura stramonium* pela inclusão de leite de côco no meio de cultura.

Em 1952, Sussex e Steve trabalhando com primórdio foliar, observaram que este originava uma planta. Neste mesmo ano, Stewart e Caplin obtiveram formação de calo

em diversas espécies de plantas em meio de cultura com auxina e leite de côco. Ainda neste ano, Morel e Martin recuperaram plantas de *Dalia* livres do vírus de Mosaico pela cultura de ápices caulinares. Também em 1952, Morel e Martin fizeram a primeira microenxertia.

Em 1953, Tulecke obteve calo haplóide a partir do cultivo de pólen de *Ginkgo biloba*.

Em 1955, Miller descobriu a cinetina e observou que a mesma causava divisão celular maduras desta citocinina.

Em 1958, Wilckson e Thimann observaram que, quando se aplicava cinetina a uma gema terminal ou lateral dormente, esta saía da dormência. Também em 1958, Reinert e Stewart e colaboradores obtiveram formação de embriões somáticos a partir de calo de cenoura.

Em 1962, Murashige e Skoog elaboraram o meio de cultura mais universal, denominado MS.

Em 1984, Paszdawsky e colaboradores obtiveram a transformação de células vegetais com DNA plasmídico.

Em 1985, Horsch e colaboradores obtiveram a infecção e a transformação genética de discos foliares com *Agrobacterium*, bem com a regeneração das plantas transformadas.

No Brasil, os trabalhos pioneiros com cultura de tecidos vegetais foram desenvolvidos no Instituto Biológico em São Paulo -SP, na década de 1950. A primeira equipe de cultura de tecidos foi estabelecida em 1971, na ESALQ (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz), em Piracicaba, SP.

2.2 CULTIVO *IN VITRO*

Métodos de Assepsia

As sementes oriundas do campo utilizadas como material inicial em cultura de tecido, são portadoras de múltiplos microrganismos que podem interferir no desenvolvimento dos explantes, sendo necessário um tratamento de assepsia intenso para eliminá-los.

Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. Os mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio; algumas gotas de detergente são comumente adicionadas às soluções a base de cloro para melhorar o contato destas com os tecidos. O Tween 20 é o mais utilizado em concentrações de 0,01 a 0,05 (v/v), porém detergentes comuns de cozinha também podem ser utilizados como substituto.

Considerando a sensibilidade do tecido a ser desinfestado, manipula-se a concentração da solução e tempo de exposição de maneira inversamente proporcional.

O processo asséptico visa portanto inibir o desenvolvimento de patógenos (vírus, bactérias, fungos ou nematóides) responsáveis por inibir o poder germinativo das sementes.

De acordo com JOFFE (1969), oleaginosas como o gergelim, também são condicionadas com contaminação por patógenos. HANLEN (1973), reforça essa afirmativa, pois em sementes de amendoim foram isoladas cerca de 150 espécies de fungos, muitas delas responsáveis por graves doenças nessa cultura.

LIMA (1984), relata ainda que sementes de oleaginosas como o algodão inoculado com *Rhizopus sp* e *Aspergillus* apresentaram uma porcentagem de germinação e vigor significativamente menores, quando comparados com os das sementes não inoculadas.

SALAZAR (1996) cultivou *in vitro* segmentos de plantas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) variedades "Inamar" e "Arawaca", provenientes de campo e de laboratório. Avaliando o efeito da concentração de hipoclorito de sódio (0,1,2,4 e 8% p/v i.a.) ao tempo de exposição a solução desinfectante (0,3,5 e 10min.) na prevenção e aparecimento de microrganismos contaminantes, obtendo-se maiores porcentagens de

sobrevivência dos explantes em concentração de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo, durante 5 minutos.

VIDOR (1995) utilizou explantes de bulbos de jacinto pirenaico (*Hyacinthus amethystina cv. Albus L.*), previamente submetidas a distintos processos de assepsia antes do seu cultivo e evidenciou a eficácia do fungicida Miconazol no controle da contaminação dos explantes no meio.

RODRIGUES et al. (1996) com a finalidade de desenvolver uma metodologia de micropropagação eficiente para o abacate (*Persea americana Mill.*), desenvolveram diversas técnicas para prevenir a contaminação e a oxidação dos segmentos caulinares desta frutífera. As plantas da variedade "Ouro Verde", foram mantidas em sacos transparentes, reduzindo a oxidação na parte superior dos segmentos caulinares, possibilitando a diferenciação de gemas. Foi utilizado no ensaio o meio de cultivo MS, com a concentração salina limitada e suplementado com carvão ativado ($1g.L^{-1}$), onde os segmentos caulinares foram mantidos no escuro, após inoculação.

A contaminação foi reduzida após a assepsia complementar em solução de cloro e mercúrio ($HgCl_2$) em concentrações superiores ou iguais a 0,2% para fungos e 0,1% a 0,2% para bactérias.

Indução a Organogênese

A embriogênese somática consiste na formação de embriões somáticos (embriões) a partir de tecidos somáticos, com constituição idêntica a da planta mãe, a não ser nos casos em que ocorre a embriogênese por via indireta, passando pela formação de calos, quando poderá ocorrer variabilidade genética. Para que ocorra embriogênese somática as células diferenciadas devem ser primeiro desdiferenciadas, (desprogramação gênica) para ser determinada como células embriogênicas depois da divisão celular, (PASQUAL e RAMOS, 1997). A indução de embriogênese é muito difícil se não impossível no caso de muitas espécies vegetais. Os embriões podem ser utilizados tanto na continuação da propagação *in vitro* quanto na produção de sementes sintéticas.

Na embriogênese direta os embriões são originados diretamente do explante. A ocorrência de embriogênese direta tem sido registrada em tecidos gametófitos, esporofíticos e em tecidos que se originaram em função da fertilização dos gametas. Este fenômeno ocorre com maior probabilidade em micrósporos dentro da antera e tecidos de partes do ovário, incluindo as paredes do ovário ou carpelos, óvulo, embrião zigótico ou plântulas jovens.

O desenvolvimento de plantas podem ser realizados de duas maneiras: vegetativamente (clonagem), e de forma generativa (através de sementes).

A multiplicação de plantas *in vitro* para formação de órgãos e embriões adventícios é realizada com células caracterizadas por sua capacidade de regeneração.

A capacidade de regeneração é determinada pelo genótipo, as condições ambientais (adição de nutrientes, reguladores de crescimento e condições físicas) e pelo desenvolvimento da planta.

Assim sendo, diversos pesquisadores obtiveram êxito no desenvolvimento de plantas através da organogênese.

ARELLO (1991) obteve através de técnicas de cultura de tecido um elevado número de plantas saudáveis e livres de doenças de quatro cultivares de *Gerbera jamesonii* (*Appel Bloesen*, *Marleen*, *Clementine* e *Pimpernel*). Os explantes foram cultivados em meio "MS" modificado e suplementado com todas as combinações possíveis de BAP-6-benzilaminopurina (0,0-1,0-2,0-3,0 e 5,0 mg.L⁻¹); AIA – ácido indolacético (0,5 mg.L⁻¹) e KIN – Kinetina (0,0 e 2,0 mg.L⁻¹). Onde ocorreu desenvolvimento de calos com emissão de brotos principalmente para as variedades *Appel Bloesen* e *Marleen*.

CASTRO (1995) obteve segmentos nodais com cultivares de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.), onde os 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 Também) TR3-473 e Arroba produziram plântulas de alturas similares, porém com diferentes taxas de regeneração. A micropropagação dessas plântulas, através 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 NAA. De acordo com as respostas morfogênicas obtidas, os

ensaios mostraram-se propícios a calogênese e a multiplicação de gemas. Os meios com concentrações de BAP mais elevados promoveram a indução e a produção de calos nos dois tipos de explantes, enquanto que a rizogênese foi favorecida em meios com baixas concentrações de BAP. O desenvolvimento de gemas axilares a partir de segmentos nodais foi observado em meios com baixas concentrações de NAA.

CUNHA et al. (1992) desenvolveram inúmeras pesquisas sobre a produção e o melhoramento de kiwi (*Actinidia deliciosa*), utilizando a cultura de tecidos, com a necessidade de atender a crescente demanda por mudas desta cultura. Foram testados as variedades *Hayward* e *Allisar* na indução a organogênese, onde 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 baixa quantidade, devido provavelmente a elevada concentração de auxina, promovendo maior enraizamento do que a formação de gemas.

PINTO et al. (1989) objetivou a proliferação *in vitro* de gemas axilares do porta-enxerto trifoliata (*Poncirus trifoliata* L.) através da cultura de segmentos nodais e internodais obtidos de planta adulta. Foram testadas todas as combinações possíveis de BAP (6-benzilaminopurina) e NAA (ácido naftaleno-acético) nas concentrações de 0,0; 0,1 e 1,0 mg.L⁻¹ e cinetina a 0,0; 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹, adicionadas ao meio MS com 4% de sacarose. A melhor proliferação de brotos em segmentos nodais foi alcançada em presença de 1 mg.L⁻¹ de BAP + 0,1 mg.L⁻¹ de NAA. A cinetina usada em todos os tratamentos não apresentou efeito algum. Não houve proliferação nos segmentos internodais.

SILVA et al. (1995) estudando o estabelecimento de um protocolo eficiente via organogênese, para a obtenção de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz.) da variedade "Trouwinha". Utilizaram técnicas de indução de calos em folhas jovens, onde foram inoculadas em meio básico MS, suplementado com 5; 10; 15; e 20; mg.L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoacético), ou 1; 2; 4 e 6 mg.L⁻¹ de ANA (ácido-naftalenoacético). Observou-se que o 2,4-D induziu a formação de calos do tipo compacto, enquanto o tratamento com ANA resultou na formação de calos friáveis¹. Nos calos cultivados em meio MS com adição de 2; 4 e 6 mg.L⁻¹ de ANA observou-se a

¹ Calos friáveis em geral são calos induzidos a partir de calos compactos, obtidos inicialmente em meios com várias formulações minerais tais como o meio básico MS (Liau et al, 1970; Armstrong et al 1985).

organogênese indireta de brotos e raízes. Por sua vez, os calos com ausência de hormônios e os tratados com 1 mg.L^{-1} de ANA apresentaram apenas organogênese indireta de raízes.

LOH et al. (1989) estudaram partes diferentes de mudas de goiaba (*Psidium guajava* L.) e segmentos nodais de plantas enxertadas como explantes em cultura *in vitro*. Uma porcentagem de (75 – 100%) da regeneração dos brotos foram obtidas com mudas do hipocótilo e segmentos nodais cultivados em meio MS com ou sem BAP. O ótimo teor de BAP (6-bencilaminopurina) apresentou brotos em segmentos nodais em 1 ano de cultivo.

BHANSALI e ARYA (1979) cultivaram segmentos de talos de lima doce (*Citrus limettioides*) em meio básico MS. A formação de embriões aconteceu após 60 dias, contendo no meio, um nível baixo de auxinas ($0,1$ e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$) e um nível alto de citocininas ($0,25$ a $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$). O desenvolvimento de brotos aumentou quando o meio foi complementado com extrato de malte (500 mg.L^{-1}). Na organogênese foi observado, na ausência de auxinas a redução do número de brotos e folhas verdes sendo que a organogênese foi completamente inibida na presença do regulador de crescimento 2,4D.

NAIR et al. (1984) estudaram a formação múltipla de brotos, induzidos em folhas de *Ammona squamosa* Linn quando inoculadas em meio básico MS, suplementado com BAP (Bencilaminopurina) e KIN (Kinetina). As várias auxinas, em combinação com o meio, produziram calos nos explantes, onde também se observa que os fatores ambientais afetavam a indução de brotos, onde o número máximo de brotos foi alcançado em temperatura de 27°C e intensidade luminosa de 100 lux. Os autores observaram também que foram desenvolvidas raízes quando os brotos eram tratados individualmente em meio com auxina.

Métodos de Indução a Calogênese

Na embriogênese indireta os embriões são produzidos a partir de calos. A verdadeira embriogênese indireta requer que as células diferenciadas de um explante sejam induzidas a dividir calos não-diferenciados e, então, algumas células se tornam comprometidas ou predeterminadas em uma rota embriogênica.

Um calo é basicamente um tecido tumoral, mais ou menos organizado, que geralmente surge sobre órgãos e tecidos diferenciados. Chama-se de indução de calos o início de sua formação. É possível a formação de calos em várias espécies diferentes, todavia os calos são cultivados em meios diferentes, denominados subcultivos de calos.

Em condições excepcionais, e de forma espontânea pode-se produzir a regeneração de órgãos adventícios e embriões, a partir de calos. Em um meio líquido, um calo pode formar agregados (massas celulares), ou individuais, originando assim uma planta completa.

Diversos pesquisadores utilizando a técnica de indução a calogênese obtiveram o desenvolvimento de plantas completas, a partir do isolamento de células isoladas.

MATSUMOTO (1991) estudou condições de indução e crescimento de embriões somáticos em mandioca (*Manihot esculenta* Cranz.) onde calos embriogênicos friáveis foram induzidos a partir de folhas imaturas cultivadas no meio modificado de "MS", suplementado com altas concentrações de ácido 2,4-D (2,4-diclorofenociacético). Os embriões somáticos foram observados em calos "sem" e "com" 2,4-D em baixa concentração deste regulador de crescimento. A indução dos embriões somáticos foi mais eficiente no meio de cultura, suplementado com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ 2,4-D + 1 mg.L^{-1} GA₃ (ácido giberélico), após duas semanas de pré-cultivo. O número de embriões somáticos aumentou, quando suplementando 1 mg.L^{-1} GA₃ no meio.

MARY (1997) induziu embriões somáticos de calos provenientes de gergelim (*Sesamum indicum* L.) variedade TMV6, onde foi estudada a influência de diferentes concentrações de auxinas e citocininas. Entre as diferentes auxinas testadas, o 2,4-D (2,4-diclorofenoacético) foi o mais efetivo e resultou em um número médio mais alto de embriões somáticos. O efeito combinado de citocininas com 2,4-D também foram testados, entre as quatro citocininas testadas o 2,2 μ benziladenina com 13,6 μ M mostrou um aumento de embriões somáticos, enquanto que a Zeatina e a Kinetina (6- γ - γ dimethylaminopurine) não apresentaram resposta.

WEISSINGER e PARROTT (1993) fizeram uma seleção para gerar uma população de trevo branco (*Trifolium repens* L.) da cultivar Osceola, com capacidade embriogênica alta. Foram obtidos para tanto, embriões somáticos de cotilédones imaturos de trevo branco colocados em meio básico EC6 complementado com 40 mg.L^{-1} de 2,4-D e 6% de sacarose. Os efeitos da auxina 2,4-D com 20 e 40 mg.L^{-1} quando

suplementado com carboidratos, sacarose e maltose, foram avaliados na influência do estabelecimento da embriogênese somática repetitiva para determinar a metodologia na recuperação de plantas, com efeitos dos meios MS e EC6. A subcultura repetida de trevo branco com embriões somáticos em meio básico EC6 complementado com 2,4-D a 20 ou 40 mg.L⁻¹, efetivamente mantém a embriogênese repetitiva. O meio que contém os sais de MS com 6% de maltose como fonte de carboidrato era o mais eficiente para a recuperação das plantas.

BERED et al. (1998) pesquisou nove genótipos de aveia (*Avena sativa* L.) onde foram avaliados com o objetivo de testar a sua capacidade de regeneração *in vitro*. Embriões imaturos medindo entre 1 e 3 mm foram colocados em meio MS com 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) para a indução de calos. Na etapa seguinte, o regulador de crescimento 2,4-D foi reduzido, e na fase de regeneração foi totalmente eliminado. Os calos foram avaliados quanto a sua habilidade de produção de embriões somáticos, sendo realizado um teste de correlação entre este caráter e a sua regeneração. Todos os genótipos mostraram capacidade de regenerar as plantas, porém foi detectada a variabilidade quanto a este caráter. A análise de correlação entre a embriogênese e a regeneração revelou a baixa correlação significativa entre as características, o que indica que a regeneração pode ter ocorrido principalmente por organogênese.

Liu e Chen em (1977), citado por CLAPHAM (1977) afirma que o cultivo *in vitro* é uma técnica utilizada na produção de haplóides de plantas de grande importância econômica e científica. E que Reener e Bajaj no mesmo ano, observaram que anteras de mais de 18 gêneros cobrindo 25 espécies de dicotiledôneas foram cultivadas gerando calos, embriões e plantas inteiras. Até mesmo os materiais mais difíceis como cereais (7 gêneros que incluem 16 espécies) também poderiam ser cultivados por indução a organogênese formando plantas completas

1.3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia no Centro Nacional de Pesquisa de Algodão – CNPA da Empresa Brasileira de Produção Agropecuária – EMBRAPA, em Campina Grande – PB.

Foram utilizadas 3 variedades de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.), obtidas na Embrapa Algodão, denominadas de Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3.

3.2 ASSEPSIA DE INSTRUMENTOS

Todo instrumento utilizado em cada cultivo como filtro, provetas, frascos de água, béckers, erlenmeyers, placas de Petri, tubos de ensaio, frascos para meio etc., foram esterilizados em estufa (a temperatura de 100°C), durante um período de uma hora.

A manipulação do material vegetal foi realizada em condições estéreis em câmara de fluxo laminar, previamente limpa com etanol a 96%.

Os instrumentos (bisturis, pinças, tesouras etc.) empregados nos diferentes cultivos foram esterilizados dentro de câmara de fluxo laminar flambando-as. Para tal aplicação, se submerge o material em etanol a 96% em seguida esse material entra em contato com uma chama de fogo, repetindo a operação várias vezes durante o trabalho, ou utilizando o esterilizador elétrico.

3.3 MEIOS DE CULTIVO

O meio de cultivo utilizado nos ensaios foi o meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962) para a germinação e no processo de indução a organogênese, amplamente utilizado em todos os campos de cultivo *in vitro*. O meio contém o agar (Bacto agar (Difco) como agente solidificante em concentração de 7g.L⁻¹. A fonte de carbono empregada foi a sacarose (30g.L⁻¹). Como dissolvente dos nutrientes, vitaminas,

hormônios, sacarose, agar e também se utiliza água destilada ou desmineralizada. Em todos os casos o pH (medido em phmetro) foi ajustado a 5,7 – 5,8 mediante a adição de hidróxido de sódio (NaOH – 0,1 ou 1N), segundo o caso, antes de dissolver o agar e uma vez adicionando resto dos componentes do meio de cultivo.

O agar foi dissolvido no meio mediante o uso de um agitador magnético. Posteriormente procedeu-se a sua distribuição em frascos, cilíndricos contendo 10 ml de meio sólido, fechados com tampa plástica de rosca. Este tipo de fechamento impede a dissecação do meio e infecção por patógenos, permitindo o intercâmbio de fluxo do ar.

O meio uma vez nos frascos, foi esterilizado em autoclave a 120°C e 1kg.cm⁻² durante 20 minutos. O resfriamento e solidificação dos meios de cultivo foi feito a temperatura ambiente e o seu armazenamento se empregou em câmara fria.

Nos ensaios de germinação e indução a organogênese foi empregado o meio descrito por Murashige & Skoog (1962), denominado MS (Tabela 1). Para a germinação não adicionado fitohormônios ao meio de cultivo.

Na Figura 1, encontra-se uma foto de plântulas de gergelim, inoculadas em meio de cultivo MS, utilizadas nos ensaios de indução a organogênese.

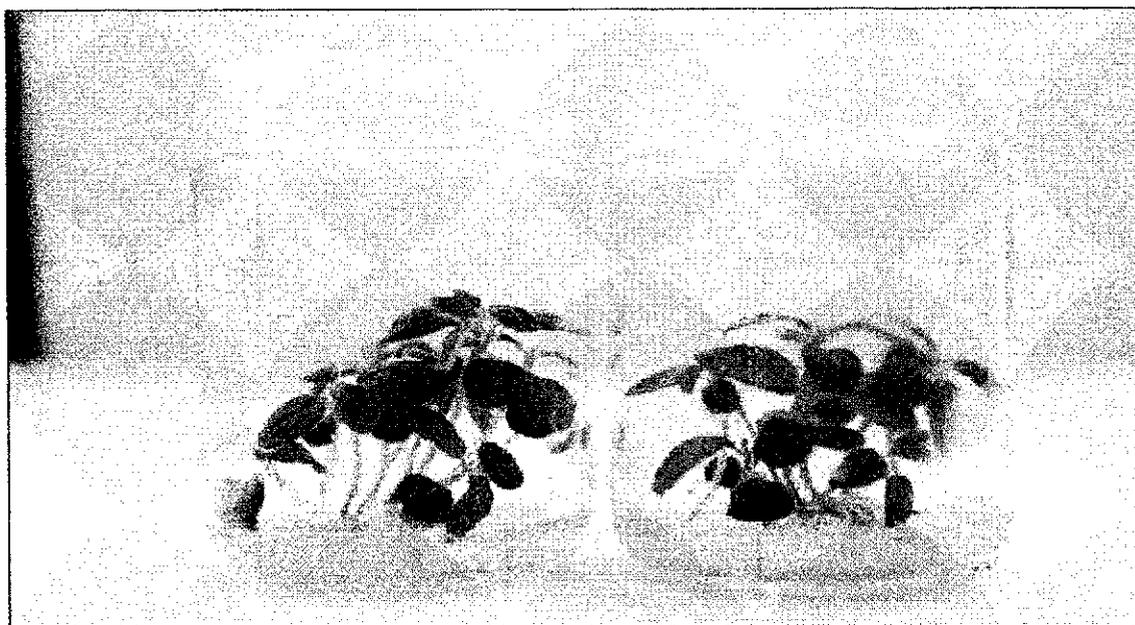


Foto: Sérgio Cobel – Embrapa Algodão

FIGURA 1. Meio de cultivo MS utilizado nos ensaios de indução a organogênese.

Para facilitar a preparação do meio MS, seus componentes se agrupam em soluções concentradas (Tabela 2) que foram diluídas no momento de sua utilização.

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

- Solução A – 100 ml
- Solução B – 100 ml
- Solução C – 100 ml
- Solução D – 100 ml

Nos ensaios de multiplicação por gemas axilares, foi estudado o efeito de diferentes combinações e concentrações dos reguladores de crescimento:

Citocininas

- BAP (6-bencilaminopurina),
- 2iP (6- γ , γ -dimetilamino purina),
- KIN (6-furfurilaminopurina ou Kinetina).

Nos ensaios de Indução de calo a partir de segmentos de hipocótilo, adiciona-se ao meio MS os seguintes reguladores de crescimento:

Citocinina

- BAP (6-bencilaminopurina)

Auxinas

- NAA (Ácido α -naftaleno – acético)
- 2,4-D (Ácido diclorofenoacético) e água de côco como substância natural.

Para o meios de indução a organogênes foi utilizado sais minerais de MS, compostos orgânicos e vitaminas do meio B5 (GAMBORG et al. 1968), segundo Tabela 3. A preparação das soluções concentradas de citocininas e auxinas são realizadas dissolvendo-a previamente em ácido clorídrico ou hidróxido de sódio 1N, respectivamente, antes de adicionar água destilada. O ácido giberélico é dissolvido diretamente em água destilada.

As auxinas e citocininas foram adicionados ao meio de cultivo, nas concentrações correspondentes para cada caso, antes da esterilização do meio.

TABELA 1. Composição de sais minerais, componentes orgânicos e vitaminas do meio básico MS (Murashige & Skoog, 1962).

Macronutrientes		mg.L⁻¹
NH ₄ NO ₃		1,650
KNO ₃		1,900
CaCl ₂ *2H ₂ O		440
MgSO ₄ *7H ₂ O		37
KH ₂ PO ₄		170
Micronutrientes		mg.L⁻¹
H ₃ BO ₃		6,200
MnSO ₄ *4H ₂ O		16,900
ZnSO ₄ *7H ₂ O		8,600
KI		0,830
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O		0,250
CuSO ₄ *5H ₂ O		0,025
CoCl ₂ *6H ₂ O		0,025
Fonte de Ferro		mg.L⁻¹
Na ₂ EDTA*2H ₂ O		37,250
FeSO ₄ *7H ₂ O		27,850
Vitaminas e outros suplementos orgânicos		mg.L⁻¹
Mioinositol		100,000
Tiamina - HCl		0,100
Piridoxina - HCl		0,500
Ac. Nicotínico		0,500
Glicina		2,000

TABELA 2. Composição das soluções concentradas utilizadas para a preparação do meio de cultivo MS.

Solução A (Macronutrientes)		mg.L⁻¹
NH ₄ NO ₃		16,500
KNO ₃		19,000
CaCl ₂ *2H ₂ O		4,400
MgSO ₄ *7H ₂ O		3,700
KH ₂ PO ₄		1,700
Solução B (Micronutrientes)		mg.L⁻¹
H ₃ BO ₃		6,200
MnSO ₄ *4H ₂ O		16,900
ZnSO ₄ *7H ₂ O		8,600
KI		830
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O		250
CuSO ₄ *5H ₂ O		25
CoCl ₂ *6H ₂ O		25
Solução C (Fonte de Ferro)		mg.L⁻¹
Na ₂ EDTA*2H ₂ O		3,725
FeSO ₄ *7H ₂ O		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

Para preparar um litro do meio, utiliza-se 10 ml da solução concentrada de vitaminas B5 (Tabela 3) no lugar da solução D do meio MS.

TABELA 3. Vitaminas e outros suplementos orgânicos do meio B5 (GAMBORG et al., 1968) e da solução concentrada utilizada.

Vitaminas e outros suplementos orgânicos	Meio (mg.L ⁻¹)	Solução Concentrada (mg.L ⁻¹)
Mioinositol	100	10,000
Tiamina - HCl	10	1,000
Piridoxina - HCl	1	100
Ac. Nicotínico	1	100

3.4 ASSEPSIA DAS SEMENTES

Após as sementes de gergelim terem sido selecionadas, essas sofreram uma assepsia com cinco diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (NaClO), ou seja 0, 10, 20, 30 e 40% de cloro ativo durante 10 minutos, respectivamente. Após a assepsia das sementes, essas foram lavadas três vezes, em água esterilizada. As sementes tratadas foram colocadas para crescimento em meio básico MS e em papel germitest (PG).

No meio básico MS as sementes de gergelim foram colocadas para emergirem sem regulador de crescimento, no entanto foi acrescido ao meio, 3% (m/v) de sacarose e 0,55 g/L⁻¹ de agar.

O pH do meio básico MS foi ajustado para 5,7-5,8 antes da autoclavagem a 120°C por 20 minutos. Para o teste *in vitro* foram utilizados 20 frascos por tratamento, com dez sementes por frasco.

Após o período de 7 a 10 dias de cultivo, observou-se o número de sementes germinadas, de acordo com a R.A.S, sendo realizado o Teste de Germinação com a contagem de sementes germinadas e o Teste de Vigor que foi realizado utilizando-se o teste indireto de primeira contagem do teste de germinação, e altura total de plântulas, (POPINIGIS, 1979).

As sementes colocadas para emergirem no papel germitest (PG), foram assentadas no interior de placas de Petri, contendo uma folha de papel, onde eram pulverizadas com água esterilizada a cada 24 horas. Para todos os casos, a incubação foi mantida a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ com um fotoperíodo de 16hs luz e 8hs no escuro e intensidade luminosa de $50\mu\text{ mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$. Para determinação da germinação e o vigor das sementes foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes totalizando 200 sementes por variedade, para cada método, seguindo-se as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

Para proceder análise comparativa dos dados obtidos de germinação e vigor das sementes de gergelim para os diferentes meios, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, em arranjo fatorial de $2 \times 5 \times 3$ (2 meios de germinação, 5 concentrações e 3 cultivares). Essa análise foi realizada como o programa computacional Assistat, desenvolvido por SILVA, (1996).

3.5 IDENTIFICAÇÃO DOS PATÓGENOS

A identificação dos patógenos foi realizada no Centro de Ciências Agrárias/ UFPB – Campus III (Areia), no Departamento de Fitotecnia.

Após o período de germinação foi verificado a contaminação por fungos nos frascos utilizados para o cultivo *in vitro*. Os fungos presentes nas sementes foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-agar (BDA), sendo incubado, durante 12 dias, a temperatura de 30°C e submetido a luz fluorescente e posteriormente identificados.

A identificação fitopatológica foi realizada por colônia de fungos por frasco contaminado.

A análise estatística das colônias de fungos por frascos contaminados foi realizada em blocos inteiramente casualizados, sendo os dados originais, para a porcentagem de viabilidade germinação e vigor transformados em $\sqrt{x+1}$, utilizando-se os testes F e Tukey (nível de significância de 5%).

3.6. INDUÇÃO A ORGANOGÊNESE

Na fase inicial para a assepsia das sementes, utilizou-se 20% da solução de hipoclorito de sódio e uma gota de tween 20 para 100ml da solução. Na fase posterior de indução a organogênese foram utilizados ensaios “sem” e “com” o pré-tratamento das sementes que consistia em colocar as sementes em meio MS (sem agar) + BAP (8mg.L^{-1}) por 72 horas, sendo em seguida transferidos para o meio de germinação.

O meio para indução a organogênese, consiste no meio MS suplementado com vitaminas B5 e a fonte de carbono sendo a sacarose com 3%. O solidificante utilizado no meio é o agar com $6,0\text{ mg.L}^{-1}$, sendo o pH ajustado para 5,8.

A temperatura da câmara de crescimento utilizada no ensaio situa-se em torno dos 25°C com uma intensidade luminosa de $25 \pm 28\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Os reguladores de crescimento utilizados nos ensaios foram as citocininas: BAP, 2iP e KIN em volume de 6, 8 e 10 mg.L^{-1} .

A análise estatística foi realizada com delineamento inteiramente casualizado com um esquema fatorial de 3×10 (3 cultivares e 10 meios) com três repetições (explantes em cada frasco), para cada tratamento. Sendo os parâmetros de avaliação: Explantes Vivos (EV), Proliferação (PR), Número de brotos por explante (B/E), Tamanho de maior broto (TMB) e o Número de Nós (NN).

A análise estatística foi realizada seguindo parâmetros diferentes para cada etapa do trabalho onde, para a indução a organogênese utilizou-se a transformação dos dados obtidos, para a realização de análise de acordo com a fórmula a seguir:

$$\boxed{\sqrt{x+1}} \quad \text{onde o x representa os dados obtidos.} \quad (1)$$

3.7. INDUÇÃO A CALOGÊNESE

Para a realização do ensaio de indução a calogênese foi realizado inicialmente a assepsia das sementes de gergelim com 20% da solução de hipoclorito de sódio, em seguida as sementes foram inoculadas em meio MS, complementado com 30 mg.L^{-1} de

sacarose como fonte de carbono e o solidificante utilizado sendo o agar de $5,5 \text{ mg.L}^{-1}$ sendo suplementado com glutamina (200 mg.L^{-1}) e ($0,3 \text{ mg.L}^{-1}$) de tiamina.

O pH do meio básico MS foi ajustado para 5,8 e a incubação foi realizada com a temperatura de 25°C e intensidade luminosa em câmara de crescimento de $25 \pm 28 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

A origem dos explantes foram plântulas a partir de sementes germinadas *in vitro*, sendo o hipocótilo sendo órgão utilizado como explantes.

Os reguladores de crescimento utilizados no meio, foram a citocinina BAP (1 e 2 mg.L^{-1}), Auxinas: NAA ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$) e 2,4D ($2,5$ e $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e outra substância como água de côco a 15%.

O subcultivo dos calos bem desenvolvidos após 4 semanas da inoculação, esses são subcultivados utilizando 2 – 3 gramas de calos para o meio fresco substituindo as vitaminas de MS + $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ de tiamina pela vitamina B5. Os parâmetros de avaliação foram: friabilidade e coloração dos calos.

A análise estatística foi realizada com delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial de 2×3 (2 meios) e (3 cultivares) com 18 repetições (três explantes em cada frasco) para cada tratamento.

Na indução a calogênese, com intuito a avaliar os reguladores de crescimento no desenvolvimento de calos embrionários, nas 3 variedades de gergelim, utilizou-se as fórmulas a seguir para obtenção dos pesos inicial (P_i) e peso final (P_f) dos calos, após 60 dias de desenvolvimento.

$$P_i = P_{fmex} - P_{fm} \quad (2)$$

$$P_f = \frac{P_{fed} - P_{des}}{P_{des}} \quad (3)$$

$$IPU = \frac{(P_f - P_i)}{P_i} \quad (4)$$

em que:

Pi = Peso Inicial;

Pf = Peso Final;

Pfm = Peso do frasco com meio;

Pfmex = Peso do frasco com meio + explante;

Pfdes = Peso do frasco a ser descartável;

Pfcd = Peso frasco com calo desenvolvido;

IPU = Incremento de Peso Unitário.

Para a coleta dos dados foram utilizadas fichas técnicas com dados explicativos que encontra-se no Apêndice A-I, em anexo.

Para a realização da análise estatística, com representação gráfica, foi utilizado o programa computacional Origin 5.0.

I. 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4. 1 ASSEPSIA DAS SEMENTES

Na Tabela 4 encontra-se a análise de variância simplificada da germinação e do vigor das sementes de gergelim variedade Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3, após serem submetidas a um processo de assepsia a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e em seguida colocada para germinar nos meio de cultivo MS e em papel germitest (PG). Nessa tabela verifica-se que existem diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F, na germinação e no vigor das sementes de gergelim para todos os fatores estudados e suas interações.

Na Tabela 5 podemos observar que germinação das sementes de gergelim quando colocadas para germinar no papel germitest (PG), têm valores superiores do que quando, essas mesmas sementes, são colocadas para germinar no meio MS. No entanto, quando se determina o vigor das sementes não existe diferença significativa entre os dois meios de germinação.

Na Tabela 5 é possível de verificar também que as concentrações usadas de hipoclorito de sódio para a assepsia das sementes afetam a sua qualidade fisiológica. Observa-se também, nessa tabela, que as concentrações que afetam menos a germinação das sementes está entre 10 e 20% de hipoclorito de sódio embora a concentração de 40% não defira dessas duas concentrações. Para o vigor das sementes de gergelim constata-se que todas as concentrações utilizadas afetam igualmente o seu vigor.

Ainda na Tabela 5 podemos verificar que, dentre as variedades estudadas, a CNPA-G2 é a variedade menos afetada com o tratamento asséptico das sementes de gergelim diferindo sua germinação e seu vigor das outras duas variedades (CNPA-G3 e Seridó-1).

Na Tabela 6 encontram-se os valores de germinação e vigor das sementes de gergelim para a interação entre os fatores variedades e meio de germinação. Nessa tabela constata-se que para as variedades CNPA-G2 e CNPA-G3 existem diferenças significativas na germinação e vigor das sementes de gergelim quando colocadas nos

dois meios de germinação e que o melhor meio, para essas duas variedades é o Papel Germitest (PG)

Ainda em relação à Tabela 6 podemos observar que a variedade CNPA-G2, também apresenta os maiores índices de germinação e vigor quando comparadas com as outras duas variedades para os dois meios de germinação utilizados, embora o vigor da variedade CNPA-G2 não defira estatisticamente, da variedade Serido-1 quando colocada no meio de cultivo MS.

TABELA 4. Análise de variância simplificada da germinação e vigor de 3 variedades de sementes de gergelim Seridó-1, CNPA-G2, CNPA-G3, quando submetida a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0, 10, 20 30 e 40%) em dois meios de germinação papel germitest (PG) e *in vitro*, utilizando-se o meio básico MS.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	GERMINAÇÃO F	VIGOR F
Meio	2	160,36 **	106,35 **
Concentração	1	75,49 **	0,26 **
Variedade	4	74,15 **	13,61 **
Meio x Concentração	2	55,92 **	69,69 **
Meio x Variedade	8	15,24 **	4,02 **
Concentração x Variedade	4	13,77 **	1,10 **
Meio x Concentração x Variedade	8	10,91 **	6,78 **
Resíduo	90		
Total	119		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F
ns não significativo

TABELA 5. Valores médios da germinação e vigor das sementes de gergelim para os fatores variedades, concentrações de hipoclorito de sódio e meios de germinação.

VARIÁVEIS		GERMINAÇÃO	VIGOR
		F	F
MEIOS DE GERMINAÇÃO	MS	81,18 b	37,77 a
	PG	88,23 a	38,43 a
	DMS	1,61	2,62
CONCENTRACAO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO	Testemunha	98,00 a	47,50 a
	10%	82,33 b	34,00 b
	20%	82,67 b	37,83 b
	30%	78,33 c	36,08 b
	40%	81,88 bc	35,08 b
	DMS	3,57	5,81
VARIEDADES DE SEMENTES DE GERGELIM	CNPA-G2	94,75 a	51,60 a
	CNPA-G3	77,80 c	32,80 b
	Seridó-1	81,58 b	29,90 b
	DMS	2,37	3,85

As medidas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey

Na Tabela 7, mostrada abaixo, encontram-se os valores de germinação e vigor das sementes de gergelim para os fatores variedades e concentração de hipoclorito de sódio para assepsia das sementes, onde ao analisar-se as colunas observa-se que só a variedade CNPA-G2 não é afetada na sua germinação e vigor pela diferentes concentrações de hipoclorito de sódio utilizadas para realizar assepsia das sementes. Contudo ao analisar-se nas linhas, as diferentes concentrações de hipoclorito de sódio para cada variedade, observa-se que a germinação das sementes para as variedades Seridó-1 e CNPA-G3 é afetada significativamente para todas as concentrações de hipoclorito de sódio e o vigor dessas sementes não é afetado quando utiliza-se 20 % de hipoclorito de sódio na variedade Serido-1 e 30 % na variedade CNPA-G3

Em relação ainda a Tabela 7, pode-se observar também que a germinação da variedade CNPA-G2 não é afetada quando se utiliza 10 ou 30% de hipoclorito de sódio na assepsia da semente, embora o seu vigor não seja afetado por qualquer uma das concentrações de hipoclorito de sódio utilizadas neste trabalho.

Analisando-se a Tabela 8, onde está a interação entre os fatores, meios de cultivo e concentração de hipoclorito de sódio, pode-se observar nas linhas, que todos os

valores de germinação e vigor diminuem significativamente quando colocados, nas diversas concentrações de hipoclorito de sódio, para assepsia das sementes nos dois meios de germinação, exceção se faz para o vigor das sementes colocadas a 20% de hipoclorito de sódio no meio de cultivo MS.

Analisando-se ainda a Tabela 8 nas colunas, verifica-se que existem diferenças significativas na germinação das sementes quando essas são colocadas para germinar nos os dois meio de cultivo, (PG e MS), nas concentrações de hipoclorito de sódio de 10, 20 e 30%, só não diferindo estatisticamente na concentração de 40 % de hipoclorito de sódio. Contudo quando analise o vigor das sementes essas só são diferentes estatisticamente na concentração de 30% de hipoclorito de sódio.

TABELA 6. Valores médios da germinação e do vigor das sementes de gergelim, para a interação entre os fatores meios de germinação e variedades, após assepsia das sementes nas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

GERMINAÇÃO			
MEIOS DE GERMINAÇÃO	VARIEDADES DE SEMENTES DE GERGELIM		
	CNPA - G2	CNPA - G3	Seridó - 1
MS	92,50 b A	68,50 b C	82,55 a B
PG	97,00 a A	87,10 a B	80,60 a C
DMS / coluna = 2,79 (letras minúsculas) DMS / linha = 3,35 (letras maiúsculas)			
VIGOR			
MEIOS DE GERMINAÇÃO	VARIEDADES DE SEMENTES DE GERGELIM		
	CNPA - G2	CNPA - G3	Seridó - 1
MS	43,00 b A	30,30 b B	40,00 a A
PG	62,20 a A	35,30 a B	19,80 b C
DMS / coluna = 4,54 (letras minúsculas) DMS / linha = 5,54 (letras maiúsculas)			

As medidas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey

TABELA 7. Valores médios da germinação de gergelim, variedades CNPA-G2, CNPA-G3 e Seridó-1, para a interação entre os fatores concentração e variedades, após assepsia das sementes, quando submetidas a diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0, 10 20, 30 e 40%) em dois meios de germinação PG e *in vitro*, utilizando o meio básico MS.

GERMINAÇÃO						
VARIEDADES	CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO (%)					
	Testemunha	10	20	30	40	
CNPA-G2	99,00 a A	96,75 a A	91,75 a B	94,50 a A	91,75 a B	
CNPA-G3	99,00 a A	71,00 c B	71,75 c B	69,75 b C	77,50 b B	
Seridó-1	97,00 a A	79,25 b B	84,50 b B	70,75 b C	76,38 b B	
DMS / coluna = 5,30 (letras minúsculas)			DMS / linha = 6,19 (letras maiúsculas)			
VIGOR						
VARIEDADES	CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO (%)					
	Testemunha	10	20	30	40	
CNPA-G2	55,00 a A	48,25 a A	49,75 a A	52,00 a A	53,00 a A	
CNPA-G3	44,00 b A	25,25 b C	29,75 b C	34,50 b A	30,50 b B	
Seridó-1	43,50 b A	28,50 b B	34,00 b A	21,75 c C	21,75 b C	
DMS / coluna = 8,62 (letras minúsculas)			DMS / linha = 10,06 (letras maiúsculas)			

As medidas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo Teste de Tukey

TABELA 8. Valores médios da germinação de gergelim, variedades Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3, para a interação entre os fatores meios de germinação e assepsia das sementes de gergelim nas diferentes concentrações de hipoclorito de sódio.

GERMINAÇÃO						
MEIOS DE GERMINAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO (%)					
	Testemunha	10	20	30	40	
MS	98,33 a A	76,50 b C	77,50 b B	71,50 b C	82,08 a B	
PG	98,33 a A	88,17 a B	87,83 a B	85,17 a B	81,67 a C	
DMS / coluna = 3,61 (letras minúsculas)			DMS / linha = 5,05 (letras maiúsculas)			
VIGOR						
MEIOS DE GERMINAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO (%)					
	Testemunha	10	20	30	40	
MS	47,50 a A	34,50 a B	39,17 a A	33,33 b B	34,33 a B	
PG	47,50 a A	33,50 a B	36,50 a B	38,83 a B	35,83 a B	
DMS / coluna = 5,86 (letras minúsculas)			DMS / linha = 8,22 (letras maiúsculas)			

As medidas seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% pelo Teste de Tukey

Nos Gráficos de 1 e 2 encontram-se as equações que representam, respectivamente a variações dos percentuais de germinação e vigor das sementes de gergelim, para a variedade CNPA-G2, quando essa é colocada nas concentrações de 0,

10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia, e posteriormente postas no meio de cultivo MS e em papel germitest (PG). Nos dois gráficos as equações que expressam essas variações são equações de 3ª ordem com coeficiente de determinação variando entre 62,77 e 99,99%.

Nesses gráficos fica evidente que existem comportamentos diferentes entre os dois meios de germinação evidenciando-se que no papel germitest (PG) as sementes se desenvolvem melhor e que com relação aos percentuais de concentração de hipoclorito de sódio, para realização da assepsia da variedade CNPA-G2, pode-se usar de 10 a 40%. Portanto por questões de economia deve-se recomendar o uso de 10% de hipoclorito de sódio para assepsia das sementes variedade CNPA-G2 e uso do Papel Germitest para realização do teste de germinação.

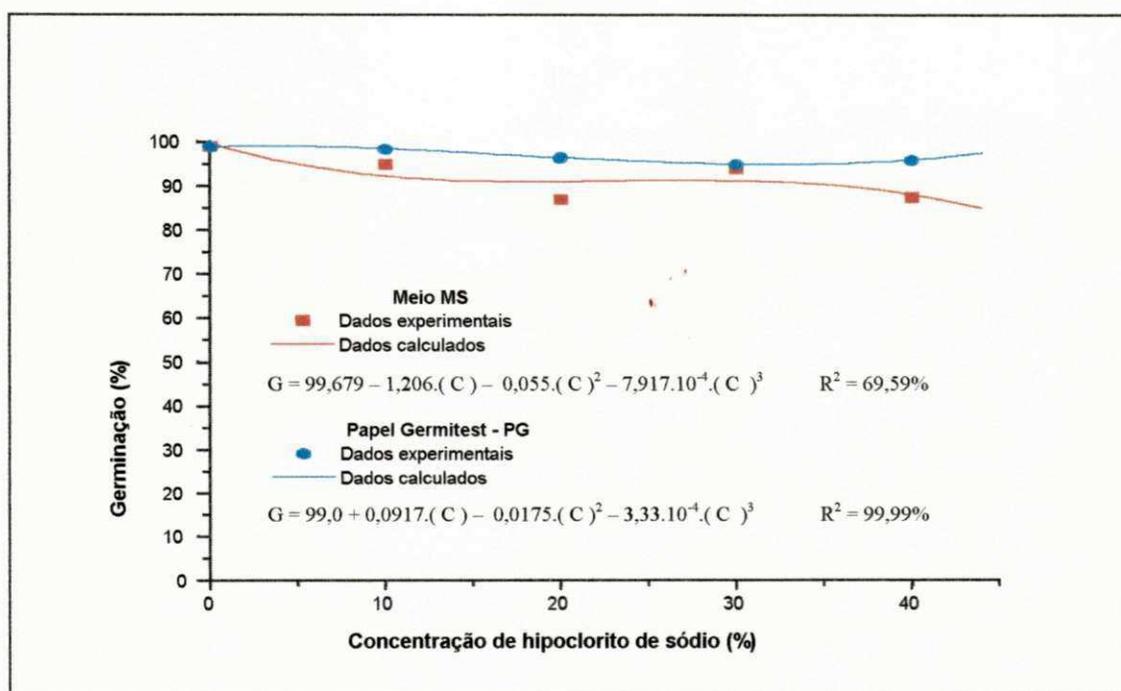


GRÁFICO 1. Curvas da variação dos percentuais de germinação das sementes de gergelim, variedade CNPA-G2, quando submetidas às concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia e colocadas para germinar no meio de cultivo MS e em papel germitest (PG).

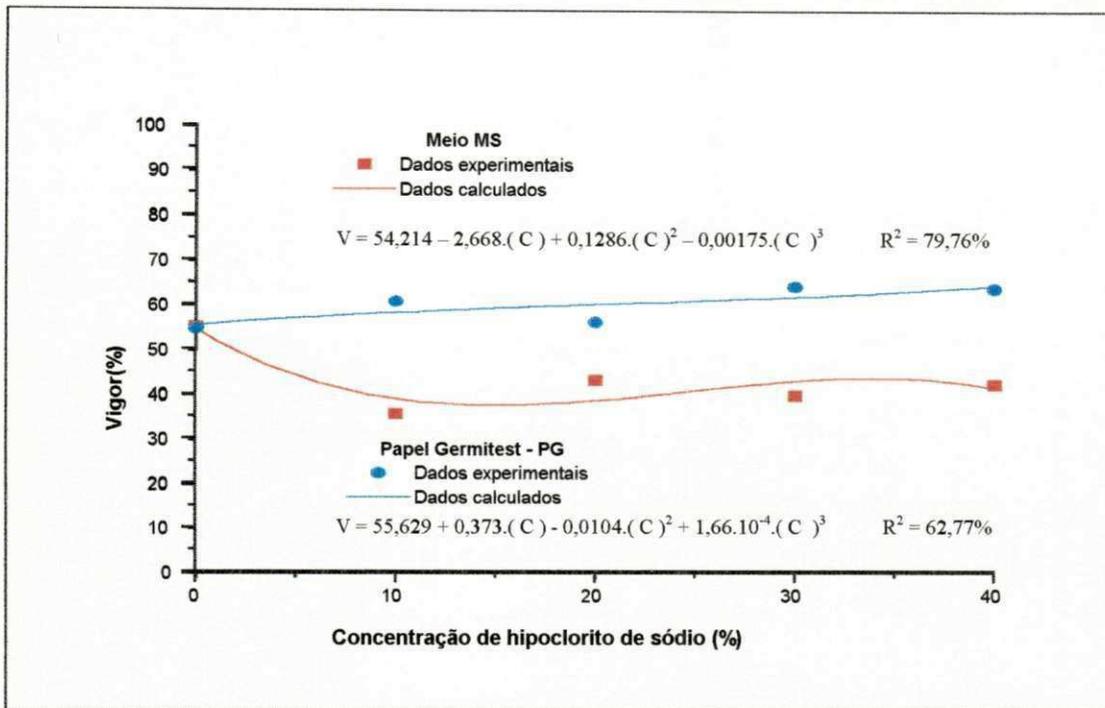


GRÁFICO 2. Curvas da variação dos percentuais de vigor das sementes de gergelim, variedade CNPA-G2, quando submetidas às concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia e colocadas no meio de cultivo MS e em papel germitest (PG).

Nos Gráficos 3 e 4 encontram-se as equações que representam, respectivamente a variações dos percentuais de germinação e vigor das sementes de gergelim, para a variedade CNPA-G3, quando essa é colocada nas concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia, e posteriormente postas no meio de cultivo MS e em papel germitest (PG). Nas duas figuras as equações que expressam essas variações são equações de 3ª ordem com coeficiente de determinação variando entre 96,50 e 99,80%, que foram bem mais elevados que os encontrados para a variedade CNPA-G2

Nesses Gráficos 3 e 4 também fica evidente que as sementes de gergelim, variedade CNPA-G3, se desenvolvem melhor no papel germitest (PG) do que no meio de cultivo MS, verificando-se ainda que dentre as concentrações de hipoclorito utilizadas para fazer a assepsia das sementes o percentual de 20% deve ser o recomendado para esta variedade.

As equações que representam as variações dos percentuais de germinação e vigor das sementes de gergelim, variedade Seridó-1, quando esta é colocada nas

concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia, e posteriormente postas no meio de cultivo MS e em papel germitest (PG), encontram-se, respectivamente nos Gráficos 5 e 6. As equações que expressam essas variações são equações de 3ª ordem com coeficiente de determinação variando entre 53,06 e 92,47%.

Ao contrario das variedades anteriores, observa-se que a variedade Serido-1 tem um comportamento melhor quando colocada no meio de cultivo MS e que a melhor concentração de hipoclorito de sódio para realização da assepsia dessa variedade se dá com 20%.

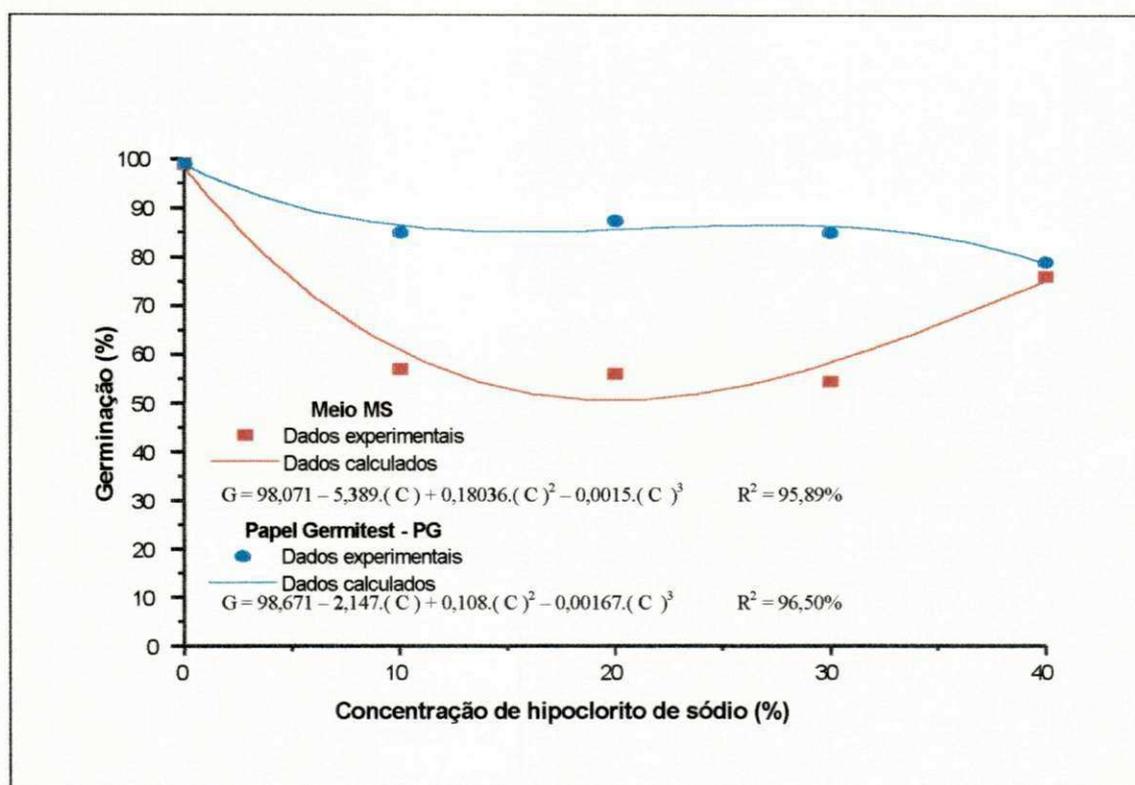


GRÁFICO 3. Curvas da variação dos percentuais de germinação das sementes de gergelim, variedade CNPA-G3, quando submetidas às concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia e colocadas para germinar no meio de cultivo MS e em papel germitest (PG).

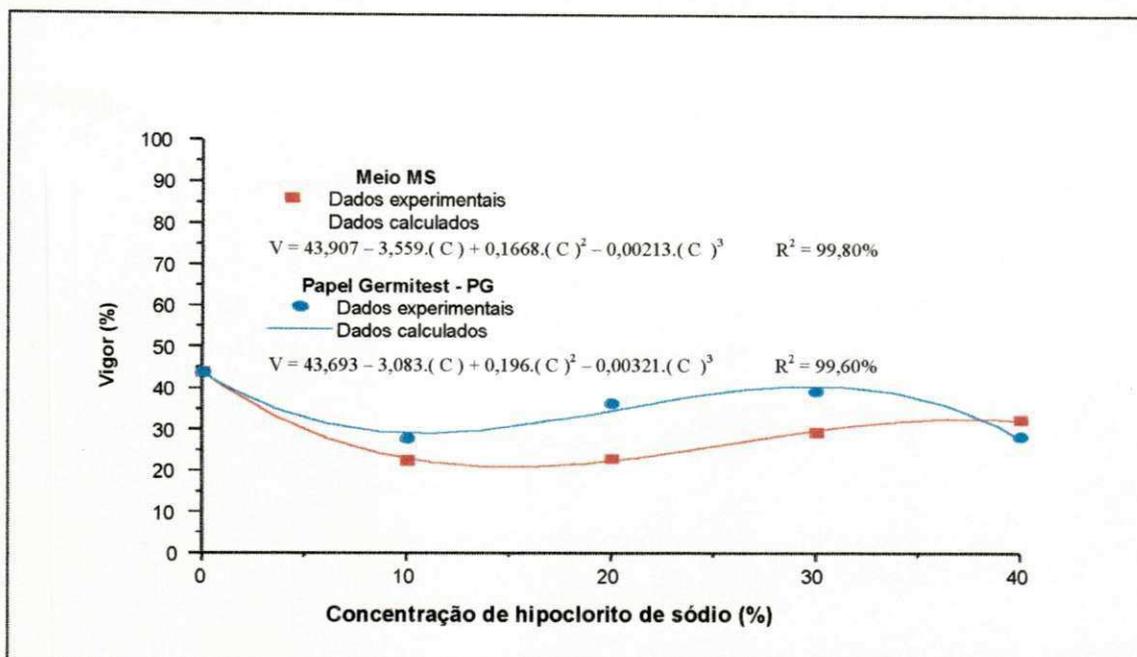


GRÁFICO 4. Curvas da variação dos percentuais de vigor das sementes de gergelim, variedade CNPA-G3, quando submetidas às concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia e colocadas no meio de cultivo MS e em papel germitest (PG).

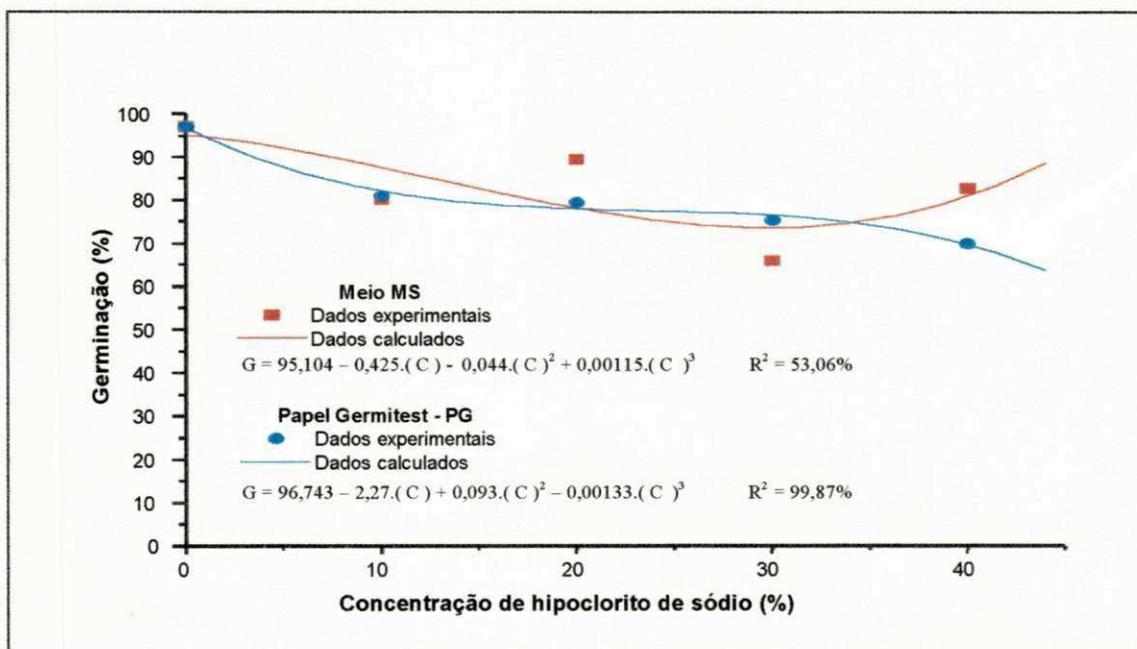


GRÁFICO 5. Curvas da variação dos percentuais de germinação das sementes de gergelim, variedade Seridó-1, quando submetidas às concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia e colocadas para germinar no meio de cultivo MS e em papel germitest (PG).

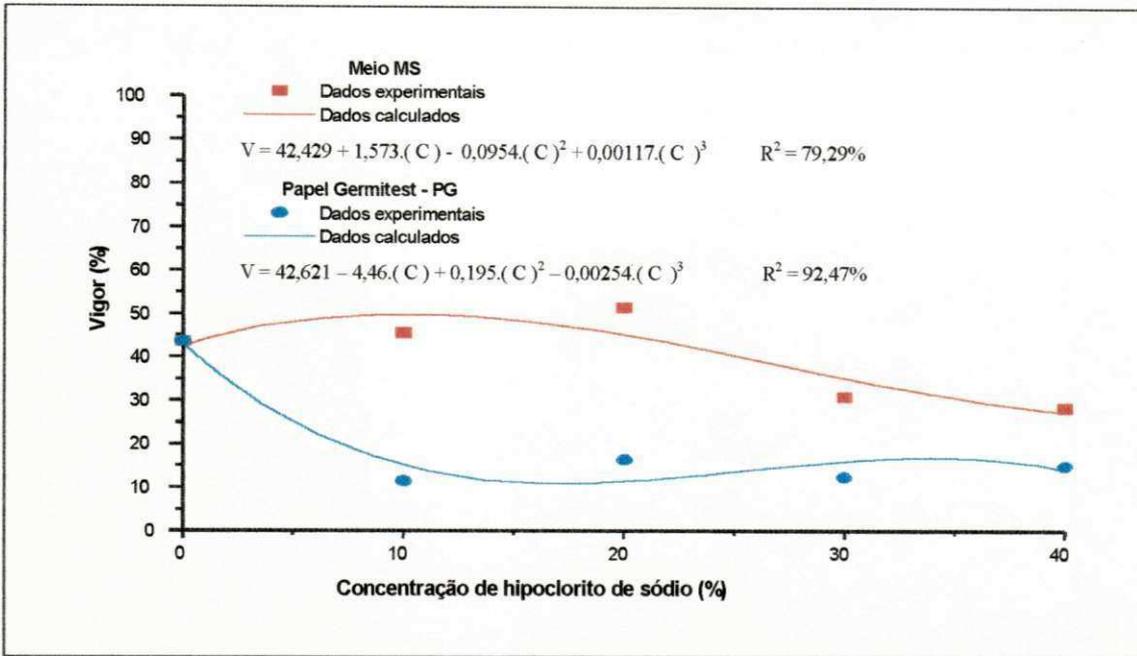


GRÁFICO 6. Curvas da variação dos percentuais de vigor das sementes de gergelim, variedade Seridó-1, quando submetidas às concentrações de 0, 10, 20, 30 e 40% de hipoclorito de sódio para realização de sua assepsia e colocadas no meio de cultivo MS e em papel germitest (PG).

Ao contrário das variedades anteriores, observa-se que a variedade Seridó-1 tem um comportamento melhor quando colocada no meio de cultivo MS e que a melhor concentração de hipoclorito de sódio para realização da assepsia dessa variedade se realiza com 20%.

Identificação dos patógenos

Dos dois meios estudados para germinação das sementes de gergelim, apenas no meio de cultivo MS detectou-se a existência de patógenos.

Com relação a esses patógenos, foram identificadas 4 espécies de fungos, *Aspergillus sp*, *Penicillium spp*, *Rhizoctonia* e o *Rhizopus sp.*, que se encontram nas Figuras a, b, c e d, respectivamente na Figura 2.

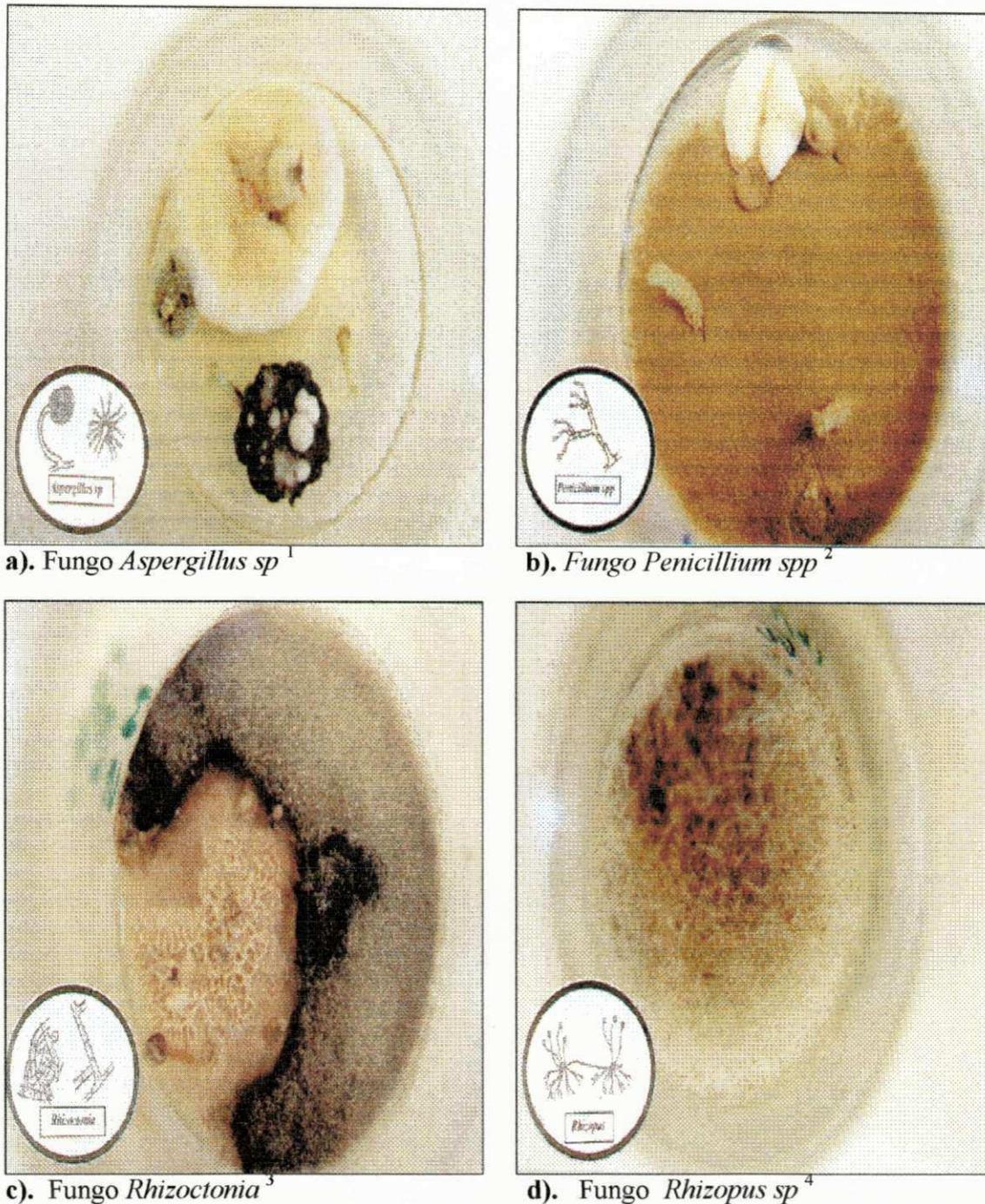
Na Tabela 9, estão as percentagens de frascos contaminados com os respectivos fungos. Observa-se nessa tabela que a maior incidência de fungos é do gênero *Aspergillus sp* (*Aspergillus niger* e o *A. flavus*), sendo que a semente de gergelim,

variedade Seridó-1, é a mais contaminada por todos os patógenos identificados e a variedade CNPA-G3 é onde se verifica a menor incidência desses fungos.

Os fungos encontrados induzem a formação de várias doenças, no entanto, provocam danos as sementes, por exemplo, (*Aspergillus e Penicillium*) são fungos característicos ao processo de armazenamento e provoca: a) decréscimo de germinação; b) descoloração de parte ou de toda a semente; c) aquecimento da massa; d) transformações bioquímicas; e) produção de toxinas; f) modificações celulares entre outros. (SOAVE, 1987). Segundo COOK, (1981) os fungos *Rhizopus* e a *Rhizoctonia*, são microorganismos que conduzem ao apodrecimento das raízes e ao tombamento das plantas.

Assim, de acordo com NEEGAARD (1979) a doença causada por fungos é um fator que interfere com as funções ou com as estruturas da planta, podendo ser de natureza biogênica e fisiogênica, quando causada por fatores bióticos e abióticos, respectivamente

Diversos fatores podem ter contribuído para o desenvolvimento de fungos, os resultados obtidos, podem ter sido decorrente do período de colheita ou armazenagem das sementes, o que favorece ao aparecimento de determinados fungos.



a). Fungo *Aspergillus sp*¹

b). Fungo *Penicillium spp*²

c). Fungo *Rhizoctonia*³

d). Fungo *Rhizopus sp*⁴

FIGURA 2. Fungos identificados no meio de cultivo MS.

¹ Os fungos da espécie *aspergillus*, são conidióforos longos terminando em projeção tipo clava, lembrando baquetas. Massa de conídios pode apresentar coloração variada; saprófitas comuns em produtos armazenados, (GALLI, 1978).

² Os fungos da espécie *penicillium* apresentam conidióforos longos, ramificado-se na parte terminal, conidióforo (conjunto lembra vassoura). Massa de conídios com coloração esverdeada, podridão de frutos cítricos. (GALLI, 1978).

³ Os fungos da espécie *rhizoctonia*, são escleródios de forma irregular, de coloração marrom escura. Hifas levemente pigmentadas de marrom apresentando ramificações ortogonais com uma construção na base e septos distintos. Causa podridão de raiz e colo e tombamento de várias plantas, (SOAVE, 1978).

⁴ Os fungos da espécie *rhizopus*, são micélios que diferenciam de forma vegetativa incolor e uma região área colorida. Os zigotos são produzidos por união de dois micélios (*Triticum de rhizopus saito*) que causam uma putrefação semelhante de batata doce que contém considerada produção de amilase, (STEVENS, 1925).

TABELA 9. Patógenos (fungos), presentes em 3 variedades de gergelim, após teste fitopatológico, encontrados em meio de cultivo MS.

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	F		
		VARIEDADES		
Tratamentos	3	CNPA-G 2 46,03 **	CNPA - G 3 41,65 **	Seridó-1 133,97 **
Resíduo	12			
PORCENTAGENS POR AMOSTRA CONTAMINADA				
PATÓGENOS		CNPA-G 2	CNPA-G 3	Seridó-1
Aspergillus sp		18,83 a	14,33 a	22,50 a
Penicillium spp		18,06 a	8,63 b	19,74 a
Rhizoctonia		12,42 b	6,17 b	15,22 b
Rhizopus sp		7,76 c	6,17 b	9,79 c
MEDIDAS ESTATÍSTICAS				
DMS		3,24	2,50	4,07
CV%		10,81	13,47	11,53

As medidas seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a nível de 5% pelo teste de Tukey.

4.2 INDUÇÃO A ORGANOGÊNESE

Os ensaios de indução a organogênese foram realizados em 2 etapas: A 1ª Etapa consistiu no ensaio de indução a organogênese “sem” pré-tratamento das sementes e a 2ª Etapa foi realizada “com” pré-tratamento das sementes, lembrando que o pré-tratamento consistiu na imersão das sementes em meio (MS - líquido) por período de 72 horas. O objetivo dos ensaios consistiu no super brotamento das gemas axilares dormentes, induzidas a partir de plântulas germinadas *in vitro*.

4.2.1 ENSAIO “SEM” O PRÉ -TRATAMENTO DAS SEMENTES

Na Tabela 10 encontra-se a análise de variância simplificada para as variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) na Indução a organogênese utilizando-se o meio de cultivo MS, sendo que as sementes não foram pré-tratadas com o meio (MS - líquido) e o parâmetro de avaliação foi o número de explantes vivos. Nessa Tabela observa-se que existem diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade pelo teste de F apenas para o fator variedade.

Na Tabela 11 está a análise de variância simplificada para as variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) submetidas ao mesmo tratamento anterior, sendo que, neste caso o parâmetro de avaliação foi o número de brotos por explante (B/E).

Nessa Tabela 11 constata-se que existem diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade de teste de F para o fator variedade, meio de cultivo e a interação entre esses dois fatores.

TABELA 10. Análise e variância das variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 utilizando-se o meio de cultivo MS na indução a organogênese “sem” o pré-tratamento das sementes (MS-líquido), tendo como parâmetro de avaliação o número de explantes vivos (E.V).

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Variedade	2	0,34	0,17	7,92 **
Meio de Cultivo	9	0,27	0,03	1,37 ns
Variedade x Meio de cultivo	18	0,46	0,03	1,18 ns
Resíduo	420	9,03	0,02	
Total	449	10,09		

Dados transformados em $\sqrt{x+1}$;

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade;
ns Não significativo.

TABELA 11. Análise e variância das variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 e o meio de cultivo, MS na indução a organogênese “sem” o pré-tratamento das sementes (MS-líquido), utilizando a variável número de brotos por explantes (B/E).

FONTE DE VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Variedade	2	3,71	1,85	70,50 **
Meio de Cultivo	9	0,97	0,11	4,09 **
Variedade x M. de cultivo	18	2,26	0,13	4,77 **
Residuo	420	11,04	0,03	
Total	449	17,97		

Dados transformados em $\sqrt{x + 1}$;

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade;

Na Tabela 12 pode-se observar que a sobrevivência mediana do número de explantes e do número de brotos por explantes, foram significativamente diferentes para as variedades estudadas. A variedade CNPA-G3 foi o que apresentou o melhor desempenho de sobrevivência, diferindo das outras duas que se igualaram estatisticamente. O mesmo não se passou com o número de brotos por explantes (B/E), onde entre variedades de gergelim, a CNPA-G3 apresentou a segunda maior média, tendo sido suplantada pela variedade Seridó – 1 e tendo sido superior a CNPA-G2. Tal comportamento se teve, provavelmente ao alto índice do regulador de crescimento BAP (8mg.L^{-1}).

Ainda na Tabela 12 pode-se destacar que não existem diferenças estatísticas entre os meios de cultivo, para os explantes vivos (E.V), significando dizer que seu desenvolvimento foi homogêneo em todos os meios.

Com relação ao nº de brotos por explante (B/E) observa-se que não houveram diferenças estatísticas significativas a nível de 5% de probabilidade entre os meios que apresentaram o BAP com (8mg.L^{-1}) e o 2iP com (10mg.L^{-1}), como reguladores de crescimento.

TABELA 12. Resultados de sobrevivência e número de brotos por explante de três variedades de gergelim segundo a concentração de reguladores de crescimento adicionados ao meio MS, na indução a organogênese “sem” o pré-tratamento das sementes (MS-líquido).

VARIEDADES			(E . V)	(B / E)
Seridó-1			1,90 b	2,09 a
CNPA-G2			1,88 b	1,87 c
CNPA-G3			1,95 a	1,97 b
DMS			0,04	0,10
Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)			(E . V)	(B / E)
BAP	ZiP	KIN		
			1,91 a	1,91 bc
6			1,91 a	1,96 abc
8			1,93 a	2,04 a
10			1,89 a	2,00 ab
	6		1,87 a	1,99 abc
	8		1,89 a	1,98 abc
	10		1,97 a	2,03 a
		6	1,91 a	1,99 abc
		8	1,93 a	1,98 abc
		10	1,89 a	1,89 c
DMS			0,04	0,11
MEDIDAS			ESTATÍSTICAS	
MG			1,91	1,98
CV (%)			7,67	8,20

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

E.V (Explantos Vivos); B E (nº de brotos por explante).

Dados transformados em $\sqrt{x + 1}$;

Reguladores de Crescimento: BAP (6-bencilaminopurina); ZiP (6- γ - γ -dimetilaminopurina e KIN (6-furfurilaminopurina - Kincina).

Na Tabela 13 verifica-se que em relação aos explantes vivos (E.V) no desenvolvimento das gemas axilares dormentes não houve diferenças estatísticas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, com exceção a concentração de BAP (10mg.L⁻¹) da variedade Seridó-1 e ZiP (6mg.L⁻¹) para a variedade CNPA-G2 que apresentaram índices mais baixos em relação aos outros meios. Ainda em relação a Tabela 13 observa-se que variedade CNPA-G3 teve os maiores índices de explantes vivos embora não sejam estatisticamente diferentes das outras duas variedades estudadas.

TABELA 13. Análise comparativa entre as variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 e o meio de cultivo, MS, na indução a organogênese com avaliação de gemas axilares dormentes; sendo a variável explantes vivos (E.V).

Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)			V A R I E D A D E S					
			Seridó-1		CNPA-G2		CNPA-G3	
BAP	2iP	KIN	EXPLANTES VIVOS (E.V)					
			1,90 a	A	1,88 a	A	1,96 a	A
6			1,92 a	A	1,86 a	A	1,96 a	A
8			1,94 a	A	1,86 a	A	1,98 a	A
10			1,82 b	B	1,88 a	A	1,98 a	A
	6		1,92 a	A	1,82 b	A	1,88 a	A
	8		1,88 a	A	1,88 a	A	1,92 a	A
	10		1,92 a	A	2,00 a	A	1,98 a	A
		6	1,92 a	A	1,84 a	A	1,96 a	A
		8	1,90 a	A	1,96 a	A	1,92 a	A
		10	1,90 a	A	1,84 a	A	1,94 a	A

DMS : Coluna = 0.17 (letras minúsculas);

DMS : Linha = 0.13 (letras maiúsculas).

Reguladores de Crescimento: BAP (6-bencilaminopurina); 2iP (6-γ-γ -dimetilaminopurina e KIN (6-furfurilaminopurina - Kintina).

Na Tabela 14 podemos observar que a variedade CNPA – G3 não apresentou diferenças estatísticas em relação aos meios, no entanto na variedade Seridó-1 observa-se que esta variedade obteve um maior número de brotos por explante, do que as variedades CNPA-G2 e CNPA-G3 evidenciando, o processo de super brotamento nesta variedade.

TABELA 14. Análise comparativa entre as variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 e o meio de cultivo, MS, na indução a organogênese com avaliação de gemas axilares dormentes; sendo a variável n°. de brotos por explante (B/E).

Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)			V A R I E D A D E S					
			Seridó-1		CNPA-G2		CNPA-G3	
BAP	2iP	KIN	N° DE BROTOS POR EXPLANTE (B/E)					
			1,87 bc	A	1,88 a	A	1,96 a	A
6			2,07 b	A	1,86 a	B	1,96 a	A
8			2,23 a	A	1,92 a	B	1,98 a	B
10			2,27 a	A	1,80 b	C	1,94 a	B
	6		2,16 a	A	1,88 a	C	1,92 a	B
	8		2,19 a	A	1,80 b	C	1,94 a	B
	10		2,12 a	A	2,00 a	A	1,98 a	A
		6	2,15 a	A	1,84 a	C	1,98 a	B
		8	2,04 b	A	1,90 a	A	2,00 a	A
		10	1,85 c	A	1,84 a	A	1,98 a	A

DMS / Coluna = 0,19 (letras minúsculas);

DMS / Linha = 0,14 (letras maiúsculas).

Reguladores de Crescimento: BAP (6-bencilaminopurina); 2iP (6-γ-γ-dimetilaminopurina e KIN (6-furfurilaminopurina - Kinetina).

A Figura 3, a seguir evidencia o processo de super brotamento nas variedades de gergelim após desenvolvimento de gemas axilares dormentes, “sem” o pré-tratamento das sementes (MS-líquido).

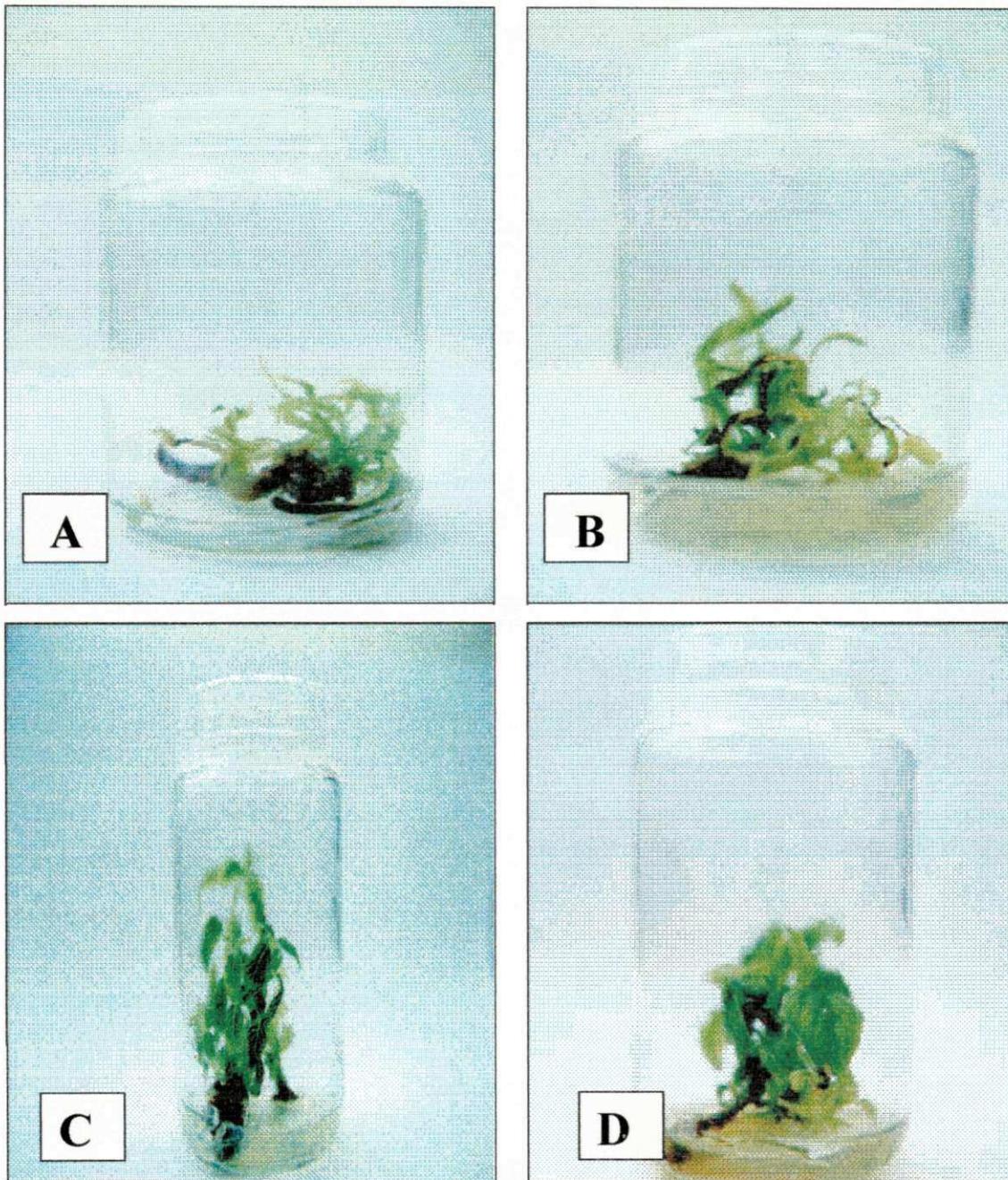


Foto: Sergio Cobel- Embrapa Algodão

FIGURA 3 . Super brotamento de gergelim, variedades Seridó-1 (A e B), CNPA-G2 (C) e CNPA-G3 (D); após indução a organogênese “sem” o pré-tratamento das sementes (MS-líquido).

4.2.2 ENSAIO “COM” O PRÉ-TRATAMENTO DAS SEMENTES

A 2ª Etapa do trabalho de indução a organogênese foi o ensaio “com” o pré-tratamento das sementes que consistia na imersão das sementes em meio (MS -líquido) por período de 72 horas. E o como objetivo dessa etapa foi induzir o super brotamento das gemas axilares dormentes, a partir de plântulas germinadas *in vitro*.

Nas Tabelas 15 e 16 encontram-se as análises de variância simplificadas para as variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3), submetidas a diferentes meios de cultivo de indução a organogênese, no desenvolvimento de gemas axilares dormentes (super brotamento), “com” o pré-tratamento das sementes, onde foram avaliados os Explantes Vivos (E.V) e o Número de Brotos por Explantes (B/E), respectivamente.

Nessas tabelas observa-se que existem diferenças significativas para os fatores variedades e meio de cultivo, além das interações entre os fatores, quanto as variáveis explantes vivos (E.V) e o número de brotos por explante (B/E), Tabelas 15 e 16 respectivamente.

TABELA 15. Análise de variância das variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) e o meio de cultivo, MS na indução a organogênese “com” o pré-tratamento das sementes (MS-líquido), utilizando a variável explantes vivos (E.V).

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Variedade	2	0,37	0,19	6,75 **
Meio de Cultivo	9	1,08	0,12	4,40 **
Variedade x Meio de cultivo	18	3,81	0,21	7,74 **
Residuo	420	11,49	0,03	
Total	449	16,75		

Dados transformados em $\sqrt{x+1}$;

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade;

TABELA 16. Análise e variância das variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) e o meio de cultivo, MS na indução a organogênese "com" o pré-tratamento das sementes (MS-líquido), utilizando a variável número de brotos por explantes (B/E).

FONTE DE VARIAÇÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Variedade	2	5,57	2,79	17,78 **
Meio de Cultivo	9	47,64	5,29	33,79 **
Var. x Meio de cultivo	18	7,84	0,43	2,78 **
Resíduo	420	65,79	0,16	
Total	449	126,84		

Dados transformados em $\sqrt{x+1}$;

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade;

ns Não significativo.

Na Tabela 17 verifica-se que, em relação aos valores médios entre as variedades de gergelim Seridó-1 e CNPA-G3 não houveram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey nos fatores de explantes vivos e nº de brotos por explante. Quanto aos meios, observa-se que não existiram diferenças significativas entre os meios com BAP (6-bencilaminopurina) e KIN (6-furfurilaminopurina – Kinetina), nas concentrações de 6 a 10 mg.L⁻¹ para os explantes vivos (E.V), entretanto, deve-se salientar que nas concentrações de BAP com 8 e 10mg.L⁻¹ houve um maior desenvolvimento no nº de brotos por explante (B/E), no super brotamento de gemas axilares dormentes.

Ainda em relação a Tabela 17 observa-se que não houveram diferenças significativas entre os reguladores de crescimento 2iP e KIN em todas as concentrações para o Número de Brotos por Explante (B/E).

TABELA 17. Resultados de sobrevivência e número de brotos por explante de três variedades de gergelim segundo a concentração de reguladores de crescimento adicionados ao meio MS, na indução a organogênese "com" o pré-tratamento das sementes, (MS - líquido).

VARIETADES			(E . V)	(B / E)
Seridó-1			1,87 a	2,01 a
CNPA-G2			1,82 b	1,83 b
CNPA-G3			1,87 a	2,09 a
DMS			0,05	0,11
Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)			(E . V)	(B / E)
BAP	2iP	KIN		
			1,90 ab	1,70 c
6			1,93 a	2,28 b
8			1,88 abc	2,63 a
10			1,92 a	2,45 ab
	6		1,85 abc	1,83 c
	8		1,77 c	1,85 c
	10		1,79 bc	1,77 c
		6	1,89 ab	1,75 c
		8	1,83 abc	1,75 c
		10	1,85 abc	1,74 c
DMS			0,11	0,27
MEDIDAS			ESTATISTICAS	
MG			1,86	1,98
CV (%)			8,89	20,05

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

E.V (Explantos Vivos); B/E (nº de brotos por explante);

Dados transformados em $\sqrt{x + 1}$;

Reguladores de Crescimento: BAP (6-bencilaminopurina); 2iP (6- γ - γ -dimetilaminopurina e KIN (6-furfurilaminopurina - Kinazina).

Na análise comparativa entre as variedades de gergelim nos diferentes meios de cultivo, Tabela 18, verifica-se que a variedade CNPA-G3 foi a que teve o melhor desenvolvimento dos explantes vivos quando comparados com as outras variedades ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey, embora, em alguns casos, essas diferenças com relação as outras variedades, não sejam significativas.

Observa-se também, na Tabela 18, que para a variedade CNPA-G3 não existem diferenças significativas no número de explantes vivos para todos os reguladores de crescimento utilizados e suas diferentes concentrações, no entanto, na variedade Seridó-1, essas diferenças significativas no nº de explantes vivos não existem quando se utiliza os reguladores de BAP (6-bencilaminopurina) e 2iP (6- γ - γ dimetilamino purina) nas

concentrações de 6, 8 e 10 mg.L⁻¹ e para a variedade CNPA-G2 quando se utiliza os reguladores BAP e KIN (kinetina) nas concentrações de 6, 8 e 10 mg.L⁻¹.

TABELA 18. Análise comparativa entre as variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) e o meio de cultivo, MS, na indução a organogênese “com” o pré-tratamento das sementes (MS-líquido), na avaliação de gemas axilares dormentes, sendo a variável explantes vivos (E.V).

Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)			V A R I E D A D E S					
			Seridó-1		CNPA-G2		CNPA-G3	
BAP	2iP	KIN	EXPLANTES VIVOS (E.V)					
			2,00 a	A	1,86 a	AB	1,84 a	C
6			1,98 a	A	1,92 a	A	1,88 a	A
8			1,94 a	A	1,82 a	A	1,88 a	A
10			1,96 a	A	1,94 a	A	1,86 a	A
	6		1,96 a	A	1,68 b	B	1,90 a	A
	8		1,84 a	A	1,64 b	B	1,84 a	A
	10		1,90 a	A	1,60 c	B	1,88 a	A
		6	1,75 b	B	1,99 a	A	1,94 a	A
		8	1,72 b	B	1,84 a	A	1,94 a	A
		10	1,64 c	B	1,94 a	A	1,96 a	A

DMS : Coluna = 0,19 (letras minúsculas).

DMS : Linha = 0,14 (letras maiúsculas).

Reguladores de crescimento: BAP (6-bencilaminopurina); 2iP (6-γ-γ -dimetilaminopurina e KIN (6-furfurilaminopurina - Kinetina).

Na Tabela 19, em uma análise comparativa entre as variedades de gergelim, utilizando-se diferentes reguladores de crescimento no meio de cultivo, constata-se que a variedade CNPA-G3 apresentou o maior número de brotos por explante após o ensaio “com” o pré-tratamento das sementes (MS-líquido), embora em grande parte desses casos essas diferenças não sejam estatisticamente significativas. Em relação aos meios de cultivo, o BAP (6-bencilaminopurina) não apresentou diferenças significativas para todas as variedades, nas concentrações de 6, 8 e 10mg.L⁻¹, observando-se um desenvolvimento maior no número de brotos por explante, evidenciando o BAP como o melhor regulador de crescimento no desenvolvimento de gemas axilares, quando comparado com o 2iP e o KIN.

Ainda em relação a Tabela 19, observa-se que a variedade CNPA-G2 não apresentou diferenças significativas, quando se utilizou os reguladores de crescimento BAP e 2iP nas concentrações de 6, 8 e 10 mg.L⁻¹.

TABELA 19. Análise comparativa entre as variedades de gergelim Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 e o meio de cultivo, MS, na indução a organogênese “com” o pré-tratamento das sementes (MS-líquido) na avaliação de gemas axilares dormentes; sendo a variável nº de brotos por explantes (B.E)

Reguladores de crescimento (mg.L ⁻¹)			V A R I E D A D E S					
			Seridó-1		CNPA-G2		CNPA-G3	
BAP	2iP	KIN	Nº DE BROTOS POR EXPLANTE					
			1,76 c A		1,59 b A		1,74 c A	
6			2,19 a B		2,06 a C		2,59 a A	
8			2,73 a A		2,14 a B		3,01 a A	
10			2,41 a B		2,12 a C		2,81 a A	
	6		1,91 b A		1,82 a A		1,75 c A	
	8		1,91 b A		1,74 a A		1,90 b A	
	10		1,90 b A		1,72 a A		1,70 c A	
		6	1,76 c A		1,65 b A		1,83 b A	
		8	1,78 c A		1,70 a A		1,76 c A	
		10	1,70 c A		1,70 a A		1,82 b A	

DMS / Coluna = 0,46 (letras minúsculas);

DMS / Linha = 0,34 (letras maiúsculas).

Na Figura 4 encontra-se o processo de super brotamento nas variedades de gergelim com pré-tratamento das sementes (MS - líquido) e após desenvolvimento de gemas axilares dormentes.

Na Figura 5 pode-se observar o desenvolvimento precoce das gemas axilares dormentes das variedades de gergelim, após inoculação em meio MS por um período de oito semanas, onde não ocorreu super brotamento das gemas, ressaltando o desenvolvimento precoce das gemas quando comparado com o super brotamento.

Com ênfase a indução a organogênese em fase de super brotamento em gemas axilares, trabalhos similares foram realizados por CASTRO (1995), que obteve segmentos nodais em cultivares de batata doce (*Ipomoea batatas* L.), onde os ápices caulinares inoculados em meio MS apresentaram desenvolvimento em 4 variedades de batata-doce (RC1.8, MFT, TR3 473 e Arroba).

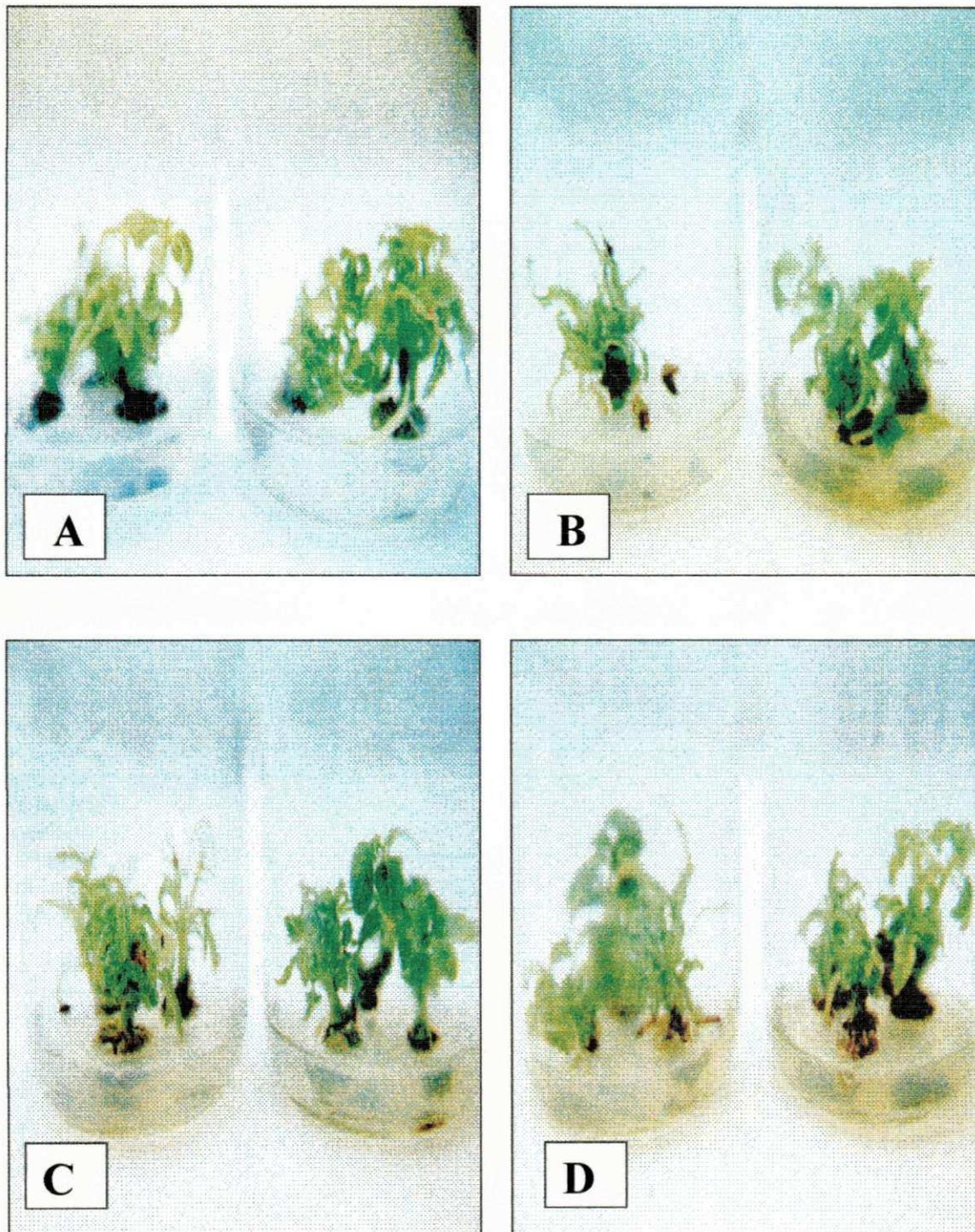


Foto: Sergio Cobel – Embrapa Algodão

FIGURA 4. Super brotamento do gergelim, variedades Seridó-1 (A), CNPA G2 (B e C) e CNPA-G3 (D), após indução a organogênese “com” o pré-tratamento das sementes (MS-líquido).

4.3 INDUÇÃO A CALOGÊNESE

O ensaio de calogênese tem como objetivo a indução de material vegetal hipocótilo de plântulas germinadas *in vitro*, para a obtenção de calos embrionários, com a finalidade de utiliza-los posteriormente na indução de embriões.

Para a realização deste ensaio de indução a calogênese, foram utilizados como reguladores de crescimento: BAP (6-bencilaminopurina); 2,4-D (diclorofenoacético) e NAA (ácido α -naftalen-acético) e a água de côco como substância natural.

4.3.1 EFEITO DA CALOGÊNESE

Nos gráficos representativos de indução a calogênese, verifica-se os efeitos dos reguladores de crescimento no desenvolvimento de calos embrionários, para as três variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3). Nesses gráficos observa-se que a utilização dos reguladores de crescimento BAP(mg.L⁻¹), NAA(mg.L⁻¹), 2,4-D (mg.L⁻¹) e a água de côco (%), induziram a formação de calos.

No gráfico 7 pode-se observar o maior desenvolvimento de calos na cultivar de gergelim variedade CNPA-G3, com a atuação dos reguladores de crescimento BAP (6-bencilaminopurina) e NAA (ácido α -naftalen-acético), nas concentrações de BAP (2 mg.L⁻¹) e NAA (0,05 mg.L⁻¹), evidenciando-se um maior incremento de peso quando comparado com as outras variedades.

Ainda em relação ao gráfico 7 verifica-se que a variedade Seridó-1 foi a que obteve o menor incremento de peso, todavia todas as variedades por um período de 60 dias desenvolveram calos a partir do hipocótilo de plântulas de gergelim germinadas *in vitro*.

Pode-se observar também, nesse gráfico, que a variedade CNPA-G2 apresentou maior incremento de peso em desenvolvimento de calos quando o meio básico MS foi suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BAP.

No processo de indução a calogênese ARELLO em (1991) obteve calos com emissão de brotos em *Gerbera jamesonii* nas variedades *Appel Bloesen* e *Marleen*, quando inoculados em meio "MS".

No Gráfico 8 observa-se um maior desenvolvimento de calos na variedade Seridó-1 com a atuação dos reguladores de crescimento 2,4D (diclorofenoacético) e água de côco, nas concentração de (3,0 mg.L⁻¹) e 15% de água de côco, evidenciando um maior incremento de peso, quando comparado com as outras variedades.

Ainda em relação ao Gráfico 8 verifica-se que a variedade CNPA-G2 obteve o menor incremento de peso, quando comparado com as demais variedades, podendo-se observar, também nesse gráfico, que a variedade CNPA-G3 apresentou menor incremento de peso com a concentração de 3,0 mg.L⁻¹ do regulador de crescimento 2,4D, enquanto que para a concentração de 2,5 mg.L⁻¹ do mesmo regulador obteve um maior desenvolvimento de calos.

MATSUMOTO (1991) obteve calos embrionários em meio MS quando suplementado com altas concentrações de ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D). A indução de embriões somáticos foi mais eficiente no meio de cultura, suplementado com (2,4-D) e (GA₃), onde o número de embriões somáticos aumentou quando suplementado com 1mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) ao meio.

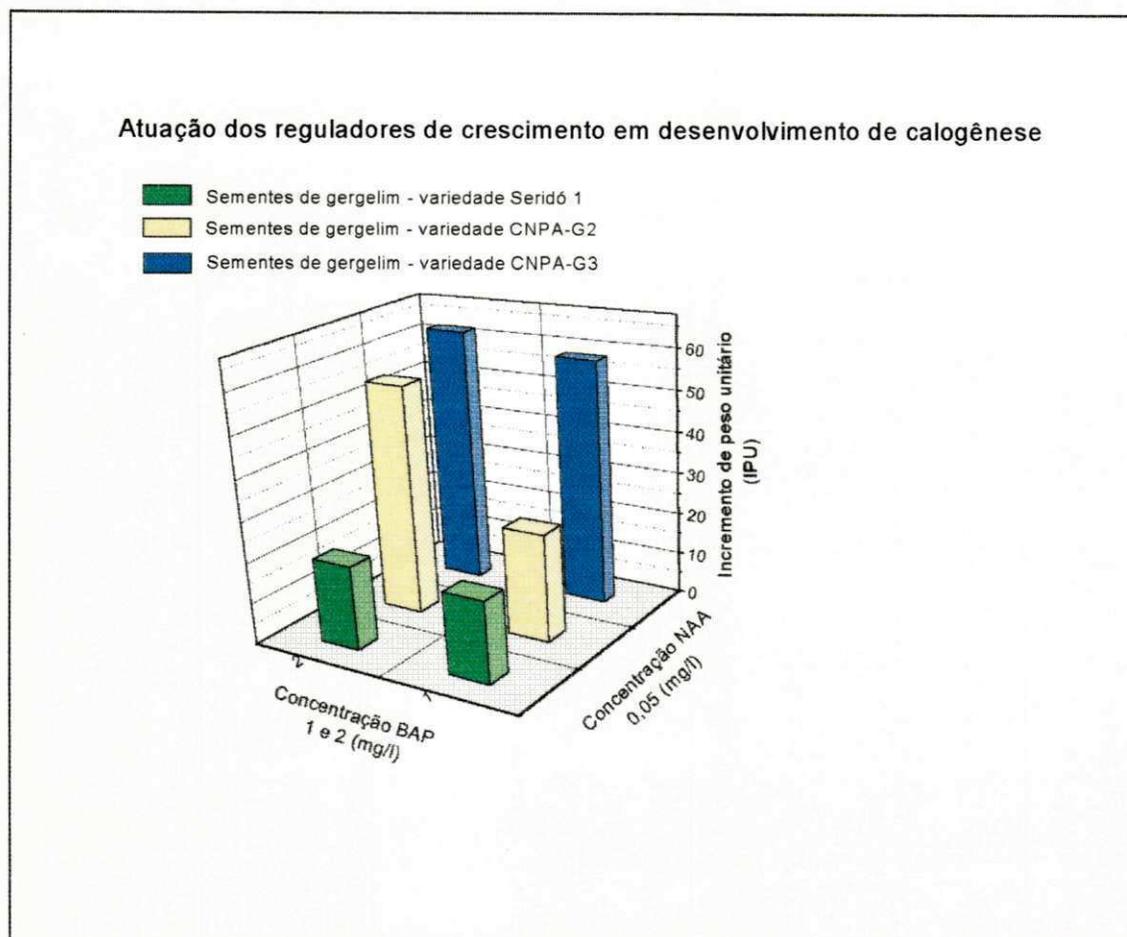


GRÁFICO 7. Efeito da adição de reguladores de crescimento BAP (1 e 2 mg.L⁻¹) e NAA (0,05 mg.L⁻¹) ao meio básico MS sobre o incremento de peso do hipocótilo de três variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3), após oito semanas de cultivo.

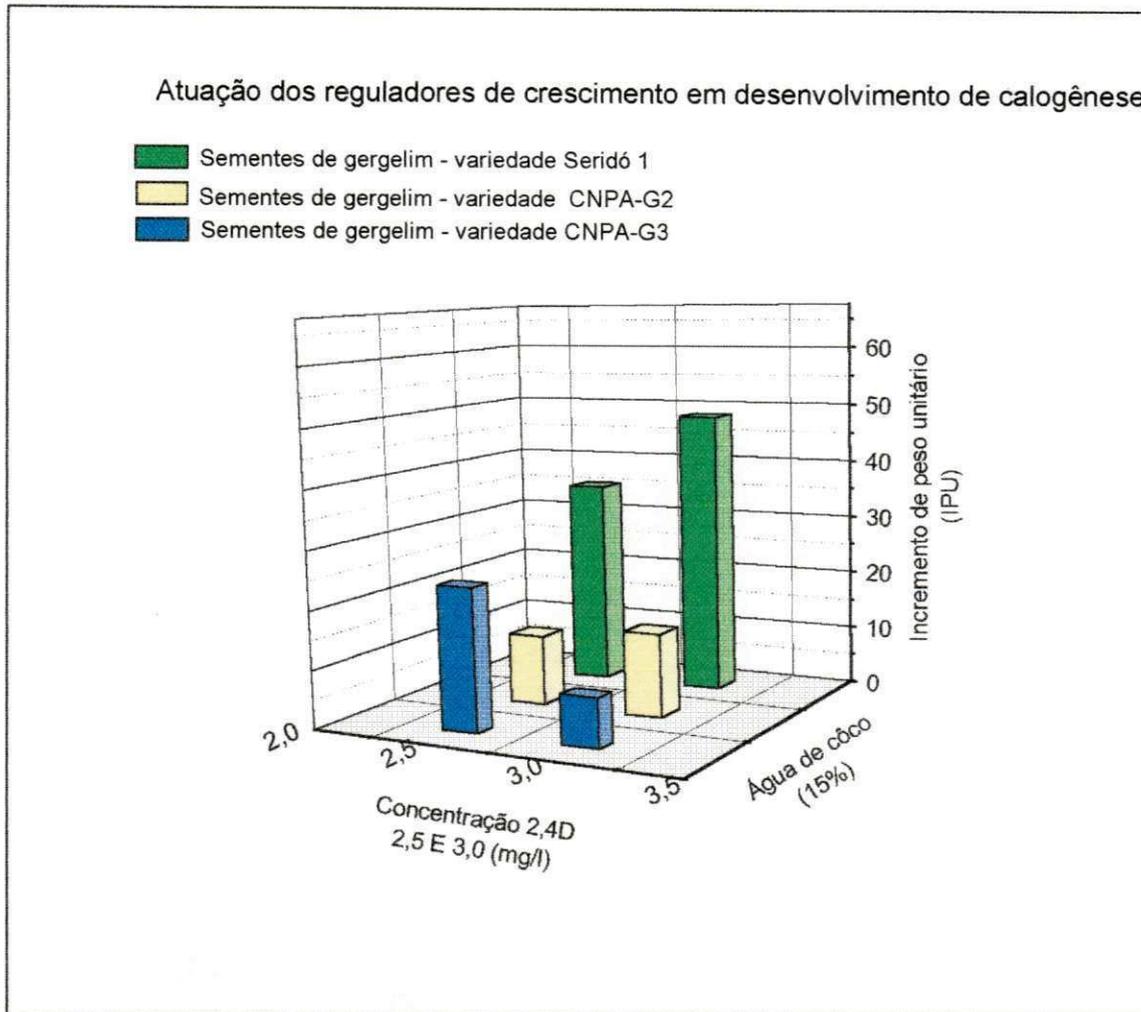


GRÁFICO 8. Efeito da adição de reguladores de crescimento 2,4D (2,5 e 3,0 mg.L⁻¹) e água de côco (15%) no meio básico MS sobre o incremento de peso do hipocótilo de três variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) após oito semanas de cultivo.

Na Figura 6, encontra-se formação de calos embrionários desenvolvidos com a atuação dos reguladores de crescimento BAP, NAA, 2,4-D e Água de côco, a partir de explantes de hipocótilo em cultivar de gergelim. Pode-se observar nessa figura, que os calos proeminentes da formação com reguladores de crescimento BAP e NAA apresentaram-se “friáveis” com coloração de verde para verde-claro, enquanto que os calos com 2,4-D e água de côco apresentaram “moles” com coloração cinza-verde.

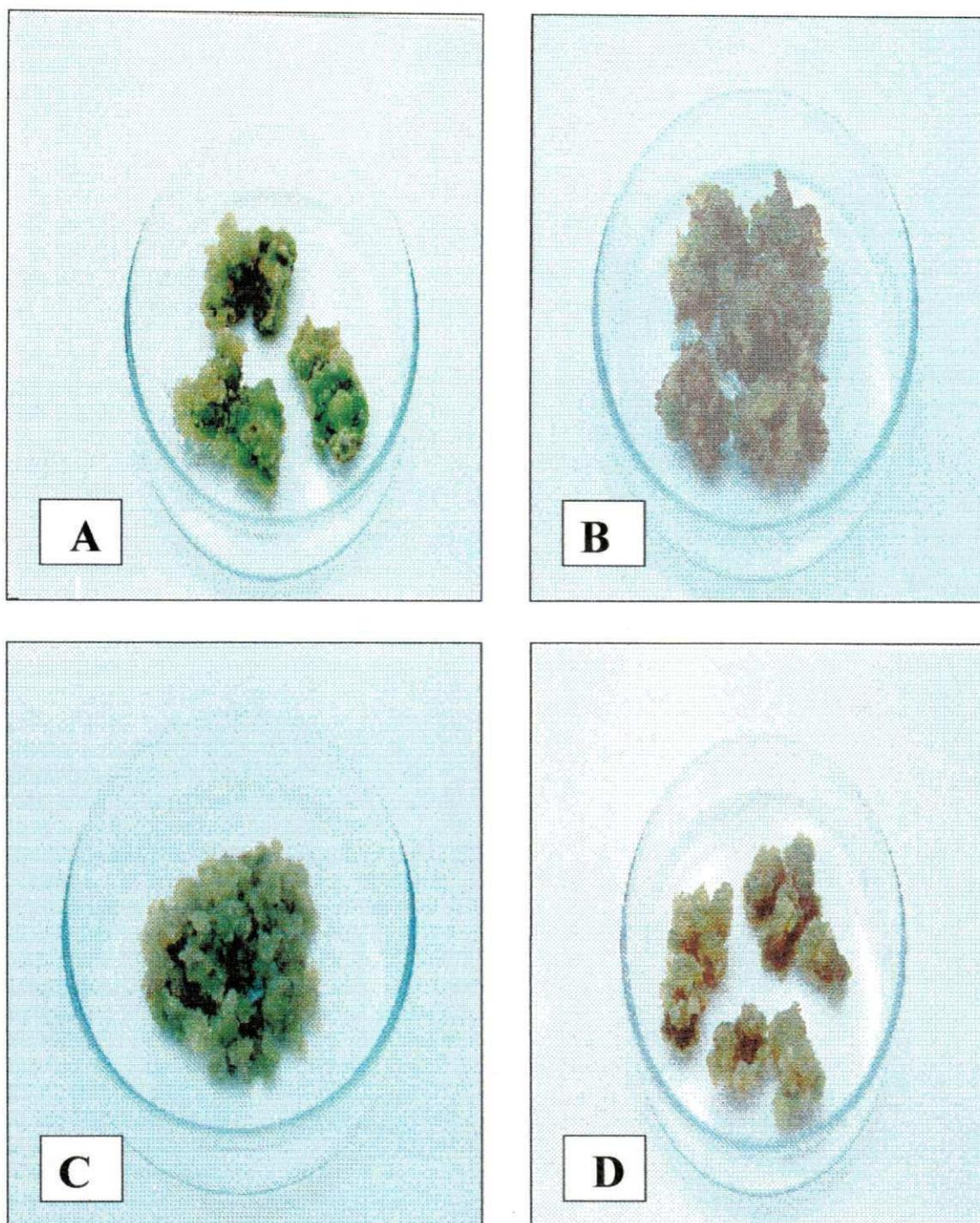


Foto: Sergio Cobel – Embrapa Algodão

FIGURA 6. Desenvolvimento de calos embrionários das variedades de gergelim Seridó-1 (A e B), CNPA-G2 (C) e CNPA-G3 (D), em meio básico MS.

I.5 CONCLUSÕES

ASSEPSIA DAS SEMENTES:

Mediante os resultados obtidos concluiu-se que:

- I. A variedade CNPA-G2 mostrou-se superior as demais variedades apresentando os maiores percentuais de germinação e vigor não diferindo da testemunha;
- II. A assepsia das sementes de gergelim, variedade CNPA-G2, pode ser feita com a concentração de hipoclorito de sódio variando entre 10 e 40%, indicando – se 10% por ser o valor mais econômico, sendo que o meio de germinação recomendado deve ser o papel germitest, (PG);
- III. A concentração de hipoclorito que deve ser recomendado para fazer a assepsia da semente de gergelim, variedade CNPA-G3, é de 20%, e o melhor meio de germinação das sementes é o papel germitest (PG) em detrimento do meio de cultivo MS;
- IV. Quanto a assepsia da semente de gergelim variedade Seridó-1 a concentração de hipoclorito de sódio que causa menor danos as sementes é na ordem de 20% e o meio de germinação recomendado é o meio MS;
- V. Em relação à análise fitopatológica concluiu-se que os fungos encontrados foram *Aspergillus sp*, *Penicillium spp*, *Rhizoctonia* e o *Rhizopus sp* sendo que a variedade Seridó-1 apresentou maior incidência de contaminação para todos encontrados, evidenciando a maior presença do *Aspergillus sp* em todas as variedades, entretanto a variedade CNPA-G3 foi a que apresentou menor incidência de fungos.

NA INDUÇÃO A ORGANOGÊNESE SOMÁTICA REALIZADA CONCLUI-SE QUE:

“SEM” O PRÉ - TRATAMENTO DAS SEMENTES.

- I. A variedade CNPA-G3 quanto aos Explantes Vivos (E.V) apresentou os maiores índices de desenvolvimento, ou seja, maior incidência de explantes viáveis ao brotamento quando comparada com as outras variedades, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.
- II. A variedade Seridó-1 foi que apresentou maior N° de brotos por explantes (B/E), estatisticamente superior as outras, ou seja, foi encontrado maior número de brotos por cada explante vivo, ocasionando um processo de super brotamento nesta fase.

“COM” O PRÉ - TRATAMENTO DAS SEMENTES.

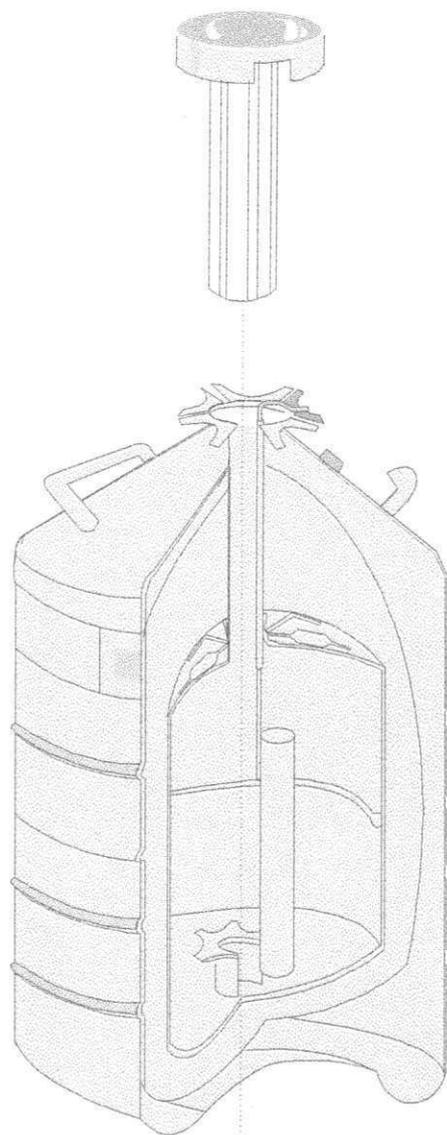
- III. Não houve diferenças estatísticas entre as variedades (Seridó1 e CNPA-G3) quanto aos Explantes Vivos (E.V), ou seja, as variedades envolvidas apresentaram desenvolvimento semelhantes na obtenção de explantes vivos por frasco;
- IV. Em relação ao N° de brotos por explante, também não houve diferença estatística entre as variedades Seridó-1 e CNPA-G3, ou seja, ambas apresentaram processo de desenvolvimento evidenciando super brotamento, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.
- V. Em relação aos processos realizados: “sem” e “com” pré-tratamento das sementes (MS líquido), houve uma incidência muito maior de brotos por explantes vivos quando realizado o pré - tratamento das sementes (MS líquido).

NA INDUÇÃO A CALOGÊNESE CONCLUI-SE QUE:

- VI. No desenvolvimento de calogênese, utilizando explantes de hipocótilo de plântulas germinadas *in vitro* em cultivar de gergelim, ocorreu maior formação de calos em meio MS, quando suplementado com os reguladores de crescimento BAP (6-bencilaminopurina) e NAA (ácido α -nafatalenoacético), em todas as variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) estudadas.

CAPITULO II

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE GERGELIM



CAPÍTULO II - CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE GERGELIM

II. 1 INTRODUÇÃO

A importância da semente é notória desde os tempos pré-históricos, quando foi a grande causadora da mudança dos hábitos de homem das cavernas, transformando-o de nômade e caçador em sedentário e agricultor.

Atualmente, a semente não só representa a base da alimentação da maioria da raça humana, como foi transformada pela tecnologia moderna, por meio de seus subprodutos, em subsídios capazes de contribuir com o homem na conquista de espaços interplanetários (LIBERAL, 1980).

O grande sucesso da semente como órgão de perpetuação e de disseminação da espécie vegetal deve-se, provavelmente, a duas características que, reunidas, a tornam um órgão ímpar no reino vegetal. São eles: a capacidade de distribuir a germinação no tempo (pelos mecanismos de dormência) e no espaço pelos mecanismos de dispersão, como espinhos, pêlos, asas, etc. (CARVALHO e NAKAGAWA, 1980).

Existe uma necessidade crescente de preservação do patrimônio genético das sementes para que haja uma melhoria na produtividade, no entanto, para que as sementes possam ser armazenadas com o intuito de preservar os recursos fitogenéticos das plantas, foram estruturados Bancos de Sementes em inúmeros significativos de países, pois os recursos fitogenéticos proporcionam matéria prima para se obter melhores e novas variedades de plantas mediante as técnicas de melhoramento vegetal ou através de engenharia genética.

Com o passar das décadas e mais especificamente no século XX, devido o crescente aumento populacional da humanidade houve a necessidade de preservar o patrimônio genético das sementes com vista a possibilidade de melhoria da produtividade.

Como alternativa ao banco de germoplasma tradicional, tem sido utilizada a criopreservação das sementes, que consiste em conservar as sementes em temperaturas criogênicas a -196°C , por imersão dessas sementes em nitrogênio líquido, a -170°C , utilizando o vapor do nitrogênio. De acordo com PITA VILLAMIL (1997), a preservação das sementes abaixo de -130°C permite que o metabolismo das sementes

seja paralisado, impedindo a sua deterioração. Segundo o mesmo autor, a criopreservação tem se mostrado como um método eficiente, prático e de baixo custo na preservação dos recursos fitogenéticos, além de manter a semente viável por tempo considerado indefinido.

Assim o armazenamento das sementes com o uso do nitrogênio líquido (N_2L) tem o potencial teórico de permitir a "preservação indefinida". Contudo a capacidade das sementes de determinadas espécies de resistir ao resfriamento em nitrogênio líquido a ($-196^\circ C$), sem danos, é o primeiro passo crítico e principal para a aplicação prática desta técnica de preservação. Mais de 120 espécies de representação agrônômica, como legumes, flores, arbustos e espécies de árvores, foram resfriadas em nitrogênio líquido para verificar a existência de perda da viabilidade. Segundo STANWOOD (1980), espécies como linho (*Linum usitatissimum* L.) e gergelim (*Sesamum indicum* L.) parecem ser resistentes aos danos que possam ser provocados quando imersas em nitrogênio líquido.

Para as sementes onde esses danos impedem a sua criopreservação, devido a velocidade de congelamento ser muito rápida, tem-se utilizado alguns crioprotetores que tem como objetivo impedir vários danos como o trincamento das sementes e ocasionando maiores perdas no processo germinativo.

Apesar das vantagens da criopreservação, existem problemas decorrentes da complexidade técnica e biológica do processo de congelamento e descongelamento, portanto, torna-se necessário desenvolver procedimentos específicos para cada tipo de cultura agrícola (ASHWOOD-SMITH, 1985).

Para a criopreservação de sementes, o teor de umidade pode ser um desses problemas, pois o produto quando colocado para congelar com alto teor de umidade a baixas temperaturas, as partículas de água, no interior das sementes, congelam provocando expansões que podem danificar as células, refletindo na qualidade fisiológica do produto. No entanto, se a semente for criopreservada com teores de umidade baixos, podem ocorrer segmentos vazios entre os espaços intercelulares, que antes eram ocupados pelas moléculas de água, que podem provocar trincamentos ou quebras das sementes. Desta forma, torna-se necessário determinar o teor de umidade limite para criopreservação (TULC), que consiste na obtenção do teor, ou teores de

umidade, nos quais a germinação e o vigor das sementes sejam mantidos próximos dos iniciais.

DINIZ (1999), determinou o teor de umidade limite para criopreservação (TULC) de 4 variedades de sementes de milho (BR-451, BR-201, BR-212 e CMS-54), submetidas a 3 dias de armazenagem em nitrogênio líquido, onde concluiu que o teor de umidade limite para criopreservar tais variedades, está em torno de 9% base úmida.

Todavia, em um banco de germoplasma a baixas temperaturas, não só o processo de criopreservação deve ser levado em consideração como também o método de descongelamento, pois quanto mais rápido ocorrer o descongelamento das sementes, melhor a preservação de suas características fisiológicas.

Portanto, diante do conteúdo apresentado, este trabalho teve os seguintes objetivos:

CRIOPRESERVAÇÃO:

- ✓ Determinar o Teor de umidade limite para criopreservação (TULC) das sementes de gergelim;
- ✓ Avaliar a germinação e o vigor de 3 variedades de sementes de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) quando submetidas a temperatura de criopreservação a -196°C “sem” e “com” crioprotetores (Crioprotetor 1 - Envelope de alumínio, Crioprotetor 2 - Tubo polietileno e o Crioprotetor - 3 Amido de milho, como crioprotetor natural.), utilizando duas técnicas de descongelamento (temperatura ambiente a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e ao banho termostatizado a 40°C); após períodos de 5, 30 e 60 dias de armazenamento.

II. 2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GERMINAÇÃO

Para que o processo de germinação ocorra, todas as condições ambientais como: água, temperatura, luz e oxigênio devem ser favoráveis. Segundo ZINK e MENDONÇA (1964), ambientes sujeitos a variações muito acentuadas nas condições atmosféricas são impróprios à conservação do poder germinativo das sementes. Por outro lado, a uniformidade de tais condições mostra-se favorável à manutenção do seu poder germinativo.

CARVALHO e NAKAGAWA (1980) afirmam que do ponto de vista agrônomo, a germinação é o processo que se inicia quando a semente seca é plantada em solo úmido e termina quando a plântula emerge do solo. Desta forma, do ponto de vista fisiológico, a germinação consiste no processo que se inicia com o suprimento de água à semente seca e termina quando o crescimento da plântula se inicia.

A germinação é o reinício do crescimento do embrião paralisado nas fases finais de maturação. Os processos fisiológicos do crescimento exigem atividades metabólicas aceleradas, e a fase inicial de germinação consiste primariamente na ativação daqueles processos pelo aumento do teor de umidade e da atividade respiratória da semente, (POPINIGIS, 1985).

O teste de germinação é a obtenção de informações que permitam determinar o valor das sementes para semeadura e a comparação desse valor em diferentes lotes sendo importante sua padronização (MARCOS FILHO, 1987).

Germinação de sementes em teste de laboratório é a emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo. E para que uma plântula possa continuar seu desenvolvimento até tornar-se uma planta normal, deve apresentar as seguintes estruturas essenciais: sistema radicular (raiz primária, raízes secundárias e em certos casos raízes seminais), parte aérea (hipocótilo, epicótilo, em certas gramíneas, mesocótilo e gemas terminais), cotilédones (um ou mais) e coleóptilo

(em todas as gramíneas). O objetivo final do teste de germinação é obter informações para fins de semeadura e fornecer dados que possam ser usados para comparar o valor de diferentes lotes de sementes, segundo a R.A.S (Regras para Análise de Sementes), (BRASIL, 1992).

2.2 VIGOR

A noção de vigor deve ter surgido nos primórdios da humanidade, provavelmente a partir de um determinado ponto em que o homem tenha começado a ter um contato mais consciente com animais e vegetais. Trata-se o vigor de um fato biológico que se evidencia facilmente aos olhos a partir de uma observação um pouco mais atenta: indivíduos da mesma espécie, animal ou vegetal, apresentam taxas de desenvolvimento diferentes, o que os leva, naturalmente, a uma classificação em “fortes”, “fracos”, etc. (VIEIRA, 1994).

Embora o conceito de vigor tenha sido estabelecido a alguns anos, não existe nenhuma definição que seja aceita universalmente (POPINIGIS, 1979).

O vigor da semente, segundo DELOUCHE (1965) é a soma de todos os atributos da semente, que favorecem o estabelecimento em mantê-la em pé sob condições desfavoráveis, o vigor das sementes cresce a medida que aumenta seu teor de matéria seca, alcançando o máximo no ponto de máximo peso de matéria seca, ou seja, quando atinge sua maturidade fisiológica (POPINIGIS, 1977).

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

O mais importante de todos os fatos determinantes do desenvolvimento do conceito de vigor veio a dar-se, contudo, no 9º Congresso da ISTA, em Washington, EUA. Naquela reunião, tecnologistas de sementes americanos e europeus haviam programado chegar a uma acordo com relação a natureza do substrato a ser usado para o

teste de germinação de sementes. Até aquela época, os laboratórios de análise de sementes americanos davam preferência ao solo para usar como substrato do teste de germinação, ao passo que os europeus preferiam um substrato artificial (VIEIRA, 1994).

A definição do que seja o vigor de sementes foi um dos aspectos em que mais discutiram o próprio Comitê de Vigor e tecnologistas de sementes do mundo todo, não se tendo chegado a uma redação única até hoje. As duas principais associações que congregam tecnologistas de sementes (a ISTA e a AOSA) tem, cada uma, a sua definição. A da ISTA foi adotada em 1977 e a da AOSA em 1980. São elas as seguintes:

ISTA: “Vigor de sementes 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 da plântula” (ISTA, 1981).

AOSA: “Vigor de sementes compreende algumas 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 (AOSA, 1983).

De acordo com VIEIRA e CARVALHO (1994) a altura ou comprimento da planta visa determinar o vigor relativo de um lote de sementes, sendo consideradas as mais vigorosas as que produzem plantas com maiores valores de comprimentos médios da parte aérea. Segundo os autores o peso da matéria seca da planta visa determinar o valor relativo de um lote de sementes, avaliando-se o peso médio da matéria seca da parte aérea das plantas, baseado no princípio de que sementes que produzem plantas com o maior peso médio de matéria seca da parte aérea da planta em sua fase inicial de desenvolvimento, sob condições de campo, são consideradas mais vigorosas.

2.3 CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação em nitrogênio líquido é um método eficiente e prático para a conservação dos recursos fitogenéticos.

MEDEIROS e CAVALLAR (1992) definem criopreservação em nitrogênio líquido como sendo a preservação de materiais biológicos a baixas temperaturas (entre

-160 e -196°C) onde sob essa temperatura todos os processos metabólicos são paralisados e mantido em estado latente, proporcionando conseqüentemente uma preservação indefinida.

De acordo com ASHWOOD e SMITH, (1985), na criopreservação a -196°C o material biológico fica armazenado de maneira estável, nessa temperatura pois todos os processos metabólicos, como respiração e atividade enzimática, são inativados. Assim sendo, pode-se supor que no material armazenado por criopreservação, não ocorrem mudanças significativas em função do tempo. O único dispêndio necessário durante a criopreservação é o reabastecimento com nitrogênio líquido, eliminando, assim os problemas associados à manutenção das culturas (ASHWOOD-SMITH, 1985).

Apesar das vantagens da criopreservação, existem problemas decorrentes da complexidade técnica e biológica do processo de congelamento e descongelamento de produtos. Sistemas distintos de cultura reagem diferentemente à criopreservação, tornando-se necessário desenvolver procedimentos específicos para cada tipo de cultura.

IRIONDO (1992), também estudou a preservação em nitrogênio líquido de várias espécies selvagens e cultiváveis, com diferentes teores de umidade e períodos de exposição. Na maioria das espécies nenhuma diferença significativa foi detectada na porcentagem de germinação das sementes nos diferentes teores de umidade.

WIESNER (1994) pesquisou o armazenamento em nitrogênio líquido de sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.), onde observou-se que as sementes apresentaram-se danificadas quando expostas ao N₂L. Nesse trabalho foram avaliados os efeitos de germinação, viabilidade, cotilédones quebrados, vigor e peso seco.

BHAT (1994) afirma que sementes de *Musa balbisiana* com teor de umidade variando entre 13 e 18% (b.u) sobreviveram a exposição ao nitrogênio líquido. Após o descongelamento ocorreu a germinação em torno de 90% dos embriões, o tegumento da semente foi descoberto sendo a principal barreira para permeabilizar e prevenir a germinação.

CHAUDHURY (1995) pesquisou em sementes de Cardamom com teores de umidade possuindo cerca de 7,7 e 14,3% sendo essas criopreservadas com sucesso por um período de um ano no vapor do nitrogênio líquido a (-150°C), apresentando após descongelamento cerca de 80% de germinação.

MUNIFORD (1979) estudou sementes de limão com baixos teores de umidade (1,2% b.u), e sementes recém colhidas. As sementes recém colhidas morreram através da imersão em nitrogênio líquido. As sementes com tegumento não mostraram nenhuma mudança em porcentagens de germinação após o congelamento, mas sementes sem tegumento apresentaram os melhores resultados, embora se tenha observado redução na germinação que foi atribuído aos danos mecânicos.

MEDEIROS e CAVALLARI (1990) realizaram estudos sobre a germinação das sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All) Engl.), quando submetidas a secagem e a imersão em nitrogênio líquido objetivando a conservação desta espécie em banco de germoplasma. Os resultados obtidos mostraram que as sementes de Aroeira podem ser armazenadas em nitrogênio líquido com um teor de umidade de 6% b.u.

STANWOOD (1979) menciona que sementes de 14 espécies de legumes e 2 espécies de flores, foram colocadas em envelopes de papel e esses imersos em nitrogênio líquido por períodos de até 180 dias, não observando efeitos adversos de germinação. Nesse trabalho o mesmo autor menciona que foram testadas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e ervilha (*Pisum sativum* L.) sendo que essas sementes também não indicaram nenhuma redução na germinação ou no vigor após a exposição em nitrogênio líquido. Assim o autor relata que esse método é eficaz no armazenamento a longo prazo em bancos de sementes.

PENCE (1991) executou um projeto para determinar a viabilidade em sementes silvestres da região de Ohio a criopreservação em nitrogênio líquido. Foram feitos um total de 527 testes em 237 espécies, tendo-se observado que 79% dos testes realizados, as sementes expostas ao N₂L não tiveram nenhum efeito prejudicial em relação a sua germinação.

No entanto, GONZALEZ-BENITO (1995) ao estudar a germinação de sementes de sete cultivares de Aipo (*Apium graveolens*) após o armazenamento em nitrogênio líquido por um período de 30 dias, constatou que a germinação diminuiu significativamente.

Sementes de *Populus deltoides* foram analisadas por PENCE, (1996) para verificar a possibilidade de secagem em fluxo laminar e o armazenamento as temperaturas de 4°C, -20°C e em nitrogênio líquido podendo ser usado para o armazenamento em banco de germoplasma.

Sementes de bambu (*Bambusa arundinacea*) foram armazenadas após serem colocadas em bolsas plásticas herméticas e transparentes a uma temperatura de -70°C de forma gradativa (40°C , -20°C e -70°C). Os resultados indicaram que cerca de 65% das sementes germinaram após um período de um ano (BRAHAMACHARY, 1994).

STANWOOD e SOWA (1995) armazenaram sementes de 14 variedades de cebola (*Allium cepa* L.) as temperaturas de 5, -18 e -196°C e avaliaram os efeitos da germinação durante um período de 10 anos. Os resultados indicaram que a germinação média das sementes armazenadas a -18 e -196°C não declinou ao longo do tempo ficando em torno de 92%, enquanto a germinação de sementes armazenadas a 5°C caiu de 94 para 68%.

WIESNER, et al., (1993) criopreservaram sementes de alfafa (*Medicago sativa* L. subsp. *Sativa*) em nitrogênio líquido (-196°C) e no vapor de nitrogênio líquido (160°C) por 24 horas e constataram que houve quebra de cotilédones quando exposto ao N_2L em forma de vapor. A quebra de cotilédones foi reduzida quando a semente foi escarificada antes da exposição ao nitrogênio líquido.

O armazenamento de sementes é o método tradicional para a preservação de germoplasmas. Porém, as sementes de várias espécies de árvores são recalcitrantes, elas são sensíveis a umidade e a temperatura e, assim, não podem ser armazenadas a longo prazo de tempo.

ROBERTS, (1973) introduziu o termo ortodoxas para espécies cujas sementes podem ser submetidas a secagem e após armazenadas a baixas temperaturas, permanecendo viáveis por longo período de tempo. Existem ainda as sementes recalcitrantes que perdem a viabilidade quando desidratadas, dificultando sua conservação.

CHADEL et al. (1995) pesquisou em sementes recalcitrantes de chá (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), cacau (*Theobroma cacao* L.) e Jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.) onde foram criopreservadas com os teores de umidade de 24, 35 e 31% respectivamente. Os resultados indicaram que a esses níveis de umidade as sementes não toleraram o congelamento em nitrogênio líquido a (-196°C). Alguns casos de sobrevivência foi observado quando sementes de chá e jaca foram crioconservadas a 14% de teor de umidade

NORMAH e VENGADASALAM (1992) relataram que sementes de café (*Coffea liberica* Bull ex Hiern) podem ser criopreservadas com um sucesso de 53,3% de sobrevivência para um teor de umidade de 16,7%, enquanto que os embriões após serem criopreservados com um teor de umidade de 20% obtiveram 86% de sobrevivência. Foi observado também, nesse experimento, que sementes de café com tegumento sobreviveram melhor do que aquelas sem tegumento. Os pesquisadores relataram também que sementes de feijão (*Vigna sesquipedalis* L.) mostraram-se normais com característica de sementes ortodoxas, e tanto as sementes com teor de umidade de 9% como os embriões cortados com teores de umidade de 6,7-10,5%, se criopreservaram com uma sobrevivência de 90%.

A criopreservação em nitrogênio líquido também está sendo utilizada na preservação de cultura de tecido, TANNOURY et al., (1995), utilizaram esse método para criopreservar em nitrogênio líquido o tecido apical do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) que foi encapsulado com um teor de umidade de 20%. Os resultados não indicaram mudanças significativas na sua propagação após o armazenamento a -196°C.

GONZALEZ -BENITO et al. (1997) observaram que brotos de explantes *in vitro* de plantas em extinção (*Centaurium rigualli* Esteve, *Gentianaceae*) foram criopreservadas com sucesso. Métodos para melhorar a sobrevivência após imersão em nitrogênio líquido (-196°C) foi desenvolvido utilizando a técnica de desidratação-encapsulação para proteção contra os cristais de gelo. Os explantes foram colocados em nitrogênio líquido por 1h e subsequentemente descongelados em banho-maria, mostrando após 8 semanas de cultivo 70% de sobrevivência.

RAJASEHARAN (1994) estudou a criopreservação do pólen de quatro cultivares de rosa, o pólen reteve a viabilidade indexado por germinação *in vitro* por 24 horas e período de um ano de armazenamento em nitrogênio líquido. O pólen criopreservado manteve sua habilidade para fertilizar e produzir novas sementes. De acordo com o autor a disponibilidade do pólen criopreservado permite que a rosa fosse polinizada qualquer hora do ano e em qualquer local. A preservação criogênica também ofereceu a possibilidade de conservar a estrutura do gene haplóide em espécies de rosa, para a facilidade aos bancos criogênicos de pólenes.

Estão sendo feitos esforços internacionais para desenvolver métodos diferentes do tradicional armazenamento, manutenção, conservação e a troca de germoplasmas

com intuito de explorar as possibilidades na criação de “Bancos de Germoplasmas” dos recursos genéticos de plantas raras. Nesta consideração, a cultura de tecido combinada com a tecnologia de criopreservação está sendo vista como ajuda complementar para os métodos já existentes (BAJAJ, 1980).

II. 3 MATERIAL e MÉTODOS

A segunda etapa da pesquisa foi realizada no Setor de Criogenia do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal da Paraíba – Campus II, em Campina Grande – PB.

Para a realização deste trabalho, foram utilizadas 03 variedades de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.), sendo elas: Seridó – 1, CNPA-G2 e CNPA-G3 (Figura 10), cedidas pela Embrapa – Algodão, em Campina Grande.

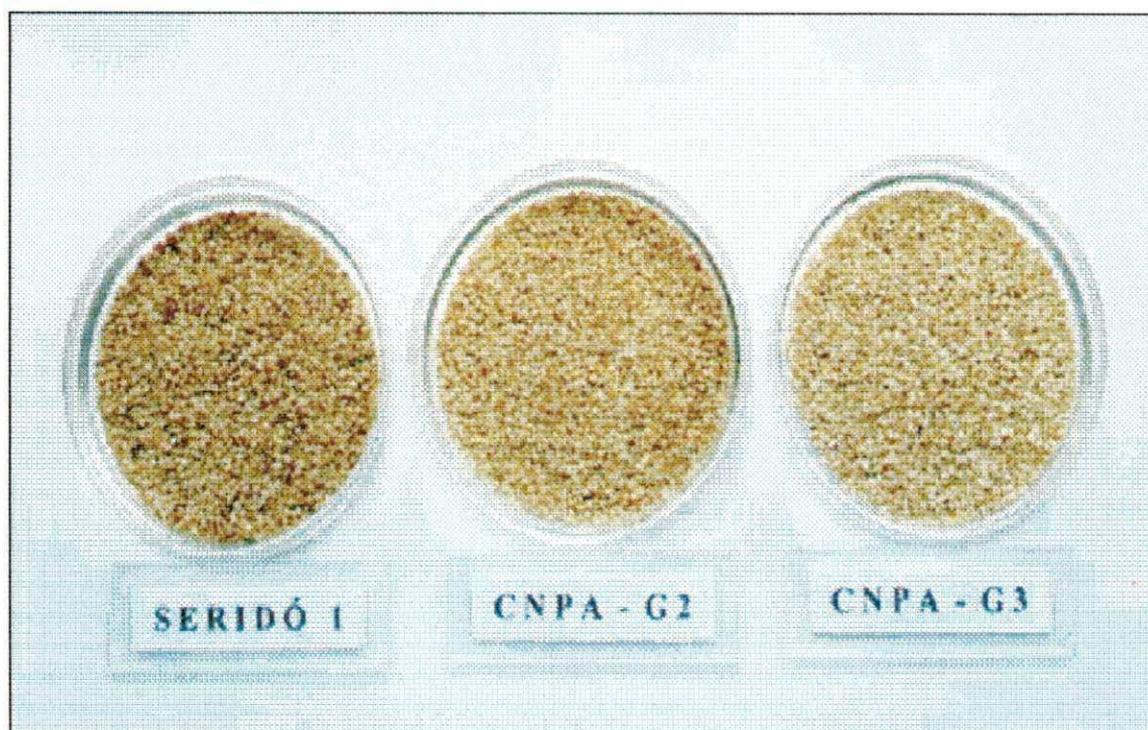


FOTO: Sergio Cobel – Embrapa Algodão

FIGURA 7. Variedades de sementes de gergelim

3.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE LIMITE PARA CRIOPRESERVAÇÃO (TULC)

Para realização do trabalho foi necessário a determinação dos teores de umidade inicial de cada variedade de sementes de gergelim através do método padrão da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, por 24 horas, de acordo com as "Regras de Análise de Sementes" (Brasil, 1992). Foram pesadas 3 amostras de 10g (P_i) para cada variedade de sementes de gergelim através de uma balança eletrônica marca Mettler, modelo PC 440, com precisão de 0,01g. Após o tempo de exposição na estufa, as amostras foram resfriadas em dessecador por um período de 30 minutos e em seguida pesadas, obtendo o peso final (P_f). A porcentagem de umidade foi calculada aplicando-se a seguinte expressão:

$$\%b.u = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100 \quad \text{em que:} \quad (5)$$

P_i = peso inicial da amostra (gramas);

P_f = peso final da amostra (gramas);

% b.u = teor de umidade, base úmida.

Para todo o trabalho onde se fez necessário a determinação do teor de umidade, este método foi utilizado, não só para a determinação do teor inicial das sementes.

Após a determinação do teor de umidade inicial de cada variedade de sementes essas foram secas ou umidificadas até que atingissem os teores de umidade de (2, 4, 6, 8, 10 e 12% b.u.) das sementes. A quantidade de água a ser evaporada ou absorvida, em gramas, foi determinada com a seguinte expressão:

$$P_f = P_i \times \frac{(U_i - U_f)}{(100 - U_f)} \quad \text{em que:} \quad (6)$$

P_f = quantidade de água a ser evaporada ou absorvida (gramas);

P_i = peso inicial das sementes (gramas);

U_f = teor de umidade final das sementes (%);

U_i = teor de umidade inicial das sementes (%).

3.1.1 SECAGEM DAS SEMENTES

Para a secagem das sementes as amostras de gergelim foram colocadas em um secador, (Figura 8) contendo como material dessecante silica gel. As amostras foram pesadas a cada 24 horas, até que atingissem os pesos referentes aos teores de umidade desejados. Para este fim foi utilizada uma balança eletrônica modelo Mettler PC 440, com precisão de 0,001g.

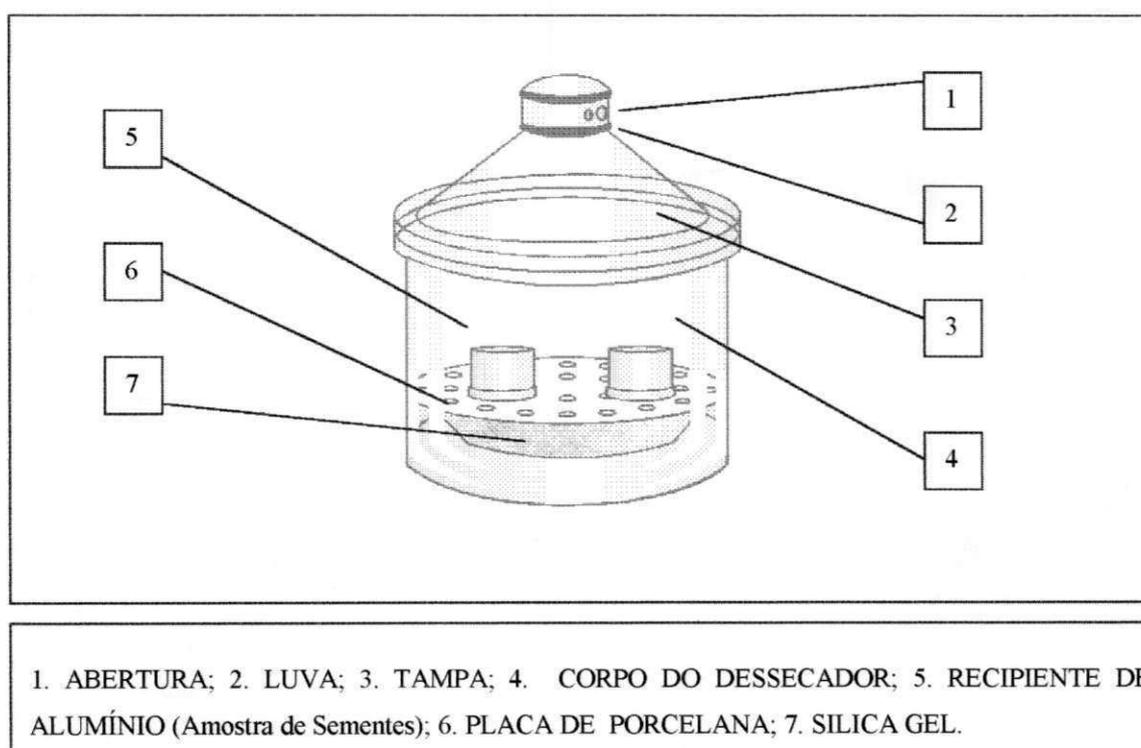


FIGURA 8 – Dessecador utilizado na secagem das sementes de gergelim.

3.1.2 UMEDECIMENTO DAS SEMENTES

Para o umedecimento das sementes as amostras foram colocadas em pequenas cestas de arame suspensas por um anel de PVC e colocadas no interior de recipientes de vidro hermeticamente fechados contendo água destilada (Figura 9) e posteriormente colocadas em estufa incubadora para B.O.D a 10°C. As 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 umidade desejados.

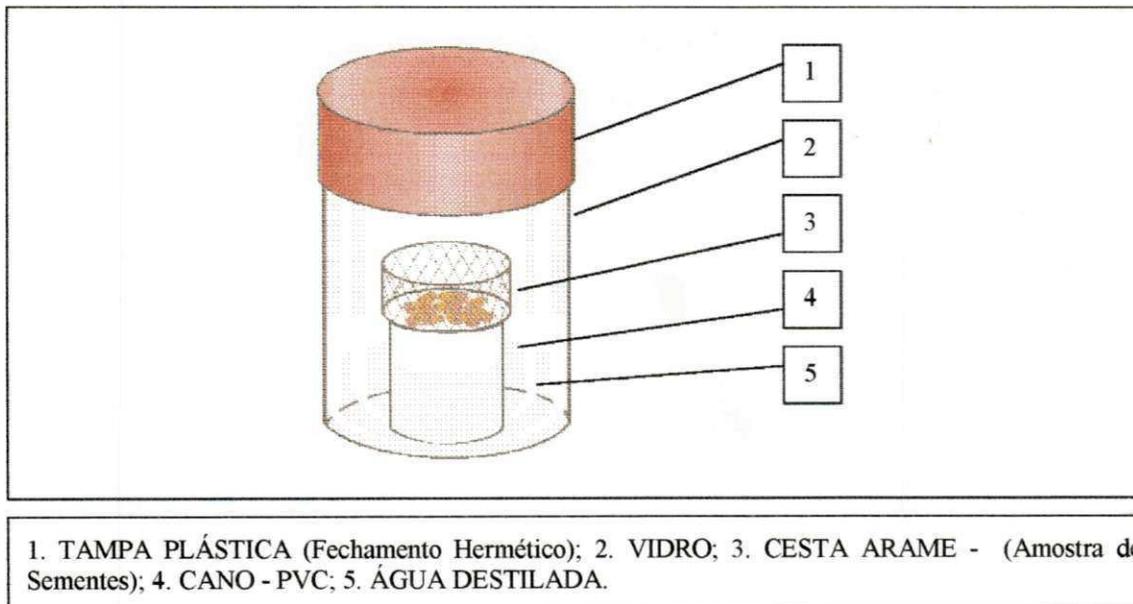
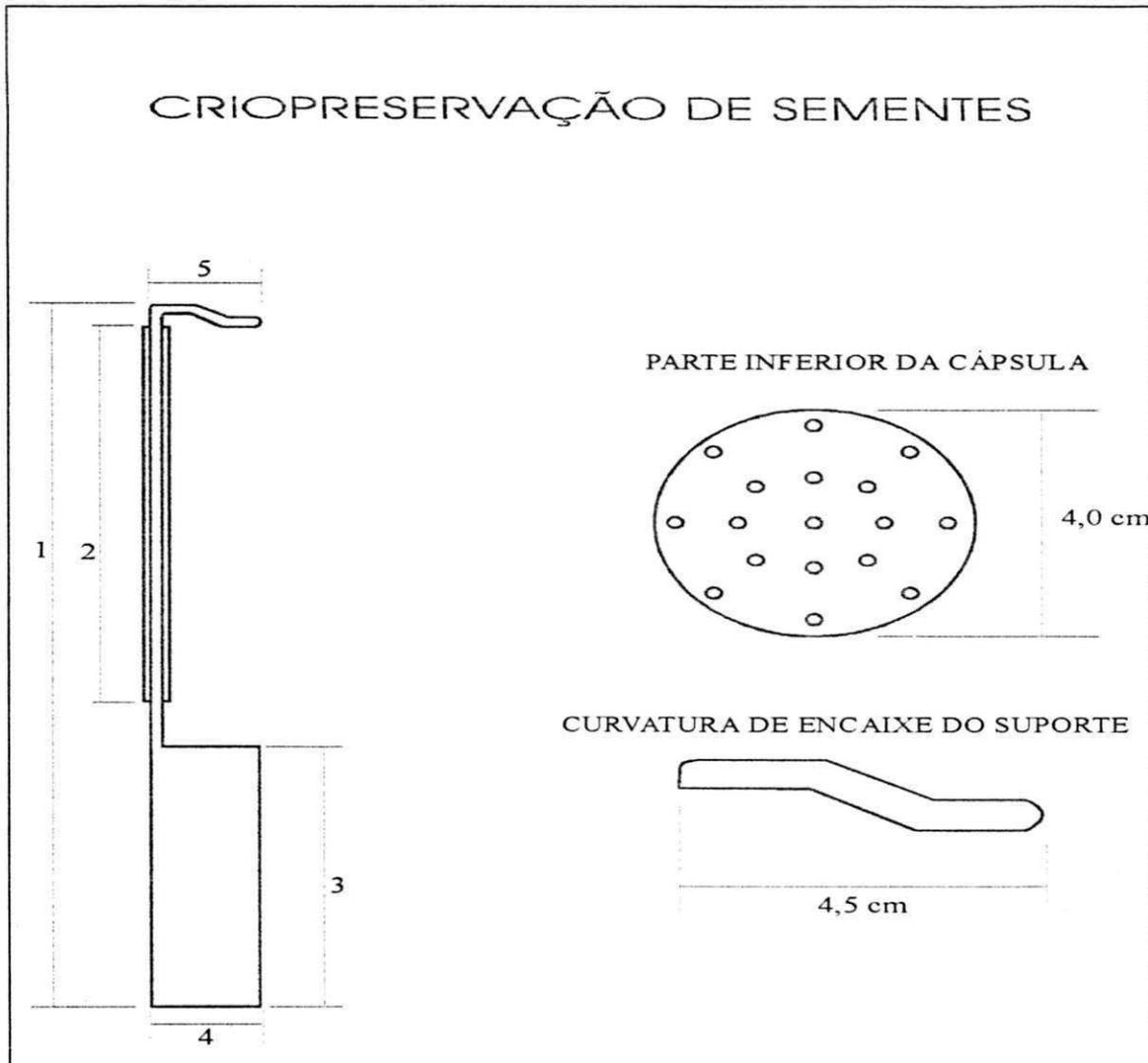


FIGURA 9. Recipiente hermético contendo sementes de gergelim.

As sementes ao atingirem os teores de umidade acima citados, foram colocadas dentro de canister (Figura 10) e criopreservados em botijões criobiológicos (Figura 11) durante um período de 05 dias.

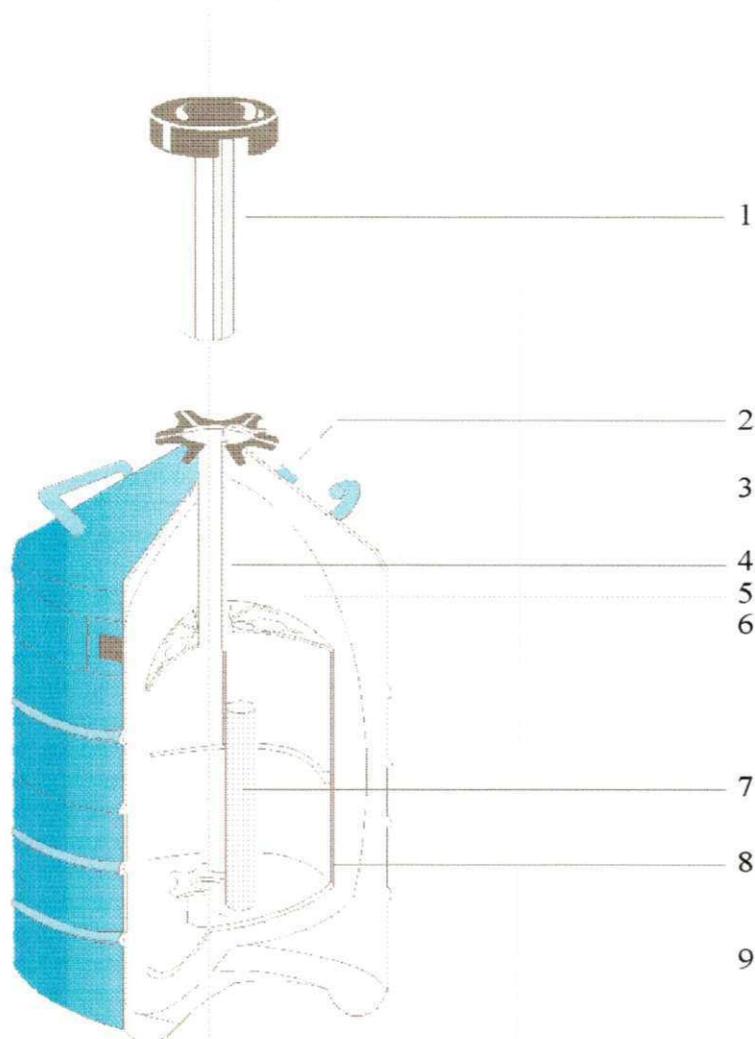


1. CANISTER DE AÇO INOX (50 cm); 2. PROTETOR PLÁSTICO (32 cm); 3. CÁPSULA DE AÇO INOX (18 cm); 4. CURVATURA DE ENCAIXE DO SUPORTE (4,5cm); 5. DIÂMETRO DA CÁPSULA DE AÇO INOX (4,0cm).

FIGURA 10. Canister de aço inox – Padrão

BOTIJÃO CRIOBIOLÓGICO

Principais Componentes



1. PLUGUE; 2. VÁLVULA DE VÁCUO; 3. ALÇA; 4. GARGALO; 5. ISOLAMENTO TÉRMICO; 6. SISTEMA DE MANUTENÇÃO DE VÁCUO; 7. CANÍSTER; 8. RECIPIENTE INTERNO; 9. INVÓLUCRO EXTERNO.

FIGURA 11. Botijão criobiológico, utilizado em processo criogênico.

O canister padrão foi feito em aço inoxidável, no tamanho de 50cm com o objetivo de manter o material biológico imerso em nitrogênio líquido.

O Botijão Criobiológico utilizado é na verdade constituído de dois recipientes, um dentro do outro, unidos por um gargalo de fibra de vidro especial para baixas temperaturas e alto vácuo. O espaço entre os recipientes é com material isolante submetido a alto vácuo. O isolamento térmico confere, ao botijão, a capacidade de reter o nitrogênio no estado líquido (-196°C), baixas perdas por evaporação, viabilizando assim a estocagem e transporte de materiais biológicos vivos por longos períodos, de forma econômica.

Após 05 dias de criopreservadas, as sementes foram submetidas ao descongelamento a temperatura ambiente a $\pm 25^{\circ}\text{C}$, por período de 12 horas. E em seguida foram feitos os testes de germinação e vigor seguindo-se as Regras de Análise de Sementes, (BRASIL, 1992).

Feitas as avaliações destes testes, determinou-se o melhor teor de umidade que as sementes poderiam ser criopreservadas, ou seja, o teor de umidade limite para criopreservação (TULC), das sementes em nitrogênio líquido.

3.2 CRIOPRESERVAÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de gergelim, após estabelecido o melhor teor de umidade foram criopreservadas em nitrogênio líquido a temperatura de (-196°C), sendo testados 3 crioprotetores e uma testemunha (sem crioprotetor).

3.2.1 ANÁLISE TERMOMÉTRICA

Foram realizados alguns testes prévios para verificação do tempo que as sementes levaram para ser criopreservadas quando se utiliza os diferentes crioprotetores.

As sementes de gergelim a temperatura ambiente foram imersas, com cautela, no botijão criogênico contendo nitrogênio líquido a (-196°C), sendo realizadas as leituras de precisão até a estabilização do material orgânico com a temperatura oferecida pelo nitrogênio líquido.

Para a realização do teste termométrico, foram utilizados os sensores de platina (PT 1000 1/3 DIN BR = 1000Ω), que ficavam em contato com as sementes, e interligados ao Multímetro Digital Voltcraft 4650 CR. E a leitura dos dados obtidos eram realizados através do Programa Digiscope.

Foram registradas as variações de temperatura quanto a utilização dos diferentes crioprotetores (Crioprotetor 1 – Tubo polietileno; Crioprotetor 2 – Envelope de alumínio e o Crioprotetor 3 – Amido de milho).

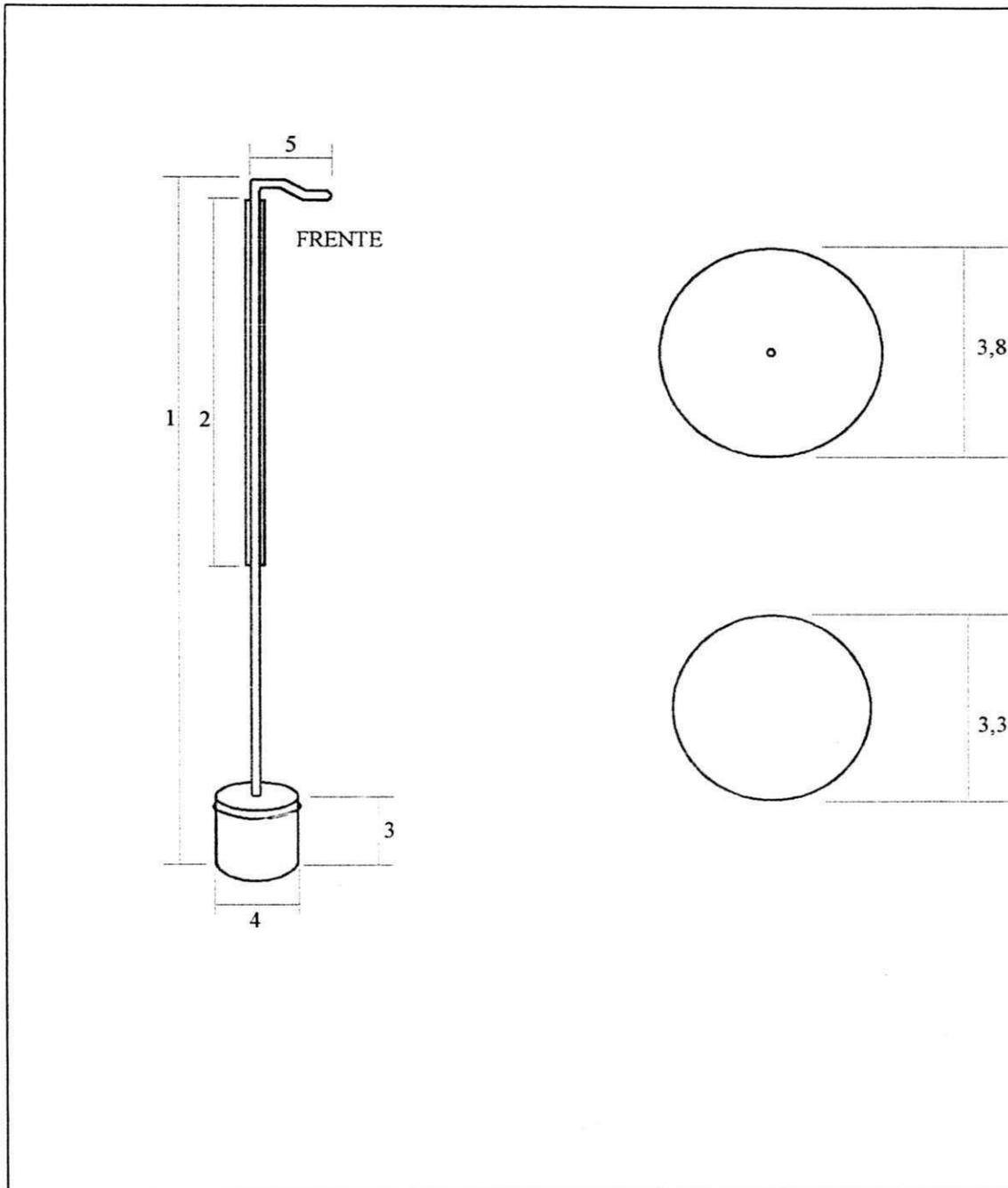
3.2.2 CRIOPROTETORES

Os crioprotetores foram utilizados com o intuito a sugerir novas formas de embalagens, para o armazenamento em nitrogênio líquido, como alternativa simples e de baixo custo.

Foram testados três tipos de crioprotetores e uma testemunha. A testemunha utilizada foi a semente sem crioprotetor. O crioprotetor 1 – Tubo polietileno (Figura 12) consistiu de um tubo de plástico, onde as sementes foram colocadas no interior do tubo e imersos no nitrogênio líquido.

O crioprotetor 2 – Envelope de alumínio (Figura 13) consistiu em um envelope de trifoliar de alumínio, com uma abertura por onde foram colocadas as sementes, para serem criopreservadas.

O crioprotetor 3 – Amido de milho (maizena), consistiu em envolver as sementes em uma massa homogênea de amido de milho e coloca-las no interior do canister padrão.



1. SUPORTE DE AÇO INOX (50 cm); 2. PROTETOR PLÁSTICO (20cm); 3. EMBALAGEM PLÁSTICA (5,0cm); 4. DIÂMETRO DA EMBALAGEM PLÁSTICA (3,3cm) e 5. CURVATURA DE ENCAIXE DO SUPORTE (4,5 cm).

FIGURA 12. Crioprotetor 1 – Tubo polietileno

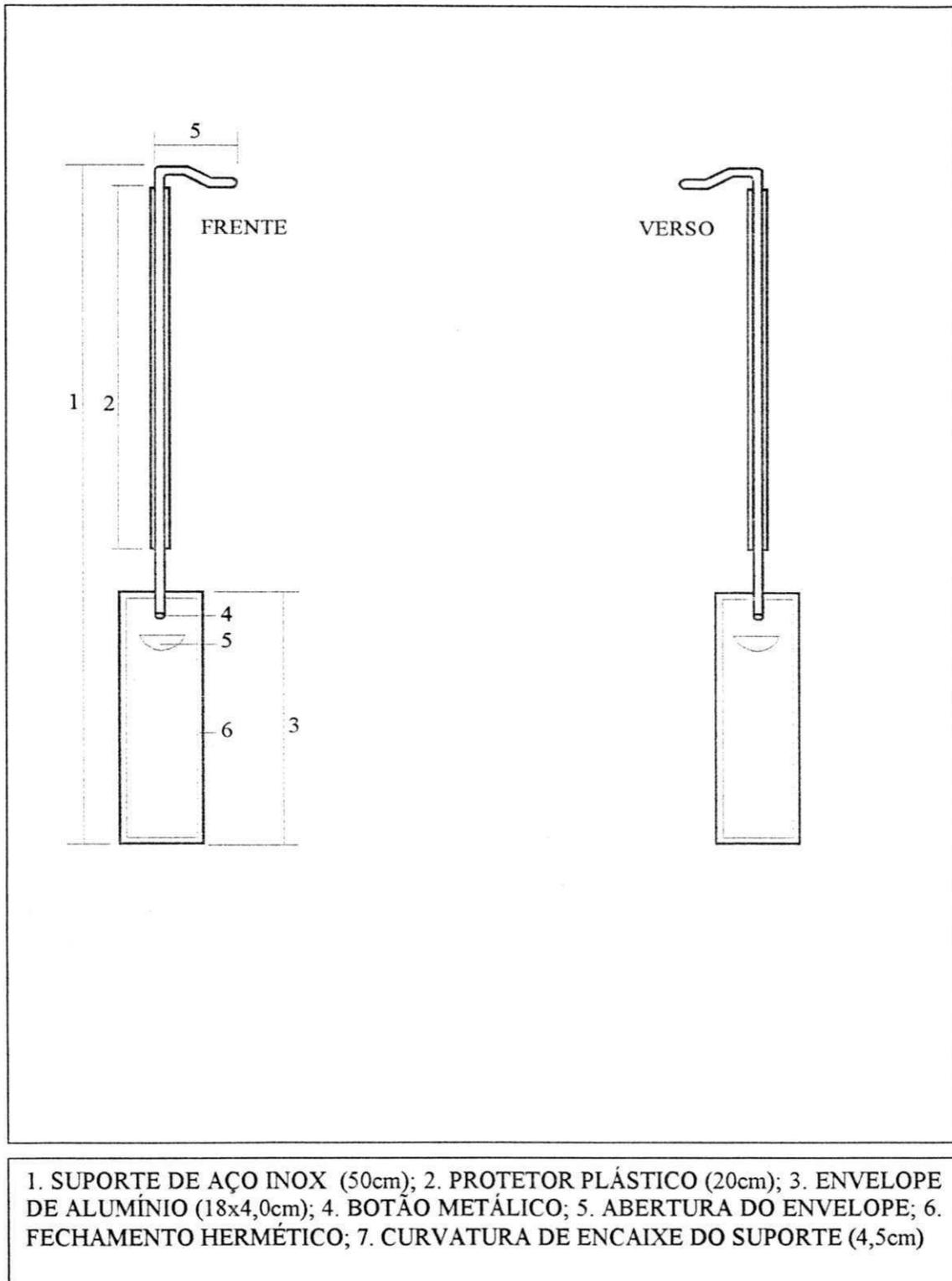


FIGURA 13 . Crioprotetor 2 – Envelope de alumínio

As sementes com crioprotetor e sem crioprotetor foram armazenadas por período de 0, 5, 30 e 60 dias. Depois de decorrido cada um desses períodos as sementes foram descongeladas por duas técnicas e submetidas ao teste padrão de germinação.

3.2.3 PROCESSO DE DESCONGELAMENTO DAS SEMENTES

Para a realização do descongelamento, as sementes foram submetidas a duas técnicas:

- Descongelamento lento a temperatura ambiente de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ por 12 horas;
- Descongelamento em banho termostático à temperatura de 40°C por 3 horas.

3.3 ANÁLISE DA QUALIDADE FISIOLÓGICA

3.3.1 TESTE DE GERMINAÇÃO (TG)

Após serem criopreservadas e descongeladas de acordo com cada tratamento as sementes de gergelim eram submetidas a determinação do percentual de germinação. Para essa determinação foram utilizadas placas de Petri, (esterilizadas em estufa a 115°C por 6 a 8 horas), contendo papel germitest, como substrato. (Figura 14)

As sementes eram colocadas no papel germitest umedecido e as placas contendo todo esse material era inserido em estufa incubadora B.O.D a temperatura de 30°C , por período de 7 a 10 dias. Este teste foi realizado seguindo as Regras para Análise de Sementes. (Brasil, 1992).



Foto: Sergio Cobel – Embrapa Algodão

FIGURA 14. Germinação das sementes de gergelim em placas de Petri.

3.3.2 TESTE DE VIGOR (TV)

O teste de vigor foi realizado utilizando o teste indireto de primeira contagem do teste de germinação que consiste em contar o número de plântulas normais imersas no 7º dia depois de semeadas. Os resultados foram obtidos em porcentagem.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o teste do Teor de Umidade Limite para Criopreservação (TULC), foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com arranjo fatorial de 3x6 sendo (3 variedades) x (6 teores de umidade), com quatro repetições.

4.3 INDUÇÃO A CALOGÊNESE

O ensaio de calogênese tem como objetivo a indução de material vegetal hipocótilo de plântulas germinadas *in vitro*, para a obtenção de calos embrionários, com a finalidade de utiliza-los posteriormente na indução de embriões.

Para a realização deste ensaio de indução a calogênese, foram utilizados como reguladores de crescimento: BAP (6-bencilaminopurina); 2,4-D (diclorofenoacético) e NAA (ácido α -naftalen-acético) e a água de côco como substância natural.

4.3.1 EFEITO DA CALOGÊNESE

Nos gráficos representativos de indução a calogênese, verifica-se os efeitos dos reguladores de crescimento no desenvolvimento de calos embrionários, para as três variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3). Nesses gráficos observa-se que a utilização dos reguladores de crescimento BAP(mg.L⁻¹), NAA(mg.L⁻¹), 2,4-D (mg.L⁻¹) e a água de côco (%), induziram a formação de calos.

No gráfico 7 pode-se observar o maior desenvolvimento de calos na cultivar de gergelim variedade CNPA-G3, com a atuação dos reguladores de crescimento BAP (6-bencilaminopurina) e NAA (ácido α -naftalen-acético), nas concentrações de BAP (2 mg.L⁻¹) e NAA (0,05 mg.L⁻¹), evidenciando-se um maior incremento de peso quando comparado com as outras variedades.

Ainda em relação ao gráfico 7 verifica-se que a variedade Seridó-1 foi a que obteve o menor incremento de peso, todavia todas as variedades por um período de 60 dias desenvolveram calos a partir do hipocótilo de plântulas de gergelim germinadas *in vitro*.

Pode-se observar também, nesse gráfico, que a variedade CNPA-G2 apresentou maior incremento de peso em desenvolvimento de calos quando o meio básico MS foi suplementado com 2 mg.L⁻¹ de BAP.

No processo de indução a calogênese ARELLO em (1991) obteve calos com emissão de brotos em *Gerbera jamesonii* nas variedades *Appel Bloesen* e *Marleen*, quando inoculados em meio "MS".

No Gráfico 8 observa-se um maior desenvolvimento de calos na variedade Seridó-1 com a atuação dos reguladores de crescimento 2,4D (diclorofenoacético) e água de côco, nas concentração de (3,0 mg.L⁻¹) e 15% de água de côco, evidenciando um maior incremento de peso, quando comparado com as outras variedades.

Ainda em relação ao Gráfico 8 verifica-se que a variedade CNPA-G2 obteve o menor incremento de peso, quando comparado com as demais variedades, podendo-se observar, também nesse gráfico, que a variedade CNPA-G3 apresentou menor incremento de peso com a concentração de 3,0 mg.L⁻¹ do regulador de crescimento 2,4D, enquanto que para a concentração de 2,5 mg.L⁻¹ do mesmo regulador obteve um maior desenvolvimento de calos.

MATSUMOTO (1991) obteve calos embrionários em meio MS quando suplementado com altas concentrações de ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D). A indução de embriões somáticos foi mais eficiente no meio de cultura, suplementado com (2,4-D) e (GA₃), onde o número de embriões somáticos aumentou quando suplementado com 1mg.L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) ao meio.

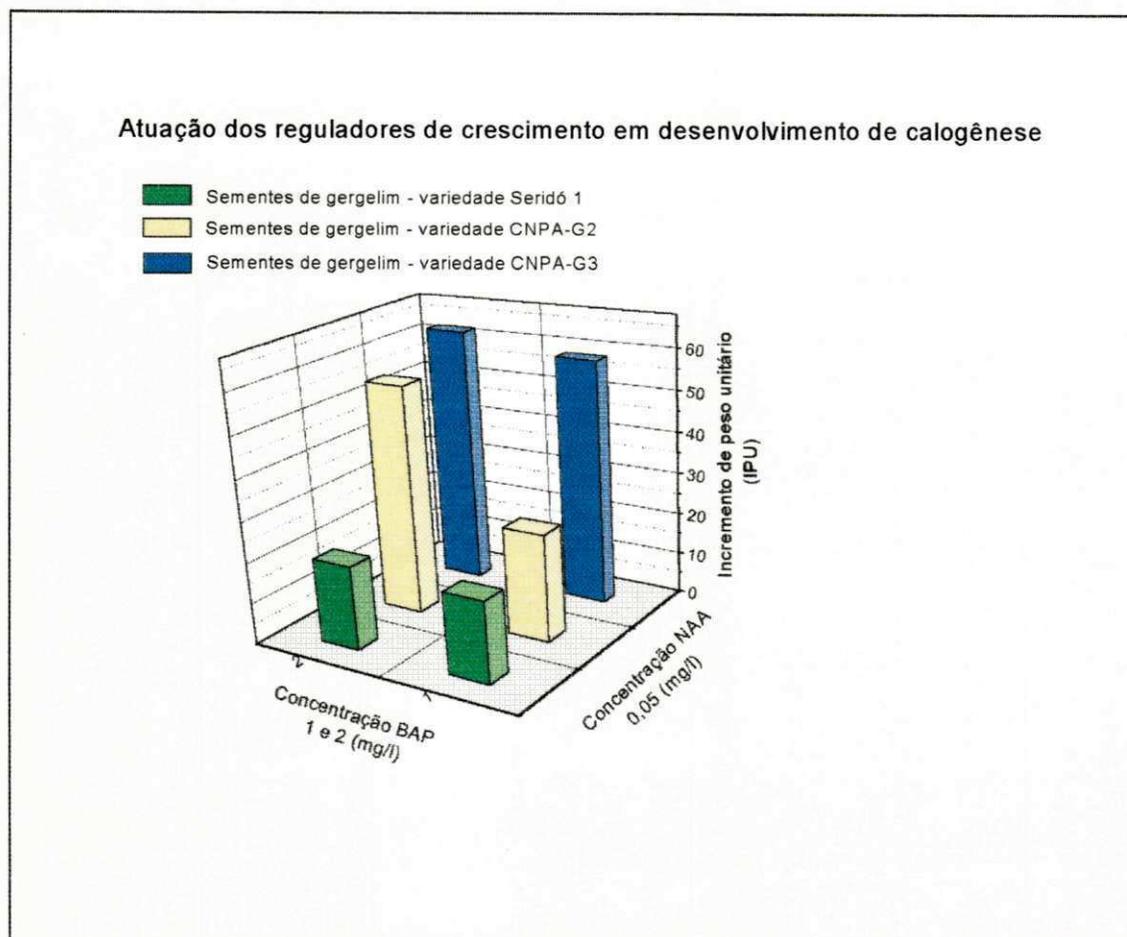


GRÁFICO 7. Efeito da adição de reguladores de crescimento BAP (1 e 2 mg.L⁻¹) e NAA (0,05 mg.L⁻¹) ao meio básico MS sobre o incremento de peso do hipocótilo de três variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3), após oito semanas de cultivo.

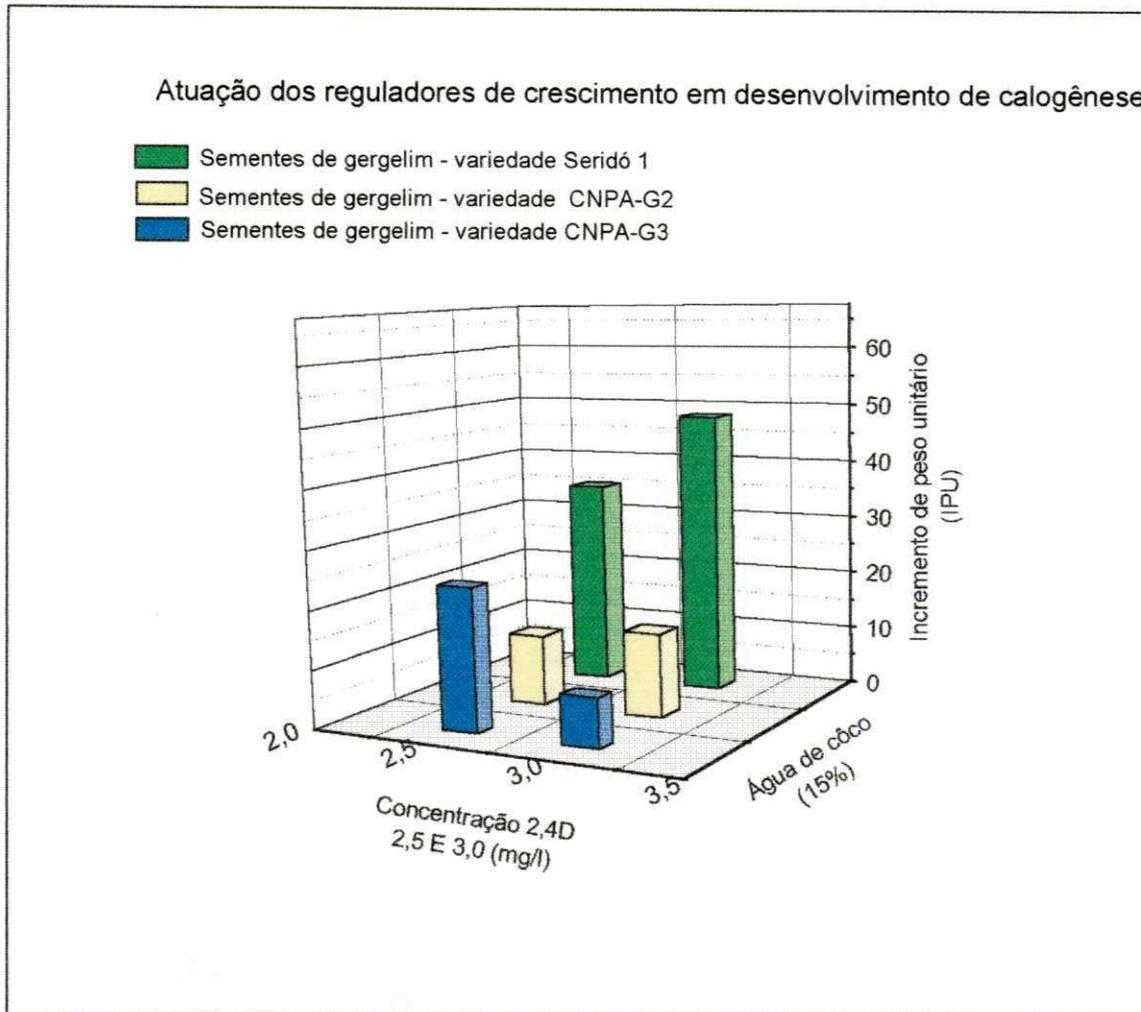


GRÁFICO 8. Efeito da adição de reguladores de crescimento 2,4D (2,5 e 3,0 mg.L⁻¹) e água de côco (15%) no meio básico MS sobre o incremento de peso do hipocótilo de três variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) após oito semanas de cultivo.

Na Figura 6, encontra-se formação de calos embrionários desenvolvidos com a atuação dos reguladores de crescimento BAP, NAA, 2,4-D e Água de côco, a partir de explantes de hipocótilo em cultivar de gergelim. Pode-se observar nessa figura, que os calos proeminentes da formação com reguladores de crescimento BAP e NAA apresentaram-se “friáveis” com coloração de verde para verde-claro, enquanto que os calos com 2,4-D e água de côco apresentaram “moles” com coloração cinza-verde.

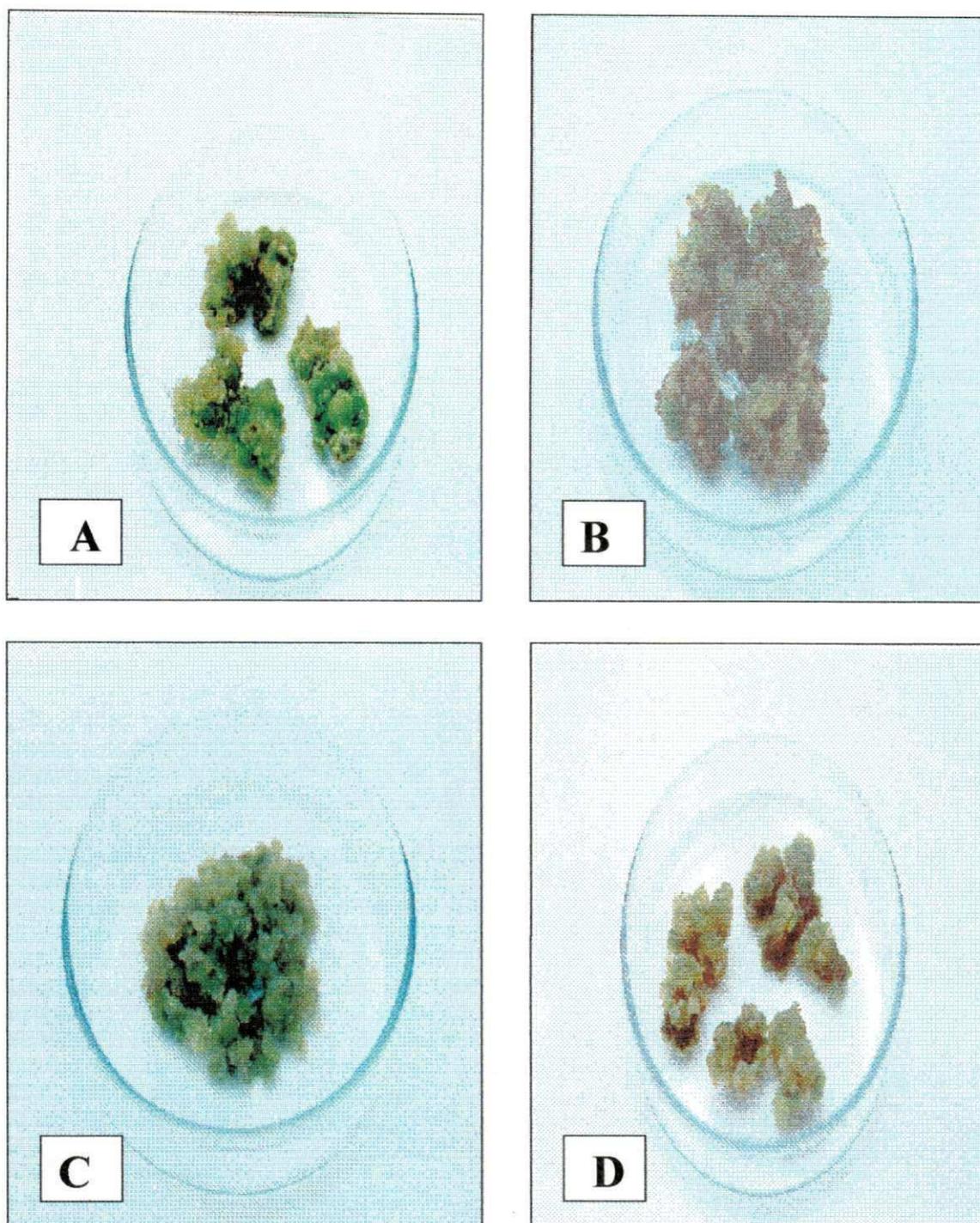


Foto: Sergio Cobel – Embrapa Algodão

FIGURA 6. Desenvolvimento de calos embrionários das variedades de gergelim Seridó-1 (A e B), CNPA-G2 (C) e CNPA-G3 (D), em meio básico MS.

I.5 CONCLUSÕES

ASSEPSIA DAS SEMENTES:

Mediante os resultados obtidos concluiu-se que:

- I. A variedade CNPA-G2 mostrou-se superior as demais variedades apresentando os maiores percentuais de germinação e vigor não diferindo da testemunha;
- II. A assepsia das sementes de gergelim, variedade CNPA-G2, pode ser feita com a concentração de hipoclorito de sódio variando entre 10 e 40%, indicando – se 10% por ser o valor mais econômico, sendo que o meio de germinação recomendado deve ser o papel germitest, (PG);
- III. A concentração de hipoclorito que deve ser recomendado para fazer a assepsia da semente de gergelim, variedade CNPA-G3, é de 20%, e o melhor meio de germinação das sementes é o papel germitest (PG) em detrimento do meio de cultivo MS;
- IV. Quanto a assepsia da semente de gergelim variedade Seridó-1 a concentração de hipoclorito de sódio que causa menor danos as sementes é na ordem de 20% e o meio de germinação recomendado é o meio MS;
- V. Em relação à análise fitopatológica concluiu-se que os fungos encontrados foram *Aspergillus sp*, *Penicillium spp*, *Rhizoctonia* e o *Rhizopus sp* sendo que a variedade Seridó-1 apresentou maior incidência de contaminação para todos encontrados, evidenciando a maior presença do *Aspergillus sp* em todas as variedades, entretanto a variedade CNPA-G3 foi a que apresentou menor incidência de fungos.

NA INDUÇÃO A ORGANOGÊNESE SOMÁTICA REALIZADA CONCLUI-SE QUE:

“SEM” O PRÉ - TRATAMENTO DAS SEMENTES.

- I. A variedade CNPA-G3 quanto aos Explantes Vivos (E.V) apresentou os maiores índices de desenvolvimento, ou seja, maior incidência de explantes viáveis ao brotamento quando comparada com as outras variedades, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.
- II. A variedade Seridó-1 foi que apresentou maior N° de brotos por explantes (B/E), estatisticamente superior as outras, ou seja, foi encontrado maior número de brotos por cada explante vivo, ocasionando um processo de super brotamento nesta fase.

“COM” O PRÉ - TRATAMENTO DAS SEMENTES.

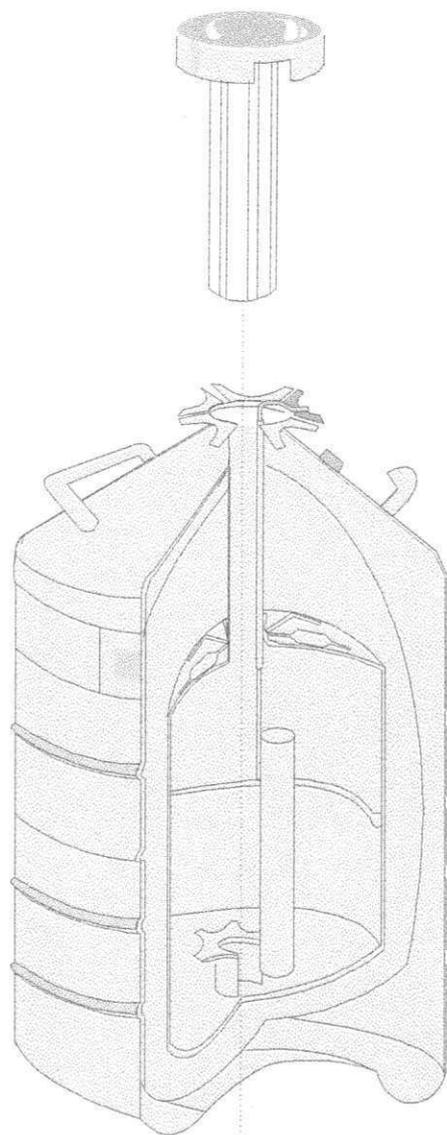
- III. Não houve diferenças estatísticas entre as variedades (Seridó1 e CNPA-G3) quanto aos Explantes Vivos (E.V), ou seja, as variedades envolvidas apresentaram desenvolvimento semelhantes na obtenção de explantes vivos por frasco;
- IV. Em relação ao N° de brotos por explante, também não houve diferença estatística entre as variedades Seridó-1 e CNPA-G3, ou seja, ambas apresentaram processo de desenvolvimento evidenciando super brotamento, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.
- V. Em relação aos processos realizados: “sem” e “com” pré-tratamento das sementes (MS líquido), houve uma incidência muito maior de brotos por explantes vivos quando realizado o pré - tratamento das sementes (MS líquido).

NA INDUÇÃO A CALOGÊNESE CONCLUI-SE QUE:

- VI. No desenvolvimento de calogênese, utilizando explantes de hipocótilo de plântulas germinadas *in vitro* em cultivar de gergelim, ocorreu maior formação de calos em meio MS, quando suplementado com os reguladores de crescimento BAP (6-bencilaminopurina) e NAA (ácido α -nafatalenoacético), em todas as variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) estudadas.

CAPITULO II

CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE GERGELIM



CAPÍTULO II - CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE GERGELIM

II. 1 INTRODUÇÃO

A importância da semente é notória desde os tempos pré-históricos, quando foi a grande causadora da mudança dos hábitos de homem das cavernas, transformando-o de nômade e caçador em sedentário e agricultor.

Atualmente, a semente não só representa a base da alimentação da maioria da raça humana, como foi transformada pela tecnologia moderna, por meio de seus subprodutos, em subsídios capazes de contribuir com o homem na conquista de espaços interplanetários (LIBERAL, 1980).

O grande sucesso da semente como órgão de perpetuação e de disseminação da espécie vegetal deve-se, provavelmente, a duas características que, reunidas, a tornam um órgão ímpar no reino vegetal. São eles: a capacidade de distribuir a germinação no tempo (pelos mecanismos de dormência) e no espaço pelos mecanismos de dispersão, como espinhos, pêlos, asas, etc. (CARVALHO e NAKAGAWA, 1980).

Existe uma necessidade crescente de preservação do patrimônio genético das sementes para que haja uma melhoria na produtividade, no entanto, para que as sementes possam ser armazenadas com o intuito de preservar os recursos fitogenéticos das plantas, foram estruturados Bancos de Sementes em inúmeros significativos de países, pois os recursos fitogenéticos proporcionam matéria prima para se obter melhores e novas variedades de plantas mediante as técnicas de melhoramento vegetal ou através de engenharia genética.

Com o passar das décadas e mais especificamente no século XX, devido o crescente aumento populacional da humanidade houve a necessidade de preservar o patrimônio genético das sementes com vista a possibilidade de melhoria da produtividade.

Como alternativa ao banco de germoplasma tradicional, tem sido utilizada a criopreservação das sementes, que consiste em conservar as sementes em temperaturas criogênicas a -196°C , por imersão dessas sementes em nitrogênio líquido, a -170°C , utilizando o vapor do nitrogênio. De acordo com PITA VILLAMIL (1997), a preservação das sementes abaixo de -130°C permite que o metabolismo das sementes

seja paralisado, impedindo a sua deterioração. Segundo o mesmo autor, a criopreservação tem se mostrado como um método eficiente, prático e de baixo custo na preservação dos recursos fitogenéticos, além de manter a semente viável por tempo considerado indefinido.

Assim o armazenamento das sementes com o uso do nitrogênio líquido (N_2L) tem o potencial teórico de permitir a "preservação indefinida". Contudo a capacidade das sementes de determinadas espécies de resistir ao resfriamento em nitrogênio líquido a ($-196^\circ C$), sem danos, é o primeiro passo crítico e principal para a aplicação prática desta técnica de preservação. Mais de 120 espécies de representação agrônômica, como legumes, flores, arbustos e espécies de árvores, foram resfriadas em nitrogênio líquido para verificar a existência de perda da viabilidade. Segundo STANWOOD (1980), espécies como linho (*Linum usitatissimum* L.) e gergelim (*Sesamum indicum* L.) parecem ser resistentes aos danos que possam ser provocados quando imersas em nitrogênio líquido.

Para as sementes onde esses danos impedem a sua criopreservação, devido a velocidade de congelamento ser muito rápida, tem-se utilizado alguns crioprotetores que tem como objetivo impedir vários danos como o trincamento das sementes e ocasionando maiores perdas no processo germinativo.

Apesar das vantagens da criopreservação, existem problemas decorrentes da complexidade técnica e biológica do processo de congelamento e descongelamento, portanto, torna-se necessário desenvolver procedimentos específicos para cada tipo de cultura agrícola (ASHWOOD-SMITH, 1985).

Para a criopreservação de sementes, o teor de umidade pode ser um desses problemas, pois o produto quando colocado para congelar com alto teor de umidade a baixas temperaturas, as partículas de água, no interior das sementes, congelam provocando expansões que podem danificar as células, refletindo na qualidade fisiológica do produto. No entanto, se a semente for criopreservada com teores de umidade baixos, podem ocorrer segmentos vazios entre os espaços intercelulares, que antes eram ocupados pelas moléculas de água, que podem provocar trincamentos ou quebras das sementes. Desta forma, torna-se necessário determinar o teor de umidade limite para criopreservação (TULC), que consiste na obtenção do teor, ou teores de

umidade, nos quais a germinação e o vigor das sementes sejam mantidos próximos dos iniciais.

DINIZ (1999), determinou o teor de umidade limite para criopreservação (TULC) de 4 variedades de sementes de milho (BR-451, BR-201, BR-212 e CMS-54), submetidas a 3 dias de armazenagem em nitrogênio líquido, onde concluiu que o teor de umidade limite para criopreservar tais variedades, está em torno de 9% base úmida.

Todavia, em um banco de germoplasma a baixas temperaturas, não só o processo de criopreservação deve ser levado em consideração como também o método de descongelamento, pois quanto mais rápido ocorrer o descongelamento das sementes, melhor a preservação de suas características fisiológicas.

Portanto, diante do conteúdo apresentado, este trabalho teve os seguintes objetivos:

CRIOPRESERVAÇÃO:

- ✓ Determinar o Teor de umidade limite para criopreservação (TULC) das sementes de gergelim;
- ✓ Avaliar a germinação e o vigor de 3 variedades de sementes de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) quando submetidas a temperatura de criopreservação a -196°C “sem” e “com” crioprotetores (Crioprotetor 1 - Envelope de alumínio, Crioprotetor 2 - Tubo polietileno e o Crioprotetor - 3 Amido de milho, como crioprotetor natural.), utilizando duas técnicas de descongelamento (temperatura ambiente a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e ao banho termostatizado a 40°C); após períodos de 5, 30 e 60 dias de armazenamento.

II. 2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GERMINAÇÃO

Para que o processo de germinação ocorra, todas as condições ambientais como: água, temperatura, luz e oxigênio devem ser favoráveis. Segundo ZINK e MENDONÇA (1964), ambientes sujeitos a variações muito acentuadas na condições atmosféricas são impróprias a conservação do poder germinativo das sementes. Por outro lado, a uniformidade de tais condições mostra-se favorável a manutenção do seu poder germinativo.

CARVALHO e NAKAGAWA (1980) afirmam que do ponto de vista agrônômico, a germinação é o processo que se inicia quando a semente seca é plantada em solo úmido e termina quando a plântula emerge do solo. Desta forma, do ponto de vista fisiológico, a germinação consiste no processo que se inicia com o suprimento de água à semente seca e termina quando o crescimento da plântula se inicia.

A germinação é o reinício do crescimento do embrião paralisado nas fases finais de maturação. Os processos fisiológicos do crescimento exigem atividades metabólicas aceleradas, e a fase inicial de germinação consiste primariamente na ativação daqueles processos pelo aumento do teor de umidade e da atividade respiratória da semente, (POPINIGIS, 1985).

O teste de germinação é a obtenção de informações que permitam determinar o valor das sementes para semeadura e a comparação desse valor em diferentes lotes sendo importante sua padronização (MARCOS FILHO, 1987).

Germinação de sementes em teste de laboratório é a emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo. E para que uma plântula possa continuar seu desenvolvimento até tornar-se uma planta normal, deve apresentar as seguintes estruturas essenciais: sistema radicular (raiz primária, raízes secundárias e em certos casos raízes seminais), parte aérea (hipocótilo, epicótilo, em certas gramíneas, mesocótilo e gemas terminais), cotilédones (um ou mais) e coleóptilo

(em todas as gramíneas). O objetivo final do teste de germinação é obter informações para fins de semeadura e fornecer dados que possam ser usados para comparar o valor de diferentes lotes de sementes, segundo a R.A.S (Regras para Análise de Sementes), (BRASIL, 1992).

2.2 VIGOR

A noção de vigor deve ter surgido nos primórdios da humanidade, provavelmente a partir de um determinado ponto em que o homem tenha começado a ter um contato mais consciente com animais e vegetais. Trata-se o vigor de um fato biológico que se evidencia facilmente aos olhos a partir de uma observação um pouco mais atenta: indivíduos da mesma espécie, animal ou vegetal, apresentam taxas de desenvolvimento diferentes, o que os leva, naturalmente, a uma classificação em “fortes”, “fracos”, etc. (VIEIRA, 1994).

Embora o conceito de vigor tenha sido estabelecido a alguns anos, não existe nenhuma definição que seja aceita universalmente (POPINIGIS, 1979).

O vigor da semente, segundo DELOUCHE (1965) é a soma de todos os atributos da semente, que favorecem o estabelecimento em mantê-la em pé sob condições desfavoráveis, o vigor das sementes cresce a medida que aumenta seu teor de matéria seca, alcançando o máximo no ponto de máximo peso de matéria seca, ou seja, quando atinge sua maturidade fisiológica (POPINIGIS, 1977).

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

O mais importante de todos os fatos determinantes do desenvolvimento do conceito de vigor veio a dar-se, contudo, no 9º Congresso da ISTA, em Washington, EUA. Naquela reunião, tecnologistas de sementes americanos e europeus haviam programado chegar a um acordo com relação a natureza do substrato a ser usado para o

teste de germinação de sementes. Até aquela época, os laboratórios de análise de sementes americanos davam preferência ao solo para usar como substrato do teste de germinação, ao passo que os europeus preferiam um substrato artificial (VIEIRA, 1994).

A definição do que seja o vigor de sementes foi um dos aspectos em que mais discutiram o próprio Comitê de Vigor e tecnologistas de sementes do mundo todo, não se tendo chegado a uma redação única até hoje. As duas principais associações que congregam tecnologistas de sementes (a ISTA e a AOSA) tem, cada uma, a sua definição. A da ISTA foi adotada em 1977 e a da AOSA em 1980. São elas as seguintes:

ISTA: “Vigor de sementes 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 da plântula” (ISTA, 1981).

AOSA: “Vigor de sementes compreende algumas 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 (AOSA, 1983).

De acordo com VIEIRA e CARVALHO (1994) a altura ou comprimento da planta visa determinar o vigor relativo de um lote de sementes, sendo consideradas as mais vigorosas as que produzem plantas com maiores valores de comprimentos médios da parte aérea. Segundo os autores o peso da matéria seca da planta visa determinar o valor relativo de um lote de sementes, avaliando-se o peso médio da matéria seca da parte aérea das plantas, baseado no princípio de que sementes que produzem plantas com o maior peso médio de matéria seca da parte aérea da planta em sua fase inicial de desenvolvimento, sob condições de campo, são consideradas mais vigorosas.

2.3 CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação em nitrogênio líquido é um método eficiente e prático para a conservação dos recursos fitogenéticos.

MEDEIROS e CAVALLAR (1992) definem criopreservação em nitrogênio líquido como sendo a preservação de materiais biológicos a baixas temperaturas (entre

-160 e -196°C) onde sob essa temperatura todos os processos metabólicos são paralisados e mantido em estado latente, proporcionando conseqüentemente uma preservação indefinida.

De acordo com ASHWOOD e SMITH, (1985), na criopreservação a -196°C o material biológico fica armazenado de maneira estável, nessa temperatura pois todos os processos metabólicos, como respiração e atividade enzimática, são inativados. Assim sendo, pode-se supor que no material armazenado por criopreservação, não ocorrem mudanças significativas em função do tempo. O único dispêndio necessário durante a criopreservação é o reabastecimento com nitrogênio líquido, eliminando, assim os problemas associados à manutenção das culturas (ASHWOOD-SMITH, 1985).

Apesar das vantagens da criopreservação, existem problemas decorrentes da complexidade técnica e biológica do processo de congelamento e descongelamento de produtos. Sistemas distintos de cultura reagem diferentemente à criopreservação, tornando-se necessário desenvolver procedimentos específicos para cada tipo de cultura.

IRIONDO (1992), também estudou a preservação em nitrogênio líquido de várias espécies selvagens e cultiváveis, com diferentes teores de umidade e períodos de exposição. Na maioria das espécies nenhuma diferença significativa foi detectada na porcentagem de germinação das sementes nos diferentes teores de umidade.

WIESNER (1994) pesquisou o armazenamento em nitrogênio líquido de sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.), onde observou-se que as sementes apresentaram-se danificadas quando expostas ao N₂L. Nesse trabalho foram avaliados os efeitos de germinação, viabilidade, cotilédones quebrados, vigor e peso seco.

BHAT (1994) afirma que sementes de *Musa balbisiana* com teor de umidade variando entre 13 e 18% (b.u) sobreviveram a exposição ao nitrogênio líquido. Após o descongelamento ocorreu a germinação em torno de 90% dos embriões, o tegumento da semente foi descoberto sendo a principal barreira para permeabilizar e prevenir a germinação.

CHAUDHURY (1995) pesquisou em sementes de Cardamom com teores de umidade possuindo cerca de 7,7 e 14,3% sendo essas criopreservadas com sucesso por um período de um ano no vapor do nitrogênio líquido a (-150°C), apresentando após descongelamento cerca de 80% de germinação.

MUNIFORD (1979) estudou sementes de limão com baixos teores de umidade (1,2% b.u), e sementes recém colhidas. As sementes recém colhidas morreram através da imersão em nitrogênio líquido. As sementes com tegumento não mostraram nenhuma mudança em porcentagens de germinação após o congelamento, mas sementes sem tegumento apresentaram os melhores resultados, embora se tenha observado redução na germinação que foi atribuído aos danos mecânicos.

MEDEIROS e CAVALLARI (1990) realizaram estudos sobre a germinação das sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All) Engl.), quando submetidas a secagem e a imersão em nitrogênio líquido objetivando a conservação desta espécie em banco de germoplasma. Os resultados obtidos mostraram que as sementes de Aroeira podem ser armazenadas em nitrogênio líquido com um teor de umidade de 6% b.u.

STANWOOD (1979) menciona que sementes de 14 espécies de legumes e 2 espécies de flores, foram colocadas em envelopes de papel e esses imersos em nitrogênio líquido por períodos de até 180 dias, não observando efeitos adversos de germinação. Nesse trabalho o mesmo autor menciona que foram testadas sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e ervilha (*Pisum sativum* L.) sendo que essas sementes também não indicaram nenhuma redução na germinação ou no vigor após a exposição em nitrogênio líquido. Assim o autor relata que esse método é eficaz no armazenamento a longo prazo em bancos de sementes.

PENCE (1991) executou um projeto para determinar a viabilidade em sementes silvestres da região de Ohio a criopreservação em nitrogênio líquido. Foram feitos um total de 527 testes em 237 espécies, tendo-se observado que 79% dos testes realizados, as sementes expostas ao N₂L não tiveram nenhum efeito prejudicial em relação a sua germinação.

No entanto, GONZALEZ-BENITO (1995) ao estudar a germinação de sementes de sete cultivares de Aipo (*Apium graveolens*) após o armazenamento em nitrogênio líquido por um período de 30 dias, constatou que a germinação diminuiu significativamente.

Sementes de *Populus deltoides* foram analisadas por PENCE, (1996) para verificar a possibilidade de secagem em fluxo laminar e o armazenamento as temperaturas de 4°C, -20°C e em nitrogênio líquido podendo ser usado para o armazenamento em banco de germoplasma.

Sementes de bambu (*Bambusa arundinacea*) foram armazenadas após serem colocadas em bolsas plásticas herméticas e transparentes a uma temperatura de -70°C de forma gradativa (40°C , -20°C e -70°C). Os resultados indicaram que cerca de 65% das sementes germinaram após um período de um ano (BRAHAMACHARY, 1994).

STANWOOD e SOWA (1995) armazenaram sementes de 14 variedades de cebola (*Allium cepa* L.) as temperaturas de 5, -18 e -196°C e avaliaram os efeitos da germinação durante um período de 10 anos. Os resultados indicaram que a germinação média das sementes armazenadas a -18 e -196°C não declinou ao longo do tempo ficando em torno de 92%, enquanto a germinação de sementes armazenadas a 5°C caiu de 94 para 68%.

WIESNER, et al., (1993) criopreservaram sementes de alfafa (*Medicago sativa* L. subsp. Sativa) em nitrogênio líquido (-196°C) e no vapor de nitrogênio líquido (160°C) por 24 horas e constataram que houve quebra de cotilédones quando exposto ao N_2L em forma de vapor. A quebra de cotilédones foi reduzida quando a semente foi escarificada antes da exposição ao nitrogênio líquido.

O armazenamento de sementes é o método tradicional para a preservação de germoplasmas. Porém, as sementes de várias espécies de árvores são recalcitrantes, elas são sensíveis a umidade e a temperatura e, assim, não podem ser armazenadas a longo prazo de tempo.

ROBERTS, (1973) introduziu o termo ortodoxas para espécies cujas sementes podem ser submetidas a secagem e após armazenadas a baixas temperaturas, permanecendo viáveis por longo período de tempo. Existem ainda as sementes recalcitrantes que perdem a viabilidade quando desidratadas, dificultando sua conservação.

CHADEL et al. (1995) pesquisou em sementes recalcitrantes de chá (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), cacau (*Theobroma cacao* L.) e Jaca (*Artocarpus heterophyllus* L.) onde foram criopreservadas com os teores de umidade de 24, 35 e 31% respectivamente. Os resultados indicaram que a esses níveis de umidade as sementes não toleraram o congelamento em nitrogênio líquido a (-196°C). Alguns casos de sobrevivência foi observado quando sementes de chá e jaca foram crioconservadas a 14% de teor de umidade

NORMAH e VENGADASALAM (1992) relataram que sementes de café (*Coffea liberica* Bull ex Hiern) podem ser criopreservadas com um sucesso de 53,3% de sobrevivência para um teor de umidade de 16,7%, enquanto que os embriões após serem criopreservados com um teor de umidade de 20% obtiveram 86% de sobrevivência. Foi observado também, nesse experimento, que sementes de café com tegumento sobreviveram melhor do que aquelas sem tegumento. Os pesquisadores relataram também que sementes de feijão (*Vigna sesquipedalis* L.) mostraram-se normais com característica de sementes ortodoxas, e tanto as sementes com teor de umidade de 9% como os embriões cortados com teores de umidade de 6,7-10,5%, se criopreservaram com uma sobrevivência de 90%.

A criopreservação em nitrogênio líquido também está sendo utilizada na preservação de cultura de tecido, TANNOURY et al., (1995), utilizaram esse método para criopreservar em nitrogênio líquido o tecido apical do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.) que foi encapsulado com um teor de umidade de 20%. Os resultados não indicaram mudanças significativas na sua propagação após o armazenamento a -196°C.

GONZALEZ -BENITO et al. (1997) observaram que brotos de explantes *in vitro* de plantas em extinção (*Centaurium rigualli* Esteve, *Gentianaceae*) foram criopreservadas com sucesso. Métodos para melhorar a sobrevivência após imersão em nitrogênio líquido (-196°C) foi desenvolvido utilizando a técnica de desidratação-encapsulação para proteção contra os cristais de gelo. Os explantes foram colocados em nitrogênio líquido por 1h e subsequentemente descongelados em banho-maria, mostrando após 8 semanas de cultivo 70% de sobrevivência.

RAJASEHARAN (1994) estudou a criopreservação do pólen de quatro cultivares de rosa, o pólen reteve a viabilidade indexado por germinação *in vitro* por 24 horas e período de um ano de armazenamento em nitrogênio líquido. O pólen criopreservado manteve sua habilidade para fertilizar e produzir novas sementes. De acordo com o autor a disponibilidade do pólen criopreservado permite que a rosa fosse polinizada qualquer hora do ano e em qualquer local. A preservação criogênica também ofereceu a possibilidade de conservar a estrutura do gene haplóide em espécies de rosa, para a facilidade aos bancos criogênicos de pólenes.

Estão sendo feitos esforços internacionais para desenvolver métodos diferentes do tradicional armazenamento, manutenção, conservação e a troca de germoplasmas

com intuito de explorar as possibilidades na criação de “Bancos de Germoplasmas” dos recursos genéticos de plantas raras. Nesta consideração, a cultura de tecido combinada com a tecnologia de criopreservação está sendo vista como ajuda complementar para os métodos já existentes (BAJAJ, 1980).

II. 3 MATERIAL e MÉTODOS

A segunda etapa da pesquisa foi realizada no Setor de Criogenia do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal da Paraíba – Campus II, em Campina Grande – PB.

Para a realização deste trabalho, foram utilizadas 03 variedades de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.), sendo elas: Seridó – 1, CNPA-G2 e CNPA-G3 (Figura 10), cedidas pela Embrapa – Algodão, em Campina Grande.

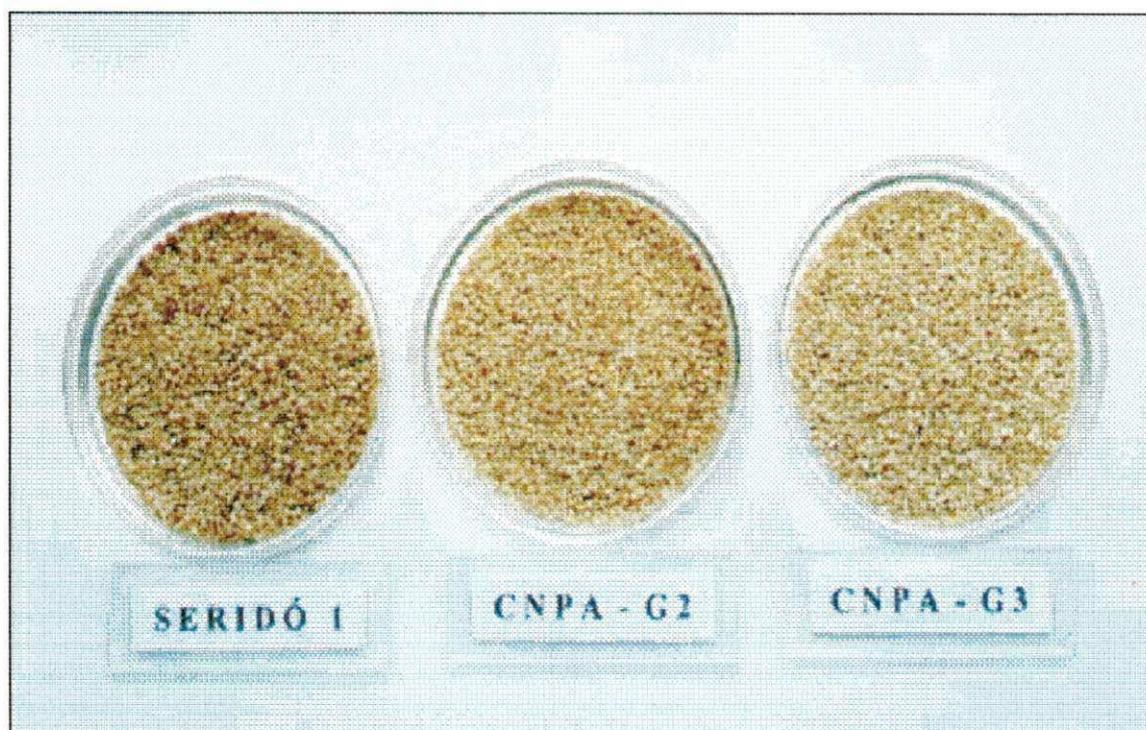


FOTO: Sergio Cobel – Embrapa Algodão

FIGURA 7. Variedades de sementes de gergelim

3.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE LIMITE PARA CRIOPRESERVAÇÃO (TULC)

Para realização do trabalho foi necessário a determinação dos teores de umidade inicial de cada variedade de sementes de gergelim através do método padrão da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, por 24 horas, de acordo com as "Regras de Análise de Sementes" (Brasil, 1992). Foram pesadas 3 amostras de 10g (P_i) para cada variedade de sementes de gergelim através de uma balança eletrônica marca Mettler, modelo PC 440, com precisão de 0,01g. Após o tempo de exposição na estufa, as amostras foram resfriadas em dessecador por um período de 30 minutos e em seguida pesadas, obtendo o peso final (P_f). A porcentagem de umidade foi calculada aplicando-se a seguinte expressão:

$$\%b.u = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100 \quad \text{em que:} \quad (5)$$

P_i = peso inicial da amostra (gramas);

P_f = peso final da amostra (gramas);

% b.u = teor de umidade, base úmida.

Para todo o trabalho onde se fez necessário a determinação do teor de umidade, este método foi utilizado, não só para a determinação do teor inicial das sementes.

Após a determinação do teor de umidade inicial de cada variedade de sementes essas foram secas ou umidificadas até que atingissem os teores de umidade de (2, 4, 6, 8, 10 e 12% b.u.) das sementes. A quantidade de água a ser evaporada ou absorvida, em gramas, foi determinada com a seguinte expressão:

$$P_f = P_i \times \frac{(U_i - U_f)}{(100 - U_f)} \quad \text{em que:} \quad (6)$$

P_f = quantidade de água a ser evaporada ou absorvida (gramas);

P_i = peso inicial das sementes (gramas);

U_f = teor de umidade final das sementes (%);

U_i = teor de umidade inicial das sementes (%).

3.1.1 SECAGEM DAS SEMENTES

Para a secagem das sementes as amostras de gergelim foram colocadas em um secador, (Figura 8) contendo como material dessecante silica gel. As amostras foram pesadas a cada 24 horas, até que atingissem os pesos referentes aos teores de umidade desejados. Para este fim foi utilizada uma balança eletrônica modelo Mettler PC 440, com precisão de 0,001g.

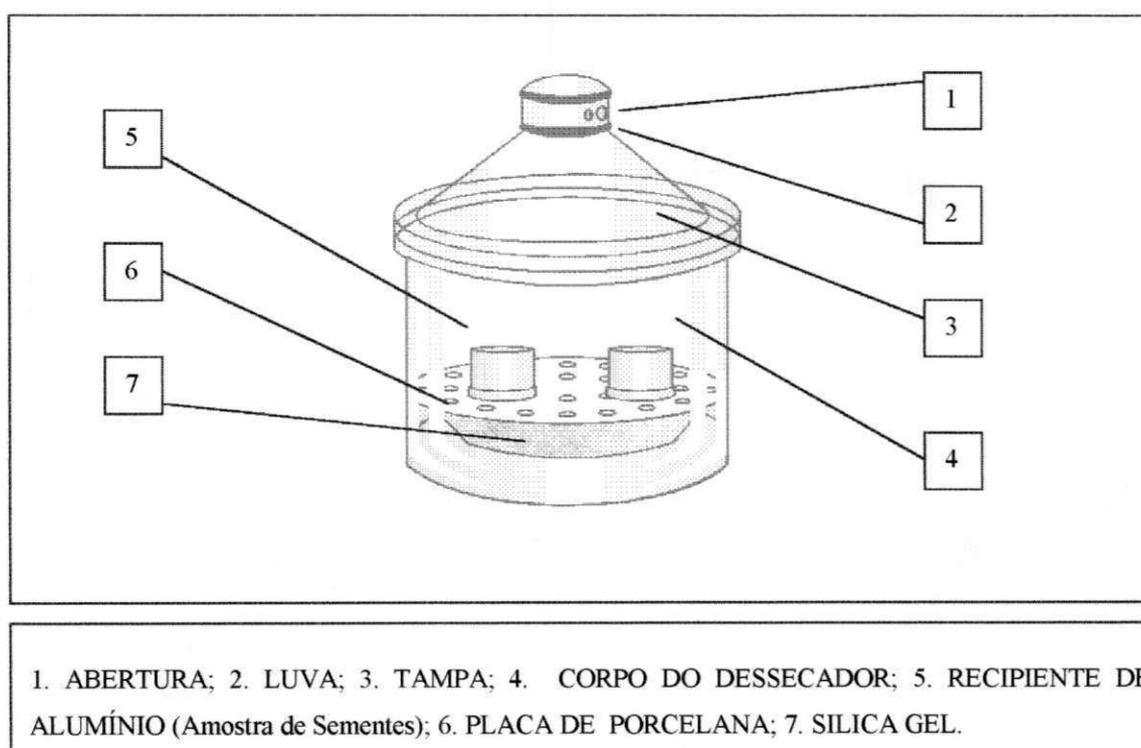


FIGURA 8 – Dessecador utilizado na secagem das sementes de gergelim.

3.1.2 UMEDECIMENTO DAS SEMENTES

Para o umedecimento das sementes as amostras foram colocadas em pequenas cestas de arame suspensas por um anel de PVC e colocadas no interior de recipientes de vidro hermeticamente fechados contendo água destilada (Figura 9) e posteriormente colocadas em estufa incubadora para B.O.D a 10°C. As 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 umidade desejados.

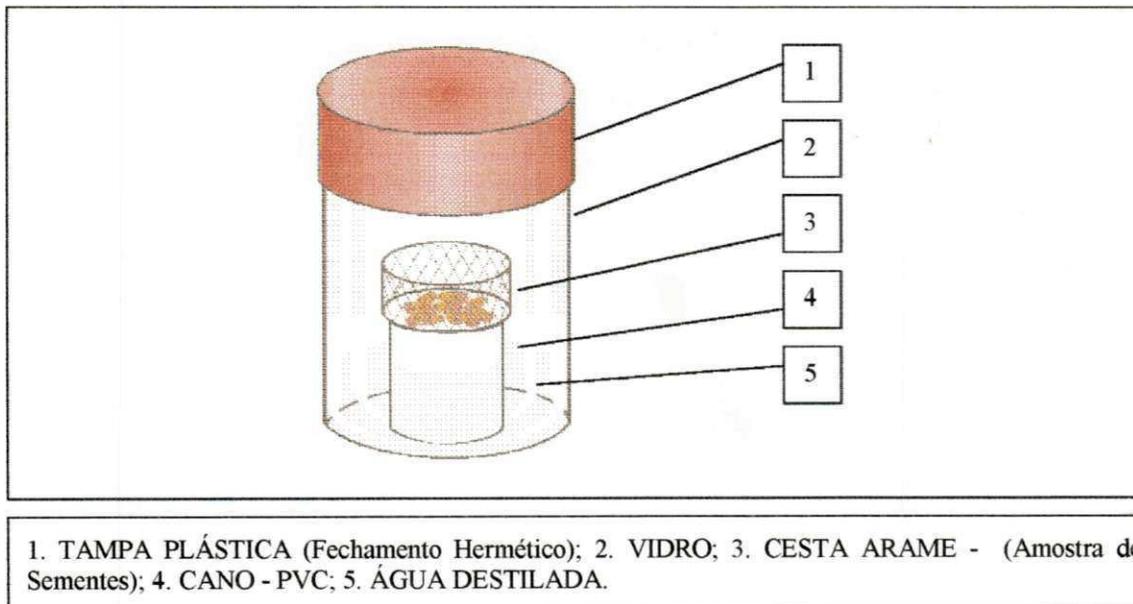
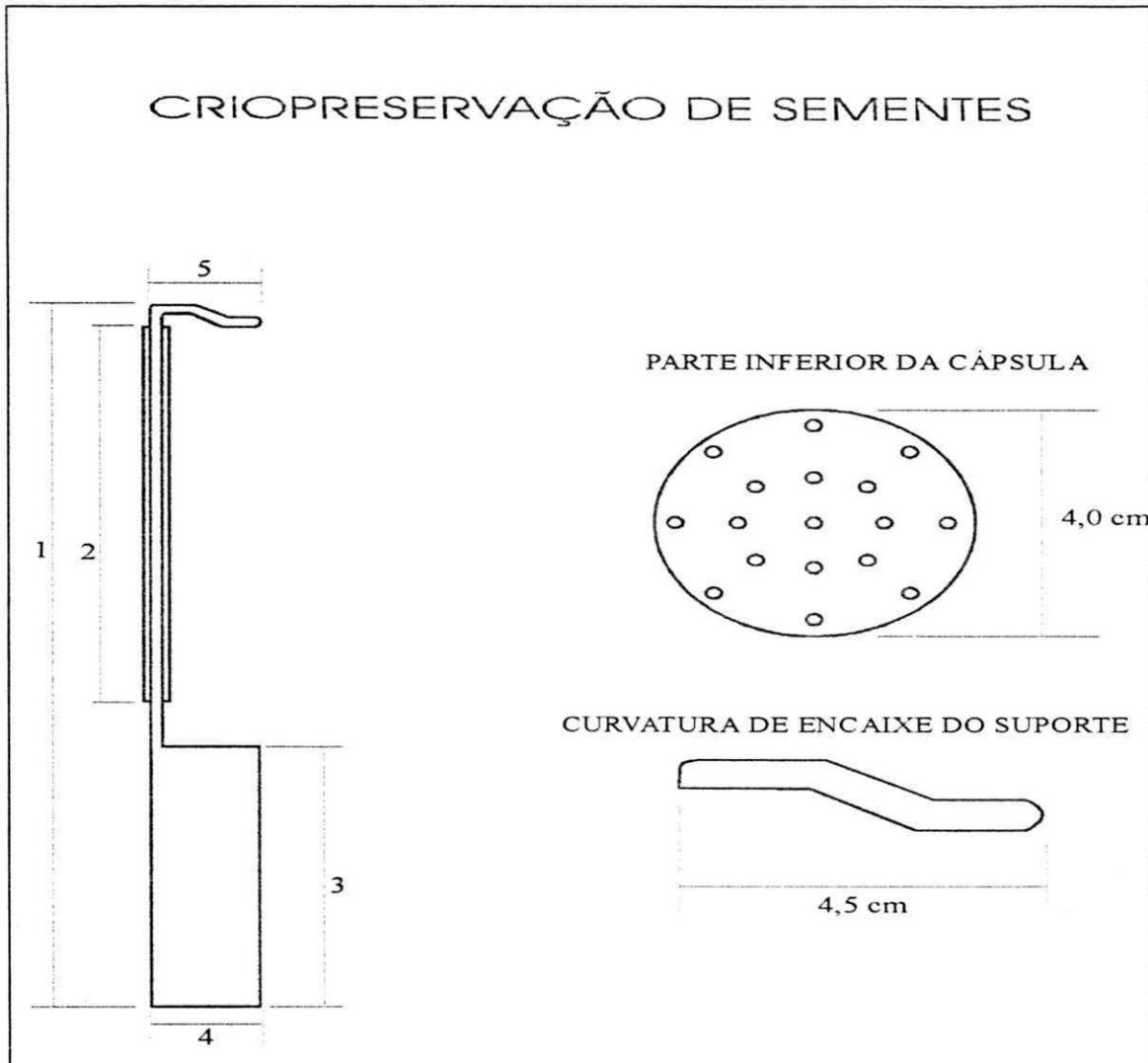


FIGURA 9. Recipiente hermético contendo sementes de gergelim.

As sementes ao atingirem os teores de umidade acima citados, foram colocadas dentro de canister (Figura 10) e criopreservados em botijões criobiológicos (Figura 11) durante um período de 05 dias.

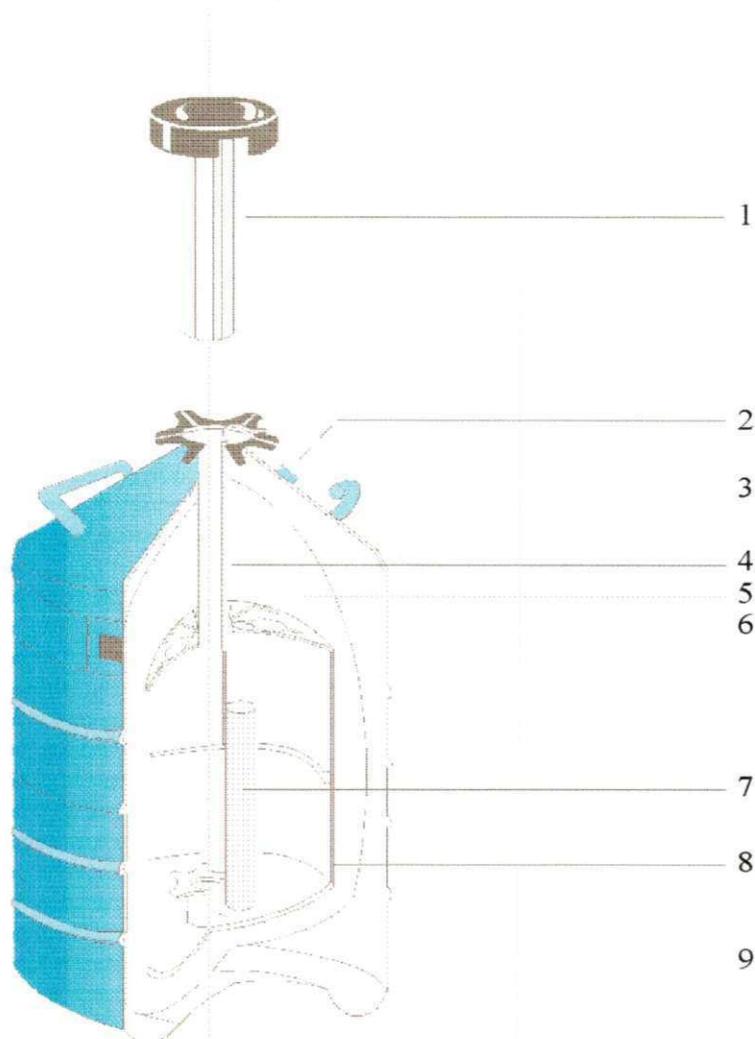


1. CANISTER DE AÇO INOX (50 cm); 2. PROTETOR PLÁSTICO (32 cm); 3. CÁPSULA DE AÇO INOX (18 cm); 4. CURVATURA DE ENCAIXE DO SUPORTE (4,5cm); 5. DIÂMETRO DA CÁPSULA DE AÇO INOX (4,0cm).

FIGURA 10. Canister de aço inox – Padrão

BOTIJÃO CRIOBIOLÓGICO

Principais Componentes



1. PLUGUE; 2. VÁLVULA DE VÁCUO; 3. ALÇA; 4. GARGALO; 5. ISOLAMENTO TÉRMICO; 6. SISTEMA DE MANUTENÇÃO DE VÁCUO; 7. CANÍSTER; 8. RECIPIENTE INTERNO; 9. INVÓLUCRO EXTERNO.

FIGURA 11. Botijão criobiológico, utilizado em processo criogênico.

O canister padrão foi feito em aço inoxidável, no tamanho de 50cm com o objetivo de manter o material biológico imerso em nitrogênio líquido.

O Botijão Criobiológico utilizado é na verdade constituído de dois recipientes, um dentro do outro, unidos por um gargalo de fibra de vidro especial para baixas temperaturas e alto vácuo. O espaço entre os recipientes é com material isolante submetido a alto vácuo. O isolamento térmico confere, ao botijão, a capacidade de reter o nitrogênio no estado líquido (-196°C), baixas perdas por evaporação, viabilizando assim a estocagem e transporte de materiais biológicos vivos por longos períodos, de forma econômica.

Após 05 dias de criopreservadas, as sementes foram submetidas ao descongelamento a temperatura ambiente a $\pm 25^{\circ}\text{C}$, por período de 12 horas. E em seguida foram feitos os testes de germinação e vigor seguindo-se as Regras de Análise de Sementes, (BRASIL, 1992).

Feitas as avaliações destes testes, determinou-se o melhor teor de umidade que as sementes poderiam ser criopreservadas, ou seja, o teor de umidade limite para criopreservação (TULC), das sementes em nitrogênio líquido.

3.2 CRIOPRESERVAÇÃO DAS SEMENTES

As sementes de gergelim, após estabelecido o melhor teor de umidade foram criopreservadas em nitrogênio líquido a temperatura de (-196°C), sendo testados 3 crioprotetores e uma testemunha (sem crioprotetor).

3.2.1 ANÁLISE TERMOMÉTRICA

Foram realizados alguns testes prévios para verificação do tempo que as sementes levaram para ser criopreservadas quando se utiliza os diferentes crioprotetores.

As sementes de gergelim a temperatura ambiente foram imersas, com cautela, no botijão criogênico contendo nitrogênio líquido a (-196°C), sendo realizadas as leituras de precisão até a estabilização do material orgânico com a temperatura oferecida pelo nitrogênio líquido.

Para a realização do teste termométrico, foram utilizados os sensores de platina (PT 1000 1/3 DIN BR = 1000Ω), que ficavam em contato com as sementes, e interligados ao Multímetro Digital Voltcraft 4650 CR. E a leitura dos dados obtidos eram realizados através do Programa Digiscope.

Foram registradas as variações de temperatura quanto a utilização dos diferentes crioprotetores (Crioprotetor 1 – Tubo polietileno; Crioprotetor 2 – Envelope de alumínio e o Crioprotetor 3 – Amido de milho).

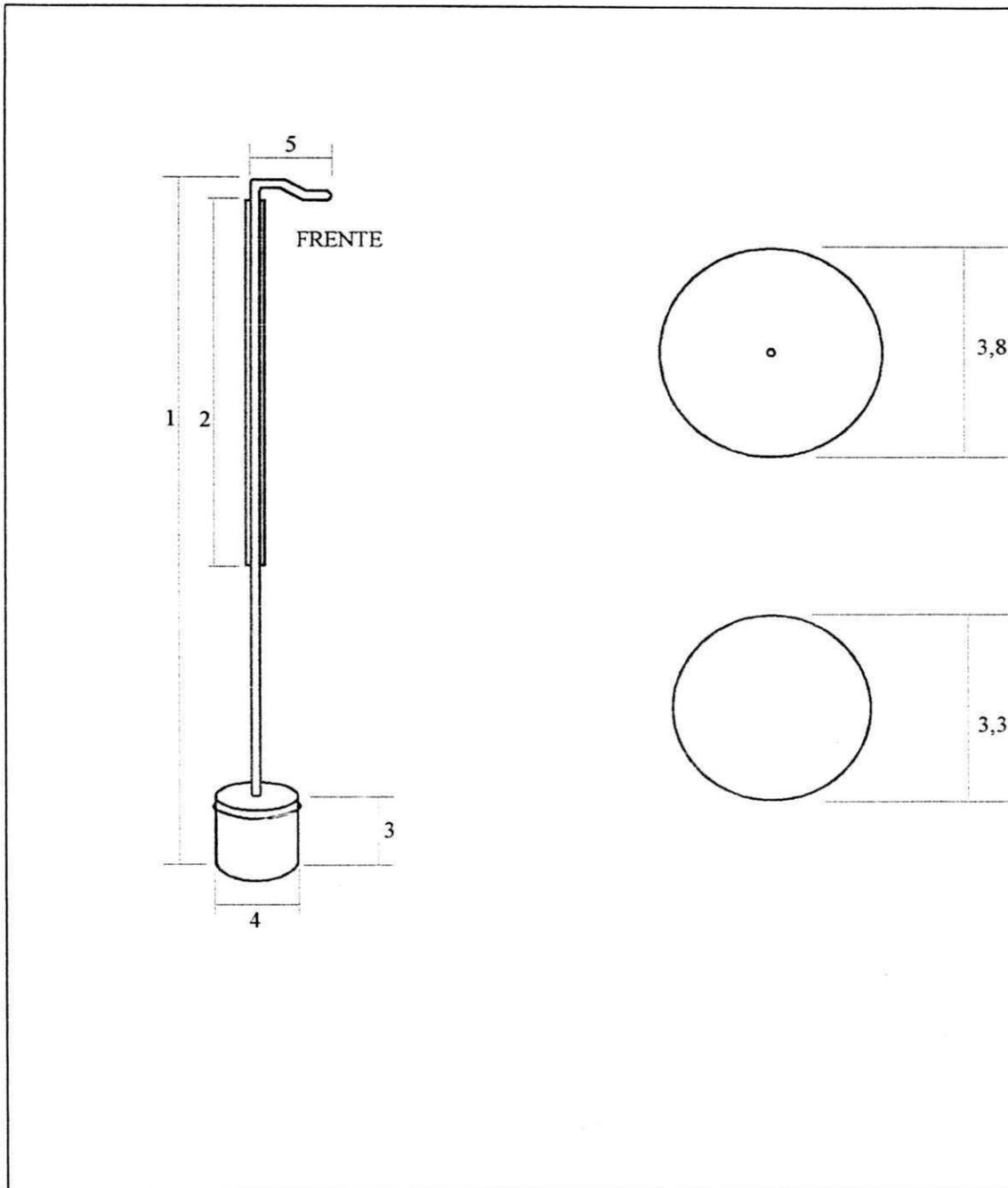
3.2.2 CRIOPROTETORES

Os crioprotetores foram utilizados com o intuito a sugerir novas formas de embalagens, para o armazenamento em nitrogênio líquido, como alternativa simples e de baixo custo.

Foram testados três tipos de crioprotetores e uma testemunha. A testemunha utilizada foi a semente sem crioprotetor. O crioprotetor 1 – Tubo polietileno (Figura 12) consistiu de um tubo de plástico, onde as sementes foram colocadas no interior do tubo e imersos no nitrogênio líquido.

O crioprotetor 2 – Envelope de alumínio (Figura 13) consistiu em um envelope de trifoliar de alumínio, com uma abertura por onde foram colocadas as sementes, para serem criopreservadas.

O crioprotetor 3 – Amido de milho (maizena), consistiu em envolver as sementes em uma massa homogênea de amido de milho e coloca-las no interior do canister padrão.



1. SUPORTE DE AÇO INOX (50 cm); 2. PROTETOR PLÁSTICO (20cm); 3. EMBALAGEM PLÁSTICA (5,0cm); 4. DIÂMETRO DA EMBALAGEM PLÁSTICA (3,3cm) e 5. CURVATURA DE ENCAIXE DO SUPORTE (4,5 cm).

FIGURA 12. Crioprotetor 1 – Tubo polietileno

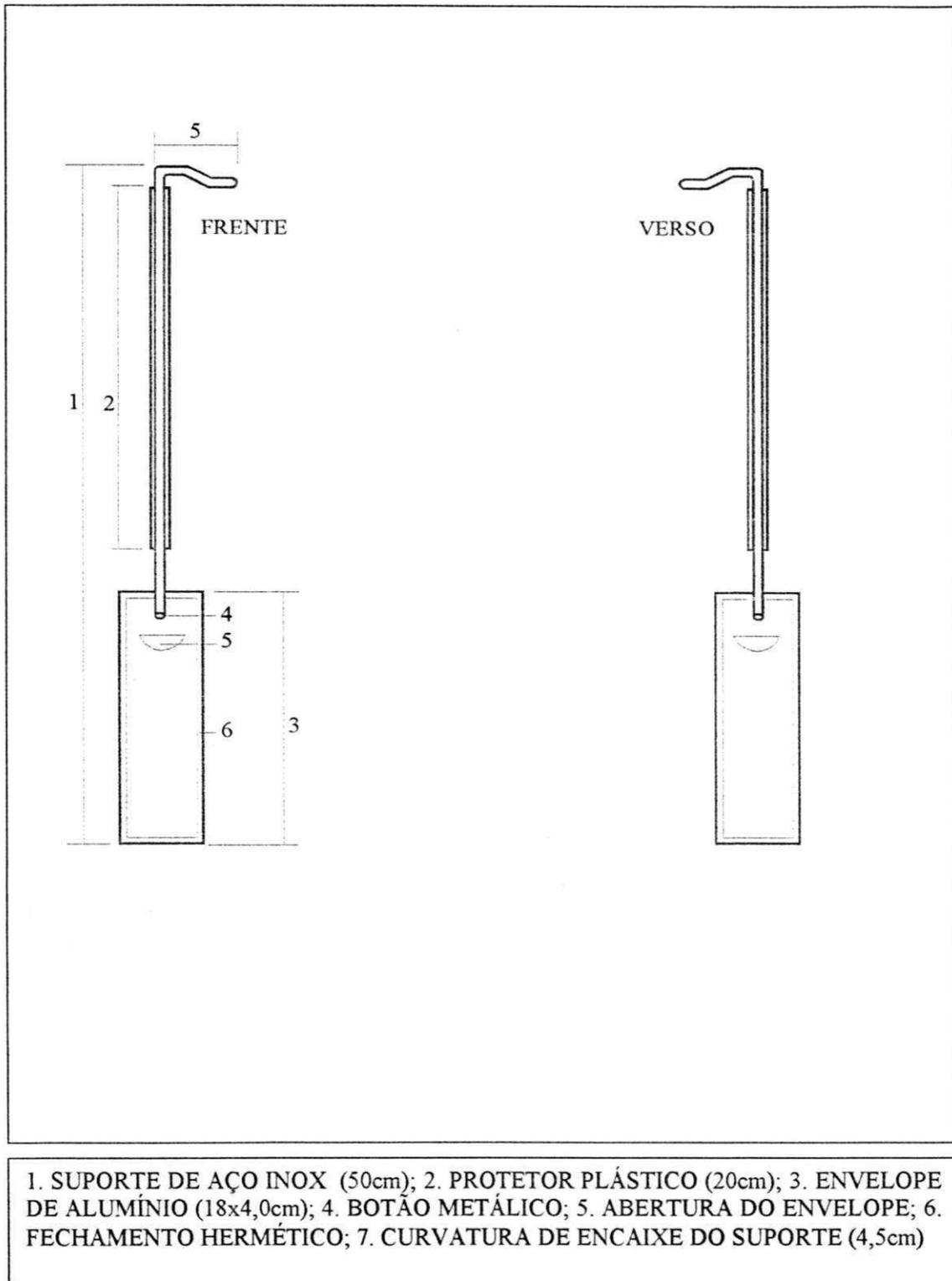


FIGURA 13 . Crioprotetor 2 – Envelope de alumínio

As sementes com crioprotetor e sem crioprotetor foram armazenadas por período de 0, 5, 30 e 60 dias. Depois de decorrido cada um desses períodos as sementes foram descongeladas por duas técnicas e submetidas ao teste padrão de germinação.

3.2.3 PROCESSO DE DESCONGELAMENTO DAS SEMENTES

Para a realização do descongelamento, as sementes foram submetidas a duas técnicas:

- Descongelamento lento a temperatura ambiente de $\pm 25^{\circ}\text{C}$ por 12 horas;
- Descongelamento em banho termostático à temperatura de 40°C por 3 horas.

3.3 ANÁLISE DA QUALIDADE FISIOLÓGICA

3.3.1 TESTE DE GERMINAÇÃO (TG)

Após serem criopreservadas e descongeladas de acordo com cada tratamento as sementes de gergelim eram submetidas a determinação do percentual de germinação. Para essa determinação foram utilizadas placas de Petri, (esterilizadas em estufa a 115°C por 6 a 8 horas), contendo papel germitest, como substrato. (Figura 14)

As sementes eram colocadas no papel germitest umedecido e as placas contendo todo esse material era inserido em estufa incubadora B.O.D a temperatura de 30°C , por período de 7 a 10 dias. Este teste foi realizado seguindo as Regras para Análise de Sementes. (Brasil, 1992).



Foto: Sergio Cobel – Embrapa Algodão

FIGURA 14. Germinação das sementes de gergelim em placas de Petri.

3.3.2 TESTE DE VIGOR (TV)

O teste de vigor foi realizado utilizando o teste indireto de primeira contagem do teste de germinação que consiste em contar o número de plântulas normais imersas no 7º dia depois de semeadas. Os resultados foram obtidos em porcentagem.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o teste do Teor de Umidade Limite para Criopreservação (TULC), foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com arranjo fatorial de 3x6 sendo (3 variedades) x (6 teores de umidade), com quatro repetições.

E para a criopreservação o delineamento experimental utilizado para cada variedade foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 4x2x4 (4 crioprotetores x 2 métodos de descongelamento x 4 períodos de armazenagem), com quatro repetições.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional Assistat (SILVA, 1996).

As médias dos fatores foram comparadas pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

II. 4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE LIMITE PARA CRIOPRESERVAÇÃO – TULC

Na Tabela 20 encontra-se uma análise de variância simplificada da germinação e do vigor das sementes de gergelim, onde observa-se que existem diferenças significativas entre as variedades estudadas, o teor de umidade dessas sementes e a interação entre esses fatores.

TABELA 20. Análise de variância da germinação e vigor das sementes de gergelim variedades: Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 com teores de umidade entre 2 e 12% (b.u.), após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido a -196°C , por 5 dias de armazenamento.

FONTE DE VARIÇÃO	GRAU DE LIBERDADE	GERMINAÇÃO F	VIGOR F
Variedade	2	271,07**	66,14**
Umidade	6	131,85**	98,38**
Variedade x Umidade	12	37,79**	6,25**
Resíduo	63		
Total	83		

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Na Tabela 21 são identificados os valores médios representativos dos testes de germinação e vigor (TG e TV), para as 3 variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3), com o teor de umidade de 2, 4, 6, 8, 10 e 12% (b.u), quando submetidas a técnica de criopreservação com imersão em nitrogênio líquido (-196°C), com a finalidade de determinar o teor de umidade limite para criopreservação (TULC).

Ainda na Tabela 21 observa-se que a germinação das sementes de gergelim das variedades Seridó-1; CNPA-G2 e CNPA-G3, depois de serem submetidas a criopreservação por 5 dias de armazenamento, em termos de média, diferem significativamente entre si a nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey e o vigor dessas sementes são iguais entre si para as variedades CNPA-G2 e CNPA-G3, sendo essas estatisticamente diferentes da variedade Seridó-1. Nessa tabela constata-se

também que, em termos de média, a semente de gergelim, variedade CNPA-G3, foi a que melhor se comportou para efeito de criopreservação.

Também podemos constatar que em termos de média, o melhor teor de umidade para criopreservação das sementes de gergelim está em torno de 6% base úmida, embora existam diferenças significativas na germinação e vigor das sementes de gergelim entre os valores iniciais e depois da criopreservação das sementes por 5 dias de armazenagem.

Isso indica que para determinados tipos de sementes existe um teor de umidade limite na qual elas toleram a criopreservação. Este fato foi comprovado por (DINIZ, 1999), onde afirma que o teor de umidade limite para criopreservação de sementes de milho (*Zea mays* L.), das variedades BR-451, BR-201, BR-2121 e CMS-54 está em torno de 9% (b.u), depois de submeter essas 3 variedades em nitrogênio líquido a -196°C por período de 3 dias.

TABELA 21. Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim depois de submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido a -196°C, por período de 5 dias, para os fatores variedade e teor de umidade.

VARIETADES		
	GERMINAÇÃO	VIGOR
Seridó - I	65,86 c	14,57 b
CNPA - G2	81,93 b	25,43 a
CNPA - G3	90,00 a	26,86 a
DMS	2,54	2,86
TEOR DE UMIDADE		
Testemunha	98,33 a	47,50 a
2	58,17 e	10,83 d
4	75,17 d	10,00 d
6	91,83 b	24,33 b
8	81,50 c	24,00 bc
10	76,00 d	20,50 bc
12	73,83 d	18,83 c
DMS	4,91	5,43

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Na Tabela 22 encontram-se os valores de germinação das sementes de gergelim para a interação entre os fatores: variedades e teor de umidade, depois das sementes serem submetidas a criopreservação (-196°C) por um período de 5 dias de armazenagem, onde analisando-se podemos constatar que a germinação das sementes

de gergelim, variedade Seridó-1 e CNPA-G3, com teor de umidade de 6% (b.u.) não diferem estatisticamente da testemunha. Constata-se também nessa tabela, que a variedade CNPA-G3 não apresenta diferença significativa com a testemunha, para as sementes com teores de umidade de 8, 10 e 12% (b.u.). Já para a semente de gergelim, variedade CNPA-G2, a germinação diminuiu significativamente ao nível de 1% de probabilidade para todos os teores de umidade utilizados na criopreservação das sementes implicando em dizer que a variedade CNPA-G2 é a mais sensível a criopreservação das variedades estudadas.

Na Tabela 23 encontram-se os percentuais de vigor das sementes de gergelim depois da criopreservação a -196°C por um período de 5 dias. Nessa tabela verifica-se que todas as 3 variedades estudadas diminuem significativamente entre si, mas ambas tendem, a diferir da variedade Seridó-1. Observa-se também que para essas 3 variedades de sementes de gergelim os teores de umidade que menos afetou o vigor das sementes está entre 6 e 10% (b.u.).

Analisando-se o que ocorreu com o vigor das sementes de gergelim percebe-se que na criopreservação o tempo de descongelamento pode estar interferindo no resultado, pois a semente como um todo, ou seja, no seu interior, pode não ter atingido a temperatura ambiente em 12 horas o que poderia retardar o seu desenvolvimento. Este fato pode ser realidade já que o teste de vigor foi realizado pela primeira contagem do teste de germinação, o que na realidade dá um indicativo de rapidez de crescimento da plântula, podendo ser retardada pela ação de uma temperatura menor no interior das sementes.

TABELA 22. Valores médios de germinação das sementes de gergelim para a interação entre os fatores: teor de umidade e variedades, depois de submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido a -196°C , por período de 5 dias.

TEOR DE UMIDADE (%)	V A R I E D A D E S					
	Seridó - 1		CNPA - G2		CNPA - G3	
Testemunha	97,00	a A	99,00	a A	99,00	a A
2	41,00	d C	56,00	d B	77,50	b A
4	78,50	b A	73,00	c A	74,00	b A
6	90,00	a A	90,00	b A	95,50	a A
8	61,50	c C	86,50	b B	96,50	a A
10	49,50	d C	84,00	b B	94,50	a A
12	43,50	d C	85,00	b B	93,00	a A

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.
DMS / Linha = 6,71 (letras maiúsculas) - DMS / Coluna = 8,50 (letras minúsculas)

TABELA 23. Valores médios de vigor das sementes de gergelim para a interação entre os fatores: teor de umidade e variedades, depois de submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido a -196°C por período de 5 dias.

TEOR DE UMIDADE (%)	VARIETADES					
	Seridó - I		CNPA - G2		CNPA - G3	
Testemunha	43,50 a	B	55,00 a	A	44,00a	B
2	7,00 c	B	9,50 c	AB	16,00 d	A
4	8,00 bc	B	6,50 c	B	15,50 d	A
6	17,00 b	B	24,50 b	A	31,50 b	A
8	11,50 bc	B	28,00 b	A	33,00 b	A
10	8,00 bc	B	27,00 b	A	26,50 bc	A
12	7,50 c	B	27,50 b	A	21,50 cd	A

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.
DMS / Linha = 7,42 (letras maiúsculas) - DMS / Coluna = 9,41 (letras minúsculas)

4.2 CRIOPRESERVAÇÃO DAS SEMENTES IMERSAS EM NITROGÊNIO LÍQUIDO

4.2.1 CRIOPROTETORES

Com o objetivo de analisar o comportamento das sementes de gergelim, foram criados e testados os crioprotetores para determinar a sua capacidade como isolante térmico, minimizando o choque exercido pela temperatura de exposição das sementes ao nitrogênio líquido.

Vários materiais foram submetidos a testes preliminares, no entanto o Crioprotetor 1 - Tubo polietileno apresentou-se como "bom" isolante térmico impedindo que a temperatura interna do tubo chegasse rapidamente ao nível máximo oferecido pelo nitrogênio líquido.

O Crioprotetor 2 - Envelope de alumínio foi quem apresentou melhor desempenho como isolante térmico, resistindo melhor e tendo um período muito longo de congelamento gradativo das sementes.

O Crioprotetor 3 - Amido de milho como isolante natural apresentou rapidez no ultra congelamento, talvez devido ao fato da massa líquida facilitar na formação dos cristais. Todos os dados obtidos equivalentes a realização do teste termométrico com os crioprotetores estão no apêndice II-B em anexo.

4.2.2 CRIOPRESERVAÇÃO UTILIZANDO CRIOPROTETORES

Uma vez identificado o teor de umidade limite para criopreservação das sementes de gergelim variedades Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 que foi de 6% b.u., foi realizada a criopreservação das sementes por 0, 5, 30 e 60 dias, utilizando 4 crioprotetores (Sem Crioprotetor, Crioprotetor 1- Tubo polietileno, Crioprotetor 2 – Envelope de alumínio e Crioprotetor 3 – Amido de milho) e dois processos de descongelamento (temperatura ambiente a 25°C e banho termostatizado a 40°C).

A germinação e o vigor das sementes de gergelim variedades Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 submetidas aos tratamentos acima citados encontram-se na Tabela 24, sendo que os valores relativos as médias para os testes de germinação e vigor da Tabela 24 encontram-se em anexo, no apêndice II-B.

Pode-se observar na Tabela 24 que as sementes armazenadas pelos períodos acima citados apresentaram variações de sua germinação e vigor para os crioprotetores utilizados, onde verifica-se que as sementes que foram crioprotetidas com o tubo polietileno (crioprotetor 1) e com o envelope de alumínio (crioprotetor 2) os crioprotetores 1 e 2 apresentaram de uma maneira para índices superiores de germinação e vigor quando comparadas com as sementes sem crioprotetores e crioprotetidas com o amido de milho (crioprotetor 3), para todas as variedades de sementes avaliadas.

Verifica-se também na Tabela 24 que as sementes descongeladas a temperatura ambiente (TA) favoreceu o desenvolvimento da germinação e do vigor para as variedades Seridó-1 e CNPA-G2 para todos os períodos de armazenagem, quando descongelamento é feito em banho termostatizado (40°C), entretanto a variedade CNPA-G3 apresentou maiores índices de germinação e vigor para todos os crioprotetores estudados apenas no período de 60 dias de armazenagem.

TABELA 24. Valores médios representativos da germinação e vigor das sementes de gergelim variedades Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3 utilizando a técnica de criopreservação por imersão em nitrogênio líquido a -196°C , utilizando diversos crioprotetores, duas temperaturas de descongelamento e quatro períodos de armazenagem.

GERMINAÇÃO (Seridó - 1)								
P. armazen. (dias)	0		5		30		60	
	Temp. descong.		Temp. descong.		Temp. descong.		Temp. descong.	
Crioprotetores	T.A	B.T.	T.A	B.T.	T.A	B.T.	T.A	B.T.
Sem Crioprotetor	96	98	69	71	68	69	84	73
Crioprotetor 1	92	96	81	68	82	67	94	77
Crioprotetor 2	92	93	84	66	86	67	79	80
Crioprotetor 3	88	90	31	29	29	29	54	65
VIGOR (Seridó - 1)								
Sem Crioprotetor	52	60	21	46	18	48	52	45
Crioprotetor 1	56	58	33	23	30	23	64	50
Crioprotetor 2	48	52	43	23	45	23	42	45
Crioprotetor 3	40	43	19	15	10	15	23	25
GERMINAÇÃO (CNPA - G2)								
Sem Crioprotetor	97	97	66	71	74	72	92	85
Crioprotetor 1	95	96	85	73	85	74	92	90
Crioprotetor 2	95	92	84	86	88	87	89	94
Crioprotetor 3	90	92	48	66	49	68	86	83
VIGOR (CNPA - G2)								
Sem Crioprotetor	65	67	33	31	32	31	61	48
Crioprotetor 1	62	63	54	45	54	49	60	67
Crioprotetor 2	60	62	36	43	43	46	72	68
Crioprotetor 3	60	63	19	21	19	31	43	34
GERMINAÇÃO (CNPA - G3)								
Sem Crioprotetor	96	92	84	66	87	69	94	94
Crioprotetor 1	94	91	93	91	94	92	93	92
Crioprotetor 2	90	91	95	92	95	94	93	95
Crioprotetor 3	88	90	52	63	52	65	74	83
VIGOR (CNPA - G3)								
Sem Crioprotetor	63	60	46	47	47	50	72	74
Crioprotetor 1	62	60	46	62	52	65	76	69
Crioprotetor 2	60	59	63	63	65	65	76	68
Crioprotetor 3	58	60	22	25	19	25	41	44

LEGENDA:

Crioprotetor 1 - Tubo polietileno; Crioprotetor 2 - Envelope de alumínio e o Crioprotetor 3 - Amido de milho.
 Temperatura de descongelamento : T.A. Temperatura Ambiente; B.T. Banho Termostatizado (40°C).
 Período de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias.

Na Tabela 25 encontra-se uma análise de variância simplificada da germinação e do vigor das sementes de gergelim, onde observa-se que existem diferenças

significativas entre os processos de descongelamento, crioprotetores e o período de armazenagem das sementes avaliadas, como também a interação desses fatores, exceção se faz para a germinação das sementes de gergelim variedades CNPA-G2 e CNPA-G3, onde não existem diferenças significativas entre os processos de congelamento. Este fato também foi observado para o vigor das sementes de gergelim para as variedades Seridó-1 e CNPA-G2.

TABELA 25. Análise de variância simplificada da germinação e vigor das sementes de gergelim com teor de umidade de 6% (b.u) após criopreservação em nitrogênio líquido para os fatores descongelamento, crioprotetores, período de armazenamento e suas interações.

FONTE DE VARIÇÃO	G.L	GERMINAÇÃO			VIGOR		
		F			F		
		Seridó-1	CNPA-G2	CNPA-G3	Seridó-1	CNPA-G2	CNPA-G3
Descongelamento	1	29,44**	0,86ns	2,26ns	0,01ns	0,00ns	5,75*
Crioprotetores	3	409,79**	72,76**	391,00**	129,68**	59,54**	290,69**
Período de armazen.	3	423,49**	155,33**	134,09**	229,66**	137,56**	145,64**
Desc. x Criop.	3	15,14**	13,48**	54,85**	43,21**	1,69**	5,03**
Desc. x P. armaz.	3	12,70**	1,46**	3,25**	4,96**	1,90**	6,59**
Criop. x P. armaz.	9	44,34**	12,61**	62,51**	10,62**	9,81**	34,82**
Desc.xCriop.xP.arm	9	10,47**	5,26**	7,55**	16,58**	2,43*	3,35**
Resíduo	96						
Total	127						

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade.

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 26 encontra-se os valores médios da germinação e vigor das sementes de gergelim variedade Seridó-1 para os fatores descongelamento, crioprotetores e período de armazenamento. Nessa tabela observa-se que existem diferenças significativas da germinação e do vigor das sementes quando se utiliza os crioprotetores 1 e 2, quando comparado com os demais crioprotetores.

Relativo ao fator período de armazenagem constata-se que as sementes depois de armazenadas por 60 dias apresentaram um percentual de germinação e vigor, superiores aos obtidos com 5 e 30 dias de armazenamento.

Para o fator métodos de descongelamento utilizado, o índice de germinação a temperatura ambiente apresentou-se melhor quando comparado com o banho

termostatizado (40°C). Todavia para o percentual de vigor das sementes não se observa diferenças significativas entre os diferentes métodos de descongelamento.

Quanto a criopreservação das sementes de gergelim (Seridó-1), envolvendo a interação entre os fatores crioprotetores e descongelamento, verifica-se na Tabela 27 que a germinação das sementes são significativamente superiores quando são descongeladas a temperatura ambiente, quando comparada com o descongelamento realizado no banho termostatizado (40°C), para os crioprotetores 1 e 2.

Ainda na Tabela 27 constata-se que apesar do crioprotetor 3 apresentar os índices mais baixos de germinação e vigor, quando comparado com os demais, não se observa uma diferença significativa entre os dois métodos de descongelamento. Este fato também é observado para a germinação das sementes sem crioprotetor.

TABELA 26. Valores médios da germinação e do vigor das sementes de gergelim variedade Seridó-1, submetida a criopreservação em nitrogênio líquido, com 6% b.u., para os fatores descongelamento, crioprotetores e período de armazenagem.

GERMINAÇÃO					
DESCONGELAMENTO		CRIOPROTETORES		PERÍODO DE ARMAZENAGEM (dias)	
T. A	75,39 a	S. Criop.	78,34 b	0	93,06 a
B. T	71,50 b	Criop. 1	81,84 a	5	62,34 c
		Criop. 2	81,78 a	30	61,81 c
		Criop. 3	51,81 c	60	76,56 b
DMS= 1,42		DMS= 2,65		DMS= 2,65	
MG= 73,45		CV%= 5,52			
VIGOR					
T. A	37,02 a	S. Criop.	42,72 a	0	51,03 a
B. T	37,08 a	Criop. 1	41,91 a	5	27,59 c
		Criop. 2	39,97 a	30	26,44 c
		Criop. 3	23,59 b	60	43,13 b
DMS = 1,58		DMS = 2,94		DMS = 2,94	
MG = 37,05		CV% = 12,12			

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Crioprotetor 1. Tubo polietileno; Crioprotetor 2. Envelope de alumínio; Crioprotetor 3. Amido de milho.

Temperatura de descongelamento: T.A. Temperatura Ambiente; B.T. Banho Termostatizado (40°C).

Período de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias.

TABELA 27. Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade Seridó-1 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores crioprotetores e descongelamento.

GERMINAÇÃO					
DESCONGELAMENTO	CRIOPROTETORES				
	S. CRIOP.	CRIOP. 1		CRIOP. 2	CRIOP. 3
Temp. Ambiente	79,00 a B	86,88 a A	85,13 a A	50,56 a C	
Banho Termostatizado	77,69 a A	76,81 b A	78,44 b A	53,06 a B	
DMS/coluna= 2,85 (letras minúsculas)			DMS/linha= 3,75 (letras minúsculas)		
VIGOR					
Temp. Ambiente	35,63 b B	45,50 a A	44,19 a A	22,75 a C	
Banho Termostatizado	49,81 a A	38,31 b B	35,75 b B	24,44 a C	
DMS/coluna= 3,15 (letras minúsculas)			DMS/linha= 4,16 (letras minúsculas)		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Crioprotetor 1. Tubo polietileno; Crioprotetor 2. Envelope de alumínio; Crioprotetor 3. Amido de milho.

Temperatura de descongelamento : T.A. Temperatura Ambiente; B.T. Banho Termostatizado (40°C).

Na Tabela 28 encontra-se a interação entre os fatores período de armazenagem e métodos de descongelamento das sementes de gergelim onde constata-se que não existem diferenças significativas entre os métodos de descongelamento no início do período de armazenagem e ao final dos 60 dias, embora observa-se que para o vigor este fato só ocorra aos 5 e 30 dias de armazenagem das sementes.

Analizando-se a germinação e o vigor das sementes para cada método de descongelamento ao longo do período de armazenagem, constata-se uma diminuição da germinação e do vigor das sementes durante o período de armazenagem para os dois métodos de descongelamento (temperatura ambiente e banho termostatizado).

Analizando-se a Tabela 29, onde se encontra os valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim para a interação entre os fatores crioprotetores e período de armazenagem, observa-se que a germinação das sementes utilizando-se os crioprotetores 1 e 2 mantêm-se estatisticamente iguais para cada período de armazenagem, embora ao longo do período exista uma diminuição significativa dessa germinação

Ainda na Tabela 29 constata-se que o vigor das sementes também diminui com o período de armazenagem para todos os crioprotetores, exceção se faz ao crioprotetor 1 quando se compara o vigor inicial da semente e após 60 dias de armazenagem.

Na Tabela 30 encontra-se a comparação entre média da germinação e do vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G2 para os fatores isolados de métodos de

descongelamento, crioprotetores e período de armazenagem. Nessa tabela verifica-se que não existem diferenças de germinação e vigor das sementes quando essas são descongeladas a temperatura ambiente ou em banho termostatizado (40°C). Observa-se também na tabela que o crioprotetor 2 (envelope de alumínio) se mostra mais eficiente na crioproteção da variedade CNPA-G2 e que existe diminuição significativa de germinação e vigor das sementes com o período de armazenamento. Ainda em relação a Tabela 30 nota-se que o tempo de armazenagem da semente de 60 dias apresentou os maiores índices de germinação e vigor quando comparado com 5 e 30 dias, sendo inferior apenas a testemunha.

TABELA 28. Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade Seridó-1 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores período de armazenagem e métodos de descongelamento.

GERMINAÇÃO								
DESCONGELAMENTO	PERÍODO DE ARMAZENAGEM (dias)							
	0		5		30	60		
Temp. Ambiente	91,94 a	A	66,25 a	C	66,00 a	C	77,38 a	B
Banho Termostatizado	94,19 a	A	58,44 b	C	57,63 b	C	75,75 a	B
DMS/coluna= 2,85 (letras minúsculas)			DMS/linha= 3,75 (letras minúsculas)					
VIGOR								
Temp. Ambiente	48,94 b	A	28,50 a	B	25,63 a	B	45,00 a	A
Banho Termostatizado	53,13 a	A	26,69 a	C	27,25 a	C	41,25 ab	B
DMS/coluna= 3,15 (letras minúsculas)			DMS/linha= 4,16 (letras minúsculas)					

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Temperatura de descongelamento : T.A. Temperatura Ambiente; B.T. Banho Termostatizado (40°C).

Período de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias.

TABELA 29. Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade Seridó-1 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores tempo de armazenagem e crioprotetores.

GERMINAÇÃO				
CRIOPROTETORES	PERÍODO DE ARMAZENAGEM (dias)			
	0	5	30	60
Sem Crioprotetor	96,88 a A	70,25 a C	68,00 b C	78,25 b B
Crioprotetor 1	93,88 a A	74,00 a C	74,25 a C	85,25 a B
Crioprotetor 2	92,50 a A	75,13 a C	76,25 a C	83,25 a B
Crioprotetor 3	89,00 b A	30,00 b C	28,75 c C	59,50 c B
DMS/coluna= 5,31 (letras minúsculas)		DMS/linha= 5,31 (letras minúsculas)		
VIGOR				
Sem Crioprotetor	56,00 a A	33,38 a C	33,00 a C	48,50 b B
Crioprotetor 1	56,88 a A	27,50 a B	26,25 b B	57,00 a A
Crioprotetor 2	49,88 b A	32,75 a C	34,00 a C	43,25 b B
Crioprotetor 3	41,38 c A	16,75 b C	12,50 c C	23,75 c B
DMS/coluna= 5,88 (letras minúsculas)		DMS/linha= 5,88 (letras minúsculas)		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Crioprotetor 1. Tubo polietileno; Crioprotetor 2. Envelope de alumínio; Crioprotetor 3. Amido de milho.

Período de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias.

TABELA 30. Valores médios da germinação e do vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G2, submetida a criopreservação em nitrogênio líquido, com 6% b.u., para os fatores descongelamento, crioprotetores e período de armazenagem.

GERMINAÇÃO					
Descongelamento		Crioprotetores		Período de armazenagem (dias)	
T. A	82,02 a	S. Criop.	81,66 c	0	94,25 a
B. T	82,81 a	Criop. 1	86,16 b	5	72,28 c
		Criop. 2	89,38 a	30	74,44 c
		Criop. 3	72,47 d	60	88,69 b
DMS= 1,71		DMS= 3,19		DMS= 3,19	
MG= 82,41		CV%= 5,91			
VIGOR					
T. A	48,16 a	S. Criop.	45,88 b	0	62,66 a
B. T	48,23 a	Criop. 1	56,50 a	5	35,72 c
		Criop. 2	53,59 a	30	37,94 c
		Criop. 3	36,81 c	60	56,47 b
DMS = 2,27		DMS = 4,23		DMS = 4,23	
MG = 48,20		CV% = 13,41			

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Crioprotetor 1. Tubo polietileno; Crioprotetor 2. Envelope de alumínio; Crioprotetor 3. Amido de milho.

Temperatura de descongelamento: T.A. Temperatura Ambiente; B.T. Banho Termostatizado (40°C).

Período de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias.

Os percentuais de germinação e vigor para a variedade CNPA-G2 do gergelim, para a interação entre os fatores crioprotetores e descongelamento encontram-se na Tabela 31 onde verifica-se que as sementes descongeladas a temperatura ambiente apresentaram os maiores índices de germinação para todos os crioprotetores, no entanto para o vigor não se observaram diferenças significativas entre as temperaturas.

Nessa tabela constata-se que não existem diferenças significativas na germinação das sementes quando essas são descongeladas a temperatura ambiente ou banho termostatizado (40°C) sem o uso de crioprotetor ou crioprotegidas com envelope de alumínio (crioprotetor 2). Este fato também é observado para o vigor das sementes só que para todos os crioprotetores estudados.

Na Tabela 31 observa-se também que a germinação das sementes descongeladas a temperatura ambiente, não diferem significativamente entre si quando são crioprotegidas com o tubo polietileno (crioprotetor 1) em comparação a crioproteção feita com o envelope de alumínio (crioprotetor 2). Na Tabela 32 onde está analisada estatisticamente a interação entre os fatores métodos de descongelamento e períodos de armazenagem, observa-se que para cada período de tempo estudado não existem diferenças significativas entre os diferentes métodos de descongelamento, exceção se faz ao vigor das sementes aos 60 dias onde se observa diferença significativa entre os dois métodos de descongelamento das sementes.

Analisando-se cada método de descongelamento em função do período constata-se que a germinação das sementes não diferem entre si no início e no final (60 dias) do período de armazenagem. Este fato também é observado a temperatura ambiente. Já para o descongelamento das sementes feita em banho termostatizado (40°C) o vigor das sementes diminui significativamente com o período de armazenagem.

TABELA 31. Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G2 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores crioprotetores e método de descongelamento.

GERMINAÇÃO					
DESCONGELAMENTO	CRIOPROTETORES				
	S. CRIOP.	CRIOP. 1		CRIOP. 2	CRIOP. 3
Temp. Ambiente	82,06 a B	89,19 a A	88,94 a A	67,88 b C	
Banho Termostatizado	81,25 a B	83,13 b B	89,81 a A	77,06 a C	
DMS/coluna= 3,42 (letras minúsculas)			DMS/linha= 4,51 (letras minúsculas)		
VIGOR					
Temp. Ambiente	47,56 a B	57,19 a A	52,56 a A	35,31 a C	
Banho Termostatizado	44,19 a B	55,81 a A	54,63 a A	38,31 a C	
DMS/coluna= 4,54 (letras minúsculas)			DMS/linha= 5,98 (letras minúsculas)		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.
 Crioprotetor 1. Tubo polietileno; Crioprotetor 2. Envelope de alumínio; Crioprotetor 3. Amido de milho.
 Temperatura de descongelamento: T.A. Temperatura Ambiente; B.T. Banho Termostatizado (40°C).

TABELA 32. Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade: CNPA-G2 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores período de armazenagem e método de descongelamento.

GERMINAÇÃO					
DESCONGELAMENTO	PERÍODO DE ARMAZENAGEM (dias)				
	0	5	30	60	
Temp. Ambiente	94,19 a A	70,63 a B	73,75 a B	89,50 a A	
Banho Termostatizado	94,31 a A	73,94 a B	75,13 a B	87,88 a A	
DMS/coluna= 3,42 (letras minúsculas)			DMS/linha= 4,51 (letras minúsculas)		
VIGOR					
Temp. Ambiente	61,56 a A	35,31 a B	37,00 a B	58,75 a A	
Banho Termostatizado	63,75 a A	36,13 a C	38,88 a C	54,19 b B	
DMS/coluna= 4,54 (letras minúsculas)			DMS/linha= 5,98 (letras minúsculas)		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.
 Temperatura de descongelamento: T.A. Temperatura Ambiente; B.T. Banho Termostatizado (40°C).
 Período de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias.

Na Tabela 33 encontra-se a germinação e vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G2 para a interação entre os os fatores crioprotetores e período de armazenagem.

Observa-se na Tabela 33 que no início da armazenagem não existiam diferenças significativas na germinação e no vigor das sementes para os crioprotetores estudados, no entanto, a medida que foi ocorrendo o período de armazenamento, verifica-se que os crioprotetores 1 e 2 tendem a preservar sua qualidade fisiológica embora existam diferenças significativas aos 5 e 30 dias de armazenagem.

Analisando a Tabela 33 nas colunas constata-se também que a germinação e o vigor das sementes quando armazenadas com os crioprotetores 1 e 2 não diferem significativamente entre si para cada período de armazenamento, exceção se faz ao vigor das sementes aos 5 dias de armazenadas.

TABELA 33. Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G2 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores tempo de armazenagem e crioprotetores.

GERMINAÇÃO					
CRIOPROTETORES	PERÍODO DE ARMAZENAGEM (dias)				
	0	5	30	60	
Sem Crioprotetor	97,13 a A	68,75 b C	72,75 b C	88,00 a B	
Crioprotetor 1	95,38 a A	78,75 a B	79,50 a B	91,00 a A	
Crioprotetor 2	93,50 a A	85,00 a B	87,50 a B	91,50 a A	
Crioprotetor 3	91,00 a A	56,63 c C	58,00 c C	84,25 b B	
DMS/coluna= 6,38 (letras minúsculas)		DMS/linha= 6,38 (letras minúsculas)			
VIGOR					
Sem Crioprotetor	65,88 a A	31,88 c C	31,25 b C	54,50 b B	
Crioprotetor 1	62,25 a A	49,13 a B	51,50 a B	63,13 a A	
Crioprotetor 2	61,00 a B	39,38 b C	44,00 a C	70,00 a A	
Crioprotetor 3	61,50 a A	22,50 c C	25,00 c C	38,25 c B	
DMS/coluna= 8,46 (letras minúsculas)		DMS/linha= 8,46 (letras minúsculas)			

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Crioprotetor 1. Tubo polietileno; Crioprotetor 2. Envelope de alumínio; Crioprotetor 3. Amido de milho.

Período de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias.

Na Tabela 34 encontra-se a comparação entre a média da germinação e do vigor das sementes de gergelim da variedade CNPA-G3 para os fatores isolados de métodos de descongelamento, crioprotetores e períodos de armazenagem.

Nessa tabela verifica-se que não existe diferença significativa na germinação das sementes quando essas são descongeladas a temperatura ambiente ou em banho termostático (40°C), embora se observa uma diferença significativa nessa análise comparativa, no vigor das sementes. Observa-se também, na tabela, que não existe diferença significativa entre o crioprotetor 1 (tubo polietileno) e o 2 (envelope de alumínio). Em relação ao período de armazenagem, constata-se que a germinação das sementes depois de 60 dias de armazenadas não foram significativamente diferentes, embora existam diferenças significativas aos 5 e 30 dias de armazenadas.

Os percentuais de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G3 para a interação entre os fatores crioprotetores e métodos de

descongelamento, encontram-se na Tabela 35. Nessa tabela constata-se que existem diferenças significativas na germinação das sementes quando essas são descongeladas a temperatura ambiente em relação ao banho termostatizado (40°C) sem o uso do crioprotetor e quando se utiliza o crioprotetor 3. Essas diferenças também são observadas no vigor das sementes para o crioprotetor 1 e 3.

Ainda na Tabela 35 constata-se que não existem diferenças significativas na germinação das semente, entre os crioprotetores 1 e 2 quando essas são descongeladas a temperatura ambiente ou em banho termostatizado (40°C) já para o vigor das sementes essas diferenças não ocorrem apenas para as sementes descongeladas em banho termostatizado.

TABELA 34. Valores médios da germinação e do vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G3, submetida a criopreservação em nitrogênio líquido, com 6% b.u., para os fatores descongelamento, crioprotetores e período de armazenagem.

GERMINAÇÃO					
Descongelamento		Crioprotetores		Período de armazenagem (dias)	
T. A	86,09 a	S. Criop.	85,41 b	0	91,53 a
B. T	85,31 a	Criop. 1	92,66 a	5	79,72 b
		Criop. 2	93,47 a	30	81,38 b
		Criop. 3	71,28 c	60	90,19 a
DMS= 1,03		DMS= 1,92		DMS= 1,92	
MG= 85,70		CV%= 3,43			
VIGOR					
T. A	54,25 b	S. Criop.	57,59 c	0	60,25 b
B. T	56,03 a	Criop. 1	61,63 b	5	46,81 c
		Criop. 2	64,69 a	30	48,38 c
		Criop. 3	36,66 d	60	65,13 a
DMS = 1,47		DMS = 2,75		DMS = 2,75	
MG = 55,14		CV% = 7,62			

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Crioprotetor 1. Tubo polietileno; Crioprotetor 2. Envelope de alumínio; Crioprotetor 3. Amido de milho.

Temperatura de descongelamento: T.A. Temperatura Ambiente; B.T. Banho Termostatizado (40°C).

Período de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias.

TABELA 35. Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G3 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores crioprotetores e métodos de descongelamento.

GERMINAÇÃO				
DESCONGELAMENTO	CRIOPROTETORES			
	S. CRIOP.	CRIOOP. 1	CRIOOP. 2	CRIOOP. 3
Temp. Ambiente	90,38 a B	93,63 a A	93,50 a A	66,88 b C
Banho Termostatizado	80,44 b B	91,69 a A	93,44 a A	75,69 a C
DMS/coluna= 2,06 (letras minúsculas)		DMS/linha= 2,72 (letras minúsculas)		
VIGOR				
Temp. Ambiente	57,25 a B	59,06 b B	65,88 a A	34,81 b C
Banho Termostatizado	57,94 a B	64,19 a A	63,50 a A	38,50 a C
DMS/coluna= 2,95 (letras minúsculas)		DMS/linha= 3,89 (letras minúsculas)		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Crioprotetor 1. Tubo polietileno; Crioprotetor 2. Envelope de alumínio; Crioprotetor 3. Amido de milho.

Temperatura de descongelamento: T.A. Temperatura Ambiente; B.T. Banho Termostatizado (40°C).

Na Tabela 36 onde está analisada estatisticamente a interação entre os fatores métodos de descongelamento e períodos de armazenagem observa-se que não existem diferenças significativas entre os métodos de descongelamento e os períodos de armazenagem de 0, 30 e 60 dias, embora observe-se que para o vigor das sementes essas diferenças entre os métodos de descongelamento não ocorram apenas nos períodos inicial (0) e aos 60 dias.

Analisando-se cada método de descongelamento em função do período de armazenagem constata-se que a germinação das sementes não diferem entre si no início e no final (60 dias) do período de armazenagem. Este fato é observado no vigor apenas para o período de 60 dias, onde não ocorreu diferenças significativas entre os métodos de descongelamento.

TABELA 36. Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade: CNPA-G3 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores período de armazenagem e métodos de descongelamento.

GERMINAÇÃO				
DESCONGELAMENTO	PERÍODO DE ARMAZENAGEM			
	0	5	30	60
Temp. Ambiente	91,94 a A	80,81 a B	82,38 a B	89,25 a A
Banho Termostatizado	91,13 a A	78,63 b B	80,38 a B	91,13 a A
DMS/coluna= 2,06 (letras minúsculas)		DMS/linha= 2,72 (letras minúsculas)		
VIGOR				
Temp. Ambiente	60,75 a B	44,38 b C	45,75 b C	66,13 a A
Banho Termostatizado	59,75 a B	49,25 a C	51,00 a C	64,13 a A
DMS/coluna= 2,95 (letras minúsculas)		DMS/linha= 3,89 (letras minúsculas)		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Temperatura de descongelamento: T.A. Temperatura Ambiente; B.M. Banho Termostatizado (40°C).

Período de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias.

Na Tabela 37 encontram-se os percentuais de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade CNPA-G3 para a interação entre os fatores crioprotetores e períodos de armazenagem.

Observa-se na Tabela 37 que no início da armazenagem não existem diferenças significativas na germinação sem o uso de crioprotetor e o crioprotetor 1 (tubo polietileno), embora não ocorreu diferenças significativas para os crioprotetores 1 (tubo polietileno) e 2 (envelope de alumínio) entre os períodos de 5, 30 e 60 dias de armazenagem. Entretanto para o vigor das sementes não se verificam diferenças significativas entre todos os crioprotetores estudados no período inicial e final da armazenagem, exceção se faz ao crioprotetor 3.

Ainda em relação a Tabela 37 constata-se que ao final do período de armazenagem o percentual de germinação e vigor das sementes da variedade CNPA-G3, tendem a manter-se igual ao período inicial, exceção se faz crioprotetor 3, onde parece que de alguma forma esta afeta a qualidade fisiológica das sementes.

TABELA 37. Valores médios de germinação e vigor das sementes de gergelim variedade: CNPA-G3 após serem submetidas a criopreservação em nitrogênio líquido, para os fatores período de armazenagem e crioprotetores.

GERMINAÇÃO				
CRIOPROTETORES	PERÍODO DE ARMAZENAGEM (dias)			
	0	5	30	60
Sem Crioprotetor	93,88 a A	75,00 b B	78,50 b B	94,25 a A
Crioprotetor 1	92,50 a A	92,13 a A	93,25 a A	92,75 a A
Crioprotetor 2	90,50 b B	93,88 a A	95,00 a A	94,50 a A
Crioprotetor 3	89,25 c A	57,88 c C	58,75 c C	79,25 b B
DMS/coluna= 3,85 (letras minúsculas)		DMS/linha= 3,85 (letras minúsculas)		
VIGOR				
Sem Crioprotetor	61,50 a B	47,38 b C	48,50 b C	73,00 a A
Crioprotetor 1	61,00 a B	54,25 b C	58,50 b C	72,75 a A
Crioprotetor 2	59,50 a C	62,50 a B	64,75 a B	72,00 a A
Crioprotetor 3	59,00 a A	23,13 c C	21,75 c C	42,75 b B
DMS/coluna= 5,50 (letras minúsculas)		DMS/linha= 5,50 (letras minúsculas)		

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Crioprotetor 1. Tubo polietileno; Crioprotetor 2. Envelope de alumínio; Crioprotetor 3. Amido de milho.

Período de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias.

II. 5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

1. Ao se estudar a determinação do teor de umidade limite para criopreservação – TULC, durante 5 dias, afirmamos que:
 - (a) Para as variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) o teor de umidade limite para criopreservação está em torno de 6% (b.u.); apresentando um percentual de germinação de 90% e de vigor variando entre 17 e 24%;
 - (b) A semente de gergelim variedades CNPA-G3 é que melhor se adapta a criopreservação imersa ao nitrogênio líquido a (-196°C);
 - (c) Para a criopreservação da variedade CNPA – G3, pode-se utilizar teores de umidade entre 6 e 8% (b.u.), que a germinação e o vigor das sementes não são afetados significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey;

2. Em relação a criopreservação com imersão em nitrogênio líquido a (-196°C), para as variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) por tempo de armazenagem de 5, 30 e 60 dias, utilizando 4 tipos de crioprotetores (Sem Crioprotetor, Crioprotetor 1 – Tubo polietileno, Crioprotetor 2 Envelope de alumínio e Crioprotetor 3 – Amido de milho), com processo de descongelamento nas temperaturas ambiente e banho termostatizado (40°C). Podemos afirmar que:
 - a) Os melhores índices de germinação e vigor para as variedades de gergelim Seridó-1 e CNPA-G2, foram obtidos quando as sementes foram descongeladas a temperatura ambiente entretanto para a variedade CNPA-G3 o melhor índice de vigor foi obtido quando as sementes foram descongeladas a temperatura de 40°C em banho termostatizado;
 - b) Foram obtidos os maiores índices de germinação e vigor, quando as variedades foram criopreservadas utilizando-se como crioprotetor, o envelope de alumínio;
 - c) Os maiores índices de germinação e vigor foram obtidos quando as sementes de gergelim foram criopreservadas pelo período de armazenagem de 60 dias em comparação aos períodos de 5 e 30 dias.

CONCLUSÃO GERAL

CAPÍTULO I

Assepsia das sementes :

- I. A variedade CNPA-G2 mostrou-se superior as demais variedades apresentando os maiores percentuais de germinação e vigor não diferindo da testemunha;
- II. A assepsia das sementes de gergelim, variedade CNPA-G2, pode ser feita com a concentração de hipoclorito de sódio variando entre 10 e 40%, indicando – se 10% por ser o valor mais econômico, sendo que o meio de cultivo recomendado deve ser o papel germitest, (PG);
- III. A concentração de hipoclorito que deve ser recomendado para fazer a assepsia da semente de gergelim, variedade CNPA-G3, é de 20%, e o melhor meio de cultivo das sementes é o papel germitest (meio de cultivo PG) em detrimento do meio de cultivo MS;
- IV. Quanto a assepsia da semente de gergelim variedade Seridó-1 a concentração de hipoclorito de sódio que causa menor danos as sementes é na ordem de 20% e o meio de cultivo recomendado é o meio MS;
- V. Em relação à análise fitopatológica concluiu-se que os fungos encontrados foram *Aspergillus sp*, *Penicillium spp*, *Rhizoctonia* e o *Rhizopus sp* sendo que a variedade Seridó-1 apresentou maior incidência de contaminação para todos encontrados, evidenciando a maior presença do *Aspergillus sp* em todas as variedades, entretanto a variedade CNPA-G3 foi a que apresentou menor incidência de fungos.

Na Indução a Organogênese Somática realizada podemos verificar que:

“Sem o Pré - Tratamento” das sementes.

- I. A variedade CNPA-G3 quanto aos Explantes Vivos (E.V) apresentou os maiores índices de desenvolvimento, ou seja, maior incidência de explantes viáveis ao brotamento quando comparada com as outras variedades;
- II. A variedade Seridó-1 foi que apresentou maior N° de brotos por explantes (B/E), ocasionando um processo de super brotamento nesta fase.

“Com o Pré - Tratamento” das sementes

- I. Não houve diferenças estatísticas entre as variedades (Seridó1 e CNPA-G3) quanto aos Explantes Vivos (E.V), ou seja, as variedades envolvidas apresentaram desenvolvimento semelhantes na obtenção de explantes vivos por frasco;

- II. Em relação ao N° de brotos por explante, novamente não houve diferenças estatísticas entre as variedades (Seridó-1 e CNPA-G3), ou seja, ambas apresentaram processo de desenvolvimento evidenciando super brotamento;

Na Indução a Calogênese podemos afirmar que:

- I. No desenvolvimento de calogênese, utilizando explantes de hipocótilo de plântulas germinadas *in vitro* em cultivar de gergelim, ocorreu maior formação de calos em meio MS, quando suplementado com os reguladores de crescimento BAP (6-bencilaminopurina) e NAA (ácido α -nafatalenoacético), em todas as variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) estudadas.

CAPÍTULO II

Diante dos resultados obtidos podemos concluir que:

1. Ao se estudar a determinação do teor de umidade limite para criopreservação – TULC, durante 5 dias, afirmamos que:
 - (a) Para as variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) o teor de umidade limite para criopreservação está em torno de 6% (b.u.); apresentando um percentual de germinação de 90% e de vigor 17 e 24%, respectivamente;
 - (b) A semente de gergelim variedades CNPA-G3 é que melhor se adapta a criopreservação imersa ao nitrogênio líquido a (-196°C);
 - (c) Para a criopreservação da variedade CNPA – G3, pode-se utilizar teores de umidade entre 6 e 8% (b.u.), que a germinação e o vigor das sementes não são afetados significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey;

2. Em relação a criopreservação com imersão em nitrogênio líquido a (-196°C), para as variedades de gergelim (Seridó-1, CNPA-G2 e CNPA-G3) por tempo de armazenagem de 5, 30 e 60 dias, utilizando 4 tipos de crioprotetores (Sem Crioprotetor, Crioprotetor 1 – Tubo polietileno, Crioprotetor 2 Envelope de alumínio e Crioprotetor 3 – Amido de milho), com processo de descongelamento nas temperaturas ambiente e banho termostatizado (40°C). Podemos afirmar que:
 - (a) Os melhores índices de germinação e vigor para as variedades de gergelim Seridó-1 e CNPA-G2, foram obtidos quando as sementes foram descongeladas a temperatura ambiente entretanto para a variedade CNPA-G3 o melhor índice de vigor foi obtido quando as sementes foram descongeladas a temperatura de 40°C em banho termostatizado;
 - (b) Foram obtidos os maiores índices de germinação e vigor, quando as variedades foram criopreservadas utilizando-se como crioprotetor, o envelope de alumínio;
 - (c) Os maiores índices de germinação e vigor foram obtidos quando as sementes de gergelim foram criopreservadas pelo período de armazenagem de 60 dias em comparação aos períodos de 5 e 30 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARELLO, E.F.; PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P.; BARBOSA, M.H.P. Estabelecimento *in vitro* de explantes e regeneração de plântulas de *Gerbera jamesoni Bolus ex Hook* em cultura de tecidos. Brasília. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, n.2, p.269-273, 1991.
- ARMSTRONG, C.L.; GREEN, C. E. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. **Planta**, v. 164, p.207-214, 1985.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS – AOSA. **seed vigour testing handbook**. (Contribution, 32), p.93, 1983.
- ASHWOOD-SMITH, M.J. Genetic damage is not produced by normal cryopreservation involving either glycerol or demethyl sulphoxide: a cautionary note, however, on possible effects of dymethyl sulphoxide. **Cryobiology**, v.22, p.427-433, 1985.
- BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation and International exchange of germplasm. Lundhiana, Punjab, India. **Punjad Agricultural University**. p.19-41,1980.
- BEJOY, M. HARIHARAN, M. *In vitro* plantlet differentiation in *Annona muricata*. Karala India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.31, p.245-247, 1992.
- BELTRÃO, N.E. de M.; FREIRE, F.C.; LIMA, E.F. **Gergelim cultura no trópico semi-árido nordestino**. Campina Grande/PB. EMBRAPA-CNPA, (EMBRAPA-CNPA, Circular Técnica, 18), 1994.
- BELTRÃO, N.E. de M.; FREIRE, F.C.; LIMA, E.F. **Recomendações técnicas para a cultura do gergelim no Nordeste Brasileiro**. EMBRAPA-CNPA, 1994.52p. (EMBRAPA-CNPA. Circular Técnica, 18).
- BERED, F.; SERENO, M.J.C. de M.; CARVALHO, F.J.F.; LANGE, C.E.; HANDEL, C.L.; DORNELLES, A.L.C. Regeneração de plantas de aveia a partir de calos embriogênicos e orgânicos. Brasília, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, n.11, p.1827-33, 1998.

- BHANSALI, R. R.; ARYA, H. C. Organogenesis in *Citrus limettioides* (sweet lime) callus culture. Jodhpur – India. **Phytomorphology**, v.29, n.2, p.97-100, 1979.
- BHAT, S.R.; BHAT, K.H.; CHANDEL, K.P.S., Studies on germination and cryopreservation of *Musa balbisian* seed. National Facility for Plant Tissue Culture Repository, National Bureau of Plant Genetic Resources, New Delhi, India. **Seed Science and Technology**. v.22, p.637-640, 1994.
- BRASIL, Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992, 365p.
- BRAHAMACHARY, A. K. Cryogenic preservation of bamboo (*Bambusa arundinacea*). Embryology Unit. Indian Statistical Institute, Calcuta. **Indian Forester**, p.541-543, 1994.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes – Ciência, Tecnologia e Produção**. Fundação Cargill, Campinas-SP, 1980, 326p.
- CARVALHO, Julita Maria Frota Chagas. **Aplicaciones de las Técnicas de Cultivo in vitro em la multiplicaciones y mejora del algodón**. Madrid: Universidade Politécnica de Madrid, 1996. 194p. (Tese, Doutorado em Engenharia Agrícola).
- CASTRO, O.F.A.; Andrade, A.G. Cultura *in vitro* de meristemas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) LAM). Brasília, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n.7, p.917-922, 1995.
- CHANDEL, K.P.S.; CHAUDHURY, R. RADHAMANI, J.; MALIK, S.K.,. Desiccation and freezing sensitiv in recalcitrant seed of tea, cocoa and jackfruit. New Delhi, India. **National Plant Tissue Culture Repository**.: NBPGR, v.76, p.443-450, 1995.
- CHAUDHURY, R.; CHANDEL, K.P.S.,. Studies on germination and cryopreservation of Cardamom (*Elettaria cardamomum maton*) seeds. National Plant Tissue Culture Repository, New Delhi, India NBPGR, Pusa Campus. **Seed Science and Technology**, v.23, p.235-240, 1995.

- CHIN, H.F., Seedbanks: Conserving the past for the future. Agronomy and Horticulture Department Universiti Pertanian Malaysia, 43400 Serdang, Selangor, Malaysia. **Seed Sci. & Technology**, v.22, p.385-400, 1994.
- CHIN, H.F.; HOR, Y.L.; MOHD LASSIM, M.B. Identification of recalcitrant seeds. Universiti Pertanian Malaysia, Malaysia, **Seed Sci. & Technology**, v.12, p. 429-436, 1984.
- CHIN, H.F.; MAHERAN, A. The effect of moisture and temperature on the structure and viability of seeds of *Hevea brasiliensis*. Selangor, Malaysia. **Seed Sci. & Technology**, v.9, p.411-422, 1981.
- CHIN, H.F. Germination and storage of banana seeds. Universiti Pertanian Malaysia, Serdang, Selangor, Malaysia. **International Plant Genetic Resources Institute**, p. 218-229, 1996.
- COOK, A.A. **Diseases of tropical and subtropical field, fiber and oil plants**. MacMillan Publishing Co., Inc., 1981, 450p.
- CUNHA, G.G.; FORTES, G.R. de L. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.14, n.3, p. 197-202, 1992.
- DINIZ, P.S.C. **Qualidade fisiológica das sementes de milho (*Zea mays* L.) submetidas a diferentes técnicas de criopreservação**. 1999, 80p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Agrícola).
- EMBRAPA – Algodão – Informações gerais sobre o gergelim. Referência obtida via base de dados biblio. Alta Vista, 1999. Disponível na Internet.
URL: <http://www.cnpa.embrapa.br/gergeliminfo.html>
- EMBRAPA – Algodão. Informações gerais sobre o gergelim. Referência obtida via base de dados biblio. EMBRAPA, 1999. Disponível na Internet.
<http://www.cati.sp.gov.br/tecnologias/culturas/gergeliminfo.html>.
- FIGUEIREDO, S.F.L.; ESQUIBEL, M.A. Callogenesis, organogenesis and micropropagation of *Datura innoxiosa* Barb. Rodr. Brasília – DF, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.3, n.2, p.63-68, 1991.

- FILHO, J.C.B.; VIEIRA, L.G.E.; HASHIMOTO, J.M. Fatores influenciando a micropropagação *in vitro* de gemas axilares de *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertonil. Brasília-DF, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.4, n.1, p.59-61, 1992.
- GALLI, F. **Manual de fitopatologia - Princípios e conceitos**. São Paulo: Editora Agronomica Ceres Ltda, 1978, 373p.
- GAUTHERET, R.J. Plant tissue culture: a history. **Botanical Magazine**, v.99, p.393-410, 1983.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; OJEMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Exp. Cell Res.**v.50, p.151-158, 1968.
- GEORGE, E. F.; SHERINGTON, P. D. Plant propagation by tissue culture. **Exegetics Ltd. Basingstoke**, Edington, 1984, 709p.
- GODOY, I.J.; SAVY FILHO, A.; TANGO, J. S.; UNGARO, MRG.; MARIOTTO, P.R. **Programa Integrado de Pesquisa: Oleaginosas**, São Paulo- SP: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Coordenadoria de Pesquisa Agropecuária, 1985, 33p.
- GONZALEZ-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*. Madrid, Spain,.: Universidade Politecnica de Madrid, **Hort Science** v.75, p.1-4, 1995.
- GONZALEZ-BENITO, M.E. & PEREZ, C.; VIVIANI, A.B. Cryopreservation of nodal explantes of an endangered plant species (*Centaureum rigualli Esteve*) using the encapsulation-dehydration method. Madrid, Spain. **Biodiversity and Conservation**, v.6, p.583-590, 1997.
- GONZALEZ-RIO, F.; GURRIARAN, M.J.; GONZALEZ-BENITO, E.; REVILLA, M. A. Dessication and cryopreservation of olive (*Olea europaea* L.) embryos. **Cryo-Letters**, n.15, p.337-342. 1994.
- HANLIN, R.T. The distribution of peanut fungi in the southeastern United States. USA **Mycopathologia et Mycologia Aplicata**, The Hague, v.49, p.243-277, 1973.

- IRIONDO, J.M.; PÉREZ-GARCIA, F. Effect of seed storage in liquid nitrogen on germination of several crop and will species. Departamento de Biología Vegetal, Madri, Spain: Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agronomos, Universidad Politécnica. **Seed Science and Technology**, v.20, p.165-171, 1992.
- ISTA, INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **Handbook of vigour test methods**. Zurich, Swetzerland ISTA.1981,72p.
- JOFFE, A.Z. The mycoflora of fresh and stored groudnut kernels in Israel. **Mycopathologia et Mycologia Aplicata**, The Hagues, v.39, p.255-264, 1969.
- KANG, K.S.; VEEDER, G.T.; MIRRASOUL, R.J.; KANEK, T. ; COTTWELL, J.W. Agar-like polissaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Appl. Env. Micro**, n.43, p.1086-1091, 1982.
- KUHLMANNU, U; FOROUGHI-WEHR,B. Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. **Plant Cell Rep**. n.8, p.78-81, 1989.
- LASCA, D.H.C.; SICHMANN, W. *Gergelim (Sesamum indicum L.)*. **Technologias Agrícolas** (Coordenadoria de Assistência Técnica Integral). Referência obtida via base de dados biblio. CATI, 1999. Disponível na Internet.
<http://www.cati.sp.gov.br/tecnologia/culturas/gergelim.html>.
- LEON, J. Ajonjoli *Sesamum indicum*. In.: **Fundamentos botânicos de los cultivos tropicales**. San José, Costa Rica, IICA, p.192-196, 1968.
- LIAU, D.F.; BOLL, W.G. Callus and cell suspension culture of bush bean (*Phaseolus vulgaris*). **Canadian Journal of Botany**, v.48, p. 1119-1130, 1970.
- LIBERAL, O.H.T.; COELHO, R.C. **Manual do laboratório de análise de sementes – Botânica da semente.**, Rio de Janeiro: PESAGRO – RIO, 1980, 95p.
- LIMA,E.F.; VIEIRA, R.M; CARVALHO, J.M.F. Influência de *Rhizopus sp*, *Aspergillus niger* e *A. Flavus* na deterioração de sementes de algodoeiro armazenadas. **Fitopatologia Brasileira**, v.9, n.3, p.555-560, 1984.

- LIU, M.C; CHEN, W.H. Organogenesis and chromosome number in callus derived from cassava anthers. **Taiwan Sugar Research Institute**, Taiwan, Republic of China, Received August v.4, 1977.
- LOH, C.S.; RAO, A.N. Clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from seedlings and grafted plants and adventitious shoot formations in vitro. **Scientia Horticulturae**, v.39, p.31-39, 1989.
- MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. **Avaliação da qualidade das sementes**. Piracicaba: ESALQ,1987, 230p.
- MARY, R.J. JAYABALAN, N. Influence of growth regulators on somatic embryogenesis in *sesame*. Tamil Nadu, India. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v.49, p.67-70,1997.
- MATSUMOTO, K.; CABRAL, G. B.; TEIXEIRA, J.B.; RECH, E. L. Embriogênese Somática a partir de folhas imaturas de mandioca *in vitro*. Brasília-DF, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.3, n.2, p.107-110, 1991.
- MAZANI, B. **Mejoramiento del ajonjolí en Venezuela**. Maracy: Ministério da Agricultura y Cria - Centro de Investigaciones Agronomicas,1962, 127p.
- MEDEIROS, A.C.S.; CAVALLARI, D.A.N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.). Brasília-DF, **Revista Brasileira de Sementes**. v.14, n.1, p.73-75, 1992.
- MUMFORD, P.M.; GROUT,B.W.W. Desiccation and low-temperature (-196°C) tolerance of *Citrus limon* seed. University of Birmingham, UK. **Seed, Sei. & Technology**, v.7, p.407-410, 1979.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiology Plant**, v.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.

- NEEGAARD, P. **Seed pathology**. London: The Mac-Millan Press, 1979, 839p.
- NORMAH, M.N.; VENGADASALAM, M. Effects of moisture content on cryopreservation of *Coffea* and *Vigna* seeds and embryos. **Cryo letters**. Universiti Kebangsaan Malaysia. Selangor, Malaysia, v. 13 n.3, p.199-208,1992.
- ORHSINSKY,B.R.; MCGREGOR, L.J.; JOHNSON, G.J.E.; HUCK, P; KARTHA, K.K. Improved embryoid-induction and green short regeneration from wheat anthers cultured in medium with maltose. **Plant Cell Rep.**, n.9, p.365-369, 1990.
- PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Introdução: Fundamentos básicos**. Lavras – MG: UFLA – Universidade Federal de Lavras, FAEPE – Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, 1997, 159p.
- PENCE, V.C. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species. University Ciccinnati: **Center for Reproduction of Endangered Wildlife, Ciccinnati Zoo and Botanical Garden**, v.19, p.235-251, 1991.
- PENCE, V.C. Germination, desiccation and cryopreservation of seeds of *Populus deltoides Bartr.* Center for Reproduction of Endangered Wildlife, Ciccinnati Zoo and Botanical Garden, and Departament of Biological Sciences, Ciccinnati, Ohio: University of Ciccinnati. **Seed Science and Technology**, v.24, p.151-157,1996.
- PERRY, D.A. Report of the vigour test comumitte. International Seed Testing Association, . In: **XVII Congresso da International Seed Testing Association**. 1977.18p.
- PIERIK, R.L.S. **Cultivo in vitro de las plantas superiores**. Madrid: Mundi Prensa, 1990,326p.
- 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, 1987. v.9.
- PITA VILLAMIL, J. Crioconservation de semillas. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola**, 26. Minicurso. Campina Grande-PB, 1997.55p.
- POPINIGIS, F. Vigor das sementes In: **Produção e tecnologia de sementes**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas-MG, 1979, p.98-117.

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

RAJASEKHARAN, P.E.; GANESHAN, S. Freeze preservation of rose pollen in nitrogen: Feasibility, viability and fertility status after long-term storage. Pollen Storage Laboratory, Section of Plant Genetic Resources, Indian Institute of Horticultural Research. **Journal of Horticultural Science**, v.69, n.3, p.565-569, 1994.

ROBERT, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499-514, 1973.

RUBIN, L.G. Cryogenic thermometry: a review of progress since 1982. Massachusetts Institute of Technology, Elsevier Science Ltd., v.37, p.341-356, 1997.

SALAZAR, E.; ROMERO, C. Cultivo *in vitro* de segmentos de folhas de ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). **Revista Fac. Agronômica (LUZ)**, n.13, p.293-302, 1996.

SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N.V. Descrição morfológica do gergelim (*Sesamum indicum* L.), IAC Ouro. Campinas-SP, Instituto Agrônômico, 1988. 12p. (IAC. Boletim Científico, 13).

SCOTT, P.; LINE, R.L. The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. **Plant Cell Tissue Organ**, n.36, p.129-133, 1994.

SILVA, F. de A. S. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: international conference on computers in agriculture, Cancun. **Anais...** Cancun: American Society of Agricultural Engineers. 1996p. 294-298.

SILVA, P.F.C. **Gergelim pecuária**, v.23, n.109, p.40, 1983.

SILVA, C.V.C.; WILLADINO, L.; MELLO, N.F. Regeneração de plantas via organogênese, a partir de cultivo *in vitro* de tecidos de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). In: **Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**. Lavras: UFLA/SBFV, 1995. p.123-125.

SKIRVIN, R. M. Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica*, n.27, p. 241-266, 1978.

SOAVE, J.; WETZEL, M.M.V.S. **Patologia de Sementes**. Campinas-SP: Fundação Cargill, 1987, 480p.

STANWOOD, P. C.; ROOS, E. E.; Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). USDA-SEA-AR, National Seed Storage Laboratory Fort Collins: **Hort Science**, v.14, n.5, p.628-630, 1979.

STANWOOD, P.C. Tolerance of crop seeds to cooling and storage in liquid nitrogen (-196°C). **Journal of Seed Technology**, n.5, p.26-31, 1980.

STANWOOD, P.C.; SOWA, S. Evaluation of onion (*Allium cepa* L.) seed after 10 years of storage at 5 – 18 and –196°C. **Seed Physiology, Production & Technology; Crop Science**, v.35, p.852-856, 1995.

STEVENS, F.L. **Plant Disease Fungi**. New York: The Macmillan Company, 1925, 469p.

TANNOURY, M.; VINTÉJOUX, C.; DEREUDDRE, J. Cryoconservation par encapsulation et éshydratation d'apex d'ceillet (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivés *in vitro*. **Acta bot. Gallica**, v.5, p.415-424, 1995.

TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A.; **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília, DF, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa de Hortaliças, v.1, v.2, 1998. 864p.

VEIGA, R.F.A.; FILHO, A.S.; BANZATTO, N.V.; MORAES, S.A.; SUGIMORI, M.H.; MORAES, R.M. Avaliações Agronômicas e Botânicas de Germoplasmas na coleção de gergelim do Instituto Agronomico. Campinas-SP, **Instituto Agronomico**, 1985. 38p. (IAC. Boletim Científico, 3).

VICENTE, A.M.; RUBIO, J.G.P.; REGIDOR, F.S. **Refrigeracion, Congelacion y Envasado de los alimentos**. Madrid, AMV Ediciones – Mundi – Prensa, 1994. 276p.

VIDOR, M.A. **Micropropagation de *Hijacinthus amethystina* a *Albus*: estudos morfo-genetics**. (Tese de Doutorado – Universidade Politécnica de Madrid) Madrid, 1995, 253p.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes**. FUNEP (Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia) – UNESP (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Campus de Jaboticabal). São Paulo/SP: Editora Afiliada, 1994, 164p.

WELTER, M. E.; CLAYTON, D. S.; MILLER, M. A.; PETOLINO, J.F. Morphotypes of friable embryogenic maize callus. **Plant Cell Reports**, v.14, p.725-729, 1995.

WIESNER, L.E.; LAUFMANN, J.E.; STANWOOD, P.C.; WHEELER L.J. The effect of liquid nitrogen on alfalfa seed viability, emergence, and broken cotyledons. **Journal of Seed Technology, USA**, v.18, n.1, 1994.

ZEMANSKY, M.W. **Calor e termodinâmica**, 5ª ed. Rio de Janeiro – RJ, Guanabara Dois, traduzido por Benedito Carlos Pinto Preda 1978, 593p.

APÊNDICE I - A

□ **PREPARAÇÃO DO MEIO (Ficha);**

□ **TABELAS 1, 2 e 3.**

APÊNDICE II - B

- CALIBRAÇÃO DE RESISTORES UTILIZADOS EM TESTE TERMOMÉTRICO;

- FICHA TÉCNICA UTILIZADA NO TESTE DE GERMINAÇÃO – TG E TESTE DE VIGOR – TV;

- DADOS COLETADOS NOS TESTES TG E TV.

3.4.B CRIOPROTETORES E RESISTÊNCIA ELÉTRICA

Segundo RUBIN (1997) foi publicado diversas revisões que apresentavam o progresso em Termometria a baixa temperatura, durante os anos sessenta, setenta e até 1982. A bibliografia de 270 referências foram selecionadas para concentrar-se na região de temperatura entre $\approx 0,3\text{K}$ e $\approx 160\text{K}$. Os tópicos incluem: Temperatura escalar, Pontos fixos, Termometria de gás, termometria de pressão e vapor, Medida de pressão, Termometria de resistência, Dispositivos de junção e outras termometrias, Termo-elétrica de termômetros eletrônicos, outros tipos de termometria, Efeitos de campos magnéticos e outras condições ambientais em termômetros, Circuitos e sistemas para a medida em controle de temperatura, desígnios criostáticos, refrigeração e vários métodos

A criopreservação oferece a preservação de toda matéria orgânica imersa em nitrogênio líquido, que neutraliza suas atividades metabólicas, mantendo-se viável a sua utilização e aperfeiçoamento em período determinado.

Com objetivo de analisar o comportamento das sementes de gergelim, foram criados e testados os crioprotetores para determinar a sua capacidade como isolante térmico, minimizando o choque exercido pela temperatura de exposição das sementes ao nitrogênio líquido.

Vários materiais foram submetidos a testes preliminares, no entanto o Crioprotetor N° 1 - Tubo polietileno apresentou-se como bom isolante térmico impedindo que a temperatura interna do tubo chegasse rapidamente ao nível máximo oferecido pelo nitrogênio líquido.

O Crioprotetor N° 2 – Envelope de alumínio foi quem apresentou melhor desempenho como isolante térmico, resistindo melhor e tendo um período muito longo de congelamento gradativo das sementes.

O Crioprotetor N° 3 – Amido de milho como isolante natural apresentou rapidez no ultra congelamento, talvez devido ao fato da massa líquida facilitar na formação dos cristais.

Para realização do teste de resistência foram utilizados: O Multimetro Digital Voltcraft 4650 CR. O programa usado para aquisição de dados foi o Digiscope da

Empresa Conrad Eletronic. (Alemã), os sensores de temperatura de platina (PT 1000 1/3 DIN B. R. = 1000 Ω da Empresa Conrad Eletronic (Alemã).

O Teste define-se quando o termômetro de resistência que tem a forma de um fio longo e fino, é usualmente enrolado em torno de um quadro esbelto, construído de modo a evitar excessivas tensões quando o fio se contrair pelo resfriamento. Em circunstâncias especiais, o fio pode ser enrolado ou embutido na substância cuja temperatura se quer medir. Na faixa de temperaturas muito baixas, os termômetros de resistência consistem frequentemente de pequenos resistores de rádio á base de carbono, ou de um cristal de germânio tratado com arsênio e selado dentro de uma cápsula cheia de hélio (ZEMANSKY, 1978). Estes termômetros podem ser juntados á superfície da substância cuja temperatura se quer medir, ou colocados em furo previamente executado para este propósito.

Para realização do teste com os crioprotetores que tinha como objetivo avaliar a resistência de vários materiais como isolantes térmicos em proteger a semente contra a baixa temperatura oferecida pelo nitrogênio líquido, foram utilizados Teste Nº1 – O Crioprotetor natural – Amido de milho que envolvia as sementes em uma massa, onde o termômetro ficava no centro da massa para a realização da leitura, foram realizados três testes com este objetivo; Teste Nº 2 – O Crioprotetor em forma de tubo de Polietileno, onde o termômetro era imerso no tubo e selado e em seguida imerso no nitrogênio, foram realizados 2 testes com este objetivo; Teste Nº 3 O Envelope de alumínio onde as sementes eram colocadas no interior do envelope junto com o termômetro e em seguida eram selados e imersos em nitrogênio líquido, foram realizados 3 testes com este procedimento.

Para iniciar a realização do teste foi necessário a calibração dos resistores, antes de realizar a leitura de qualquer crioprotetor. Os dados de calibração e fórmula utilizada encontra-se no apêndice em anexo.

De acordo com os gráficos 9, 10 e 11 pode-se observar que o amido de milho em forma líquida facilitou na rapidez de elevação da temperatura ao entrar em contato com o N₂L. Após a imersão foram realizados os testes Teste de Germinação (TG) e o Teste de Vigor (TV), onde os índices ficaram em torno de 68% e 37% respectivamente.

Os gráficos acima descritos, encontram-se no apêndice B em anexo.

CALIBRAÇÃO DE RESISTORES UTILIZADOS EM TESTE TERMOMÉTRICO.

Para iniciar a realização do teste foi necessário a calibração dos resistores, antes de realizar a leitura de qualquer crioprotetor.

Costuma-se medir a resistência mantendo uma corrente constante conhecida no termômetro e determinando a diferença de potencial entre seus extremos por meio de um potenciômetro muito sensível.

A corrente se mantém constante ajustando-se um reostato, de modo a permanecer constante a diferença de potencial através de uma resistência padrão em série com o termômetro, observada com um potenciômetro monitorizado. O termômetro de resistência de platina pode ser utilizado para trabalhos de grande precisão. A calibragem do instrumento implica a medida de R'_{pt} em várias temperaturas conhecidas e a representação dos resultados por meio de uma forma empírica.

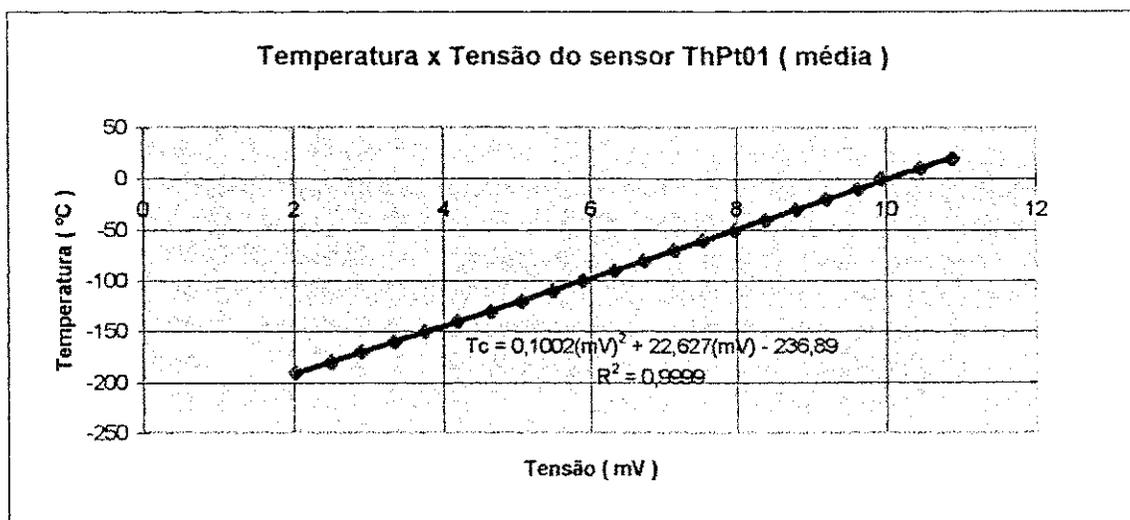
$$R_{pt} = R_0(1 + At + Bt^2) \quad \text{Onde:}$$

R'_0 = resistência do fio de platina quando envolvido por água no ponto triplo.

T = temperatura e

A e B são constantes.

Os sensores de platina tem várias utilidades na qual uma delas é como sensor de temperatura. Expomos o sensor de platina a diferentes temperaturas e observamos seu comportamento de acordo com o gráfico a seguir :



Diante de uma fonte de corrente constante podemos observar que a tensão está em função da temperatura numa relação expressa pela equação do gráfico onde o eixo x expressa a tensão e o eixo y expressa a temperatura.

Diante dos resultados obtidos e com base na equação do gráfico podemos criar uma escala térmica na qual venha a nos auxiliar a determinar qualquer tensão diante de qualquer temperatura e vice e versa.

Para construir o gráfico acima tomamos duas séries de medidas, uma série efetuada no resfriamento do sensor e a outra série de medidas efetuadas no aquecimento do sensor. No resfriamento temos que :

T (C)	30,7	20	10	0	-10	-20	-30	-40	-50	-60	-70
V (mV)	10,25	10,8	10,37	9,91	9,61	9,18	8,79	8,37	7,95	7,52	7,14

T (C)	-80	-90	-100	-110	-120	-130	-140	-150	-160	-170	-180	-190
V (mV)	6,72	6,33	5,89	5,48	5,05	4,62	4,18	3,75	3,33	2,9	2,51	2,03

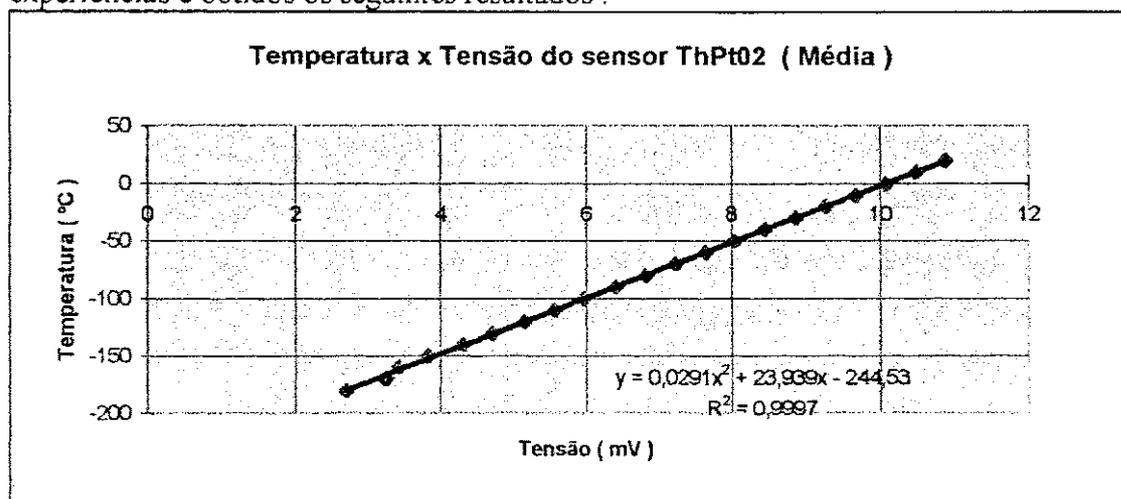
E no aquecimento temos que:

T (C)	-180	-170	-160	-150	-140	-130	-120	-110	-100	-90	-80
V (mV)	2,5	2,93	3,36	3,77	4,22	4,68	5,08	5,5	5,92	6,35	6,76

T (C)	-70	-60	-50	-40	-30	-20	-10	0	10	20	26,1
V (mV)	7,17	7,56	7,99	8,4	8,8	9,21	9,64	9,96	10,55	10,97	11,09

Para obtermos os dados referentes ao gráfico acima dispomos de um termômetro digital, um multímetro digital Voltcraft 4650 CR, um sensor de platina Thpt01, uma fonte de corrente constante e nitrogênio líquido.

Dispondo de outra amostra de sensor de platina, Thpt02, foram repetidos as experiências e obtidos os seguintes resultados :



Novamente coletamos valores tanto no resfriamento como no aquecimento. Para o resfriamento temos que:

T (C)	29,4	20	10	0	-10	-20	-30	-40	-50	-60	-70
V (mV)	11,25	10,86	10,48	10,08	9,63	9,24	8,86	8,43	8,03	7,63	7,23

T (C)	-80	-90	-100	-110	-120	-130	-140	-150	-160	-170	-192,4
V (mV)	6,79	6,39	5,94	5,51	5,14	4,7	4,27	3,82	3,4	2,97	2,01

E para o aquecimento temos que :

T (C)	-180	-170	-160	-150	-140	-130	-110	-100	-90	-80	-70
V (mV)	2,71	3,08	3,47	3,87	4,38	4,75	5,65	6,02	6,45	6,88	7,26

T (C)	-60	-50	-40	-30	-20	-10	0	10	20	25,4
V (mV)	7,68	8,06	8,5	8,9	9,32	9,73	10,11	10,5	10,91	11,05

Devido às imprecisões causadas pelo sistema criado para a realização da experiência, e afim de diminuir os erros sistemáticos causados na obtenção dos dados, o gráfico apresentado é um resultado estatístico dos dados coletados no resfriamento e no aquecimento do sensor.

CRIOPROTETORES E RESISTÊNCIA ELÉTRICA

GRÁFICOS:

Gráfico N° 9 – Crioprotetor - 3.1 (Amido de milho) imerso em nitrogênio líquido.

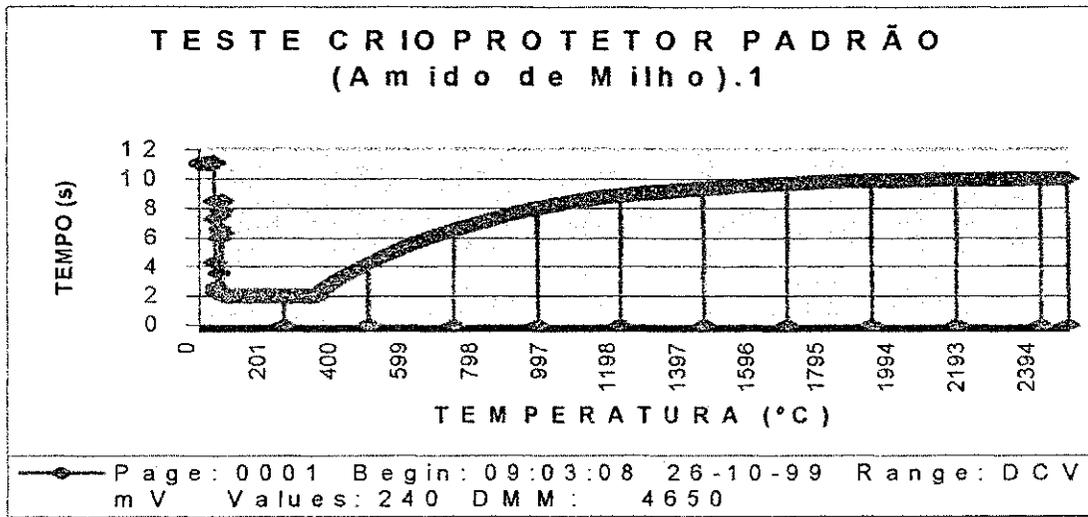


Gráfico N° 10 – Crioprotetor - 3.2 (Amido de milho) imerso em nitrogênio líquido.

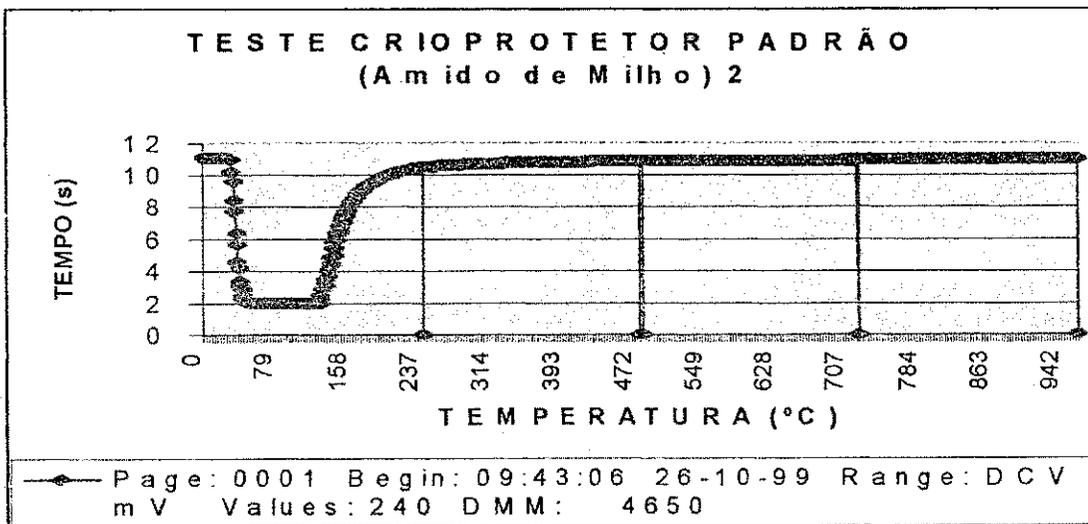
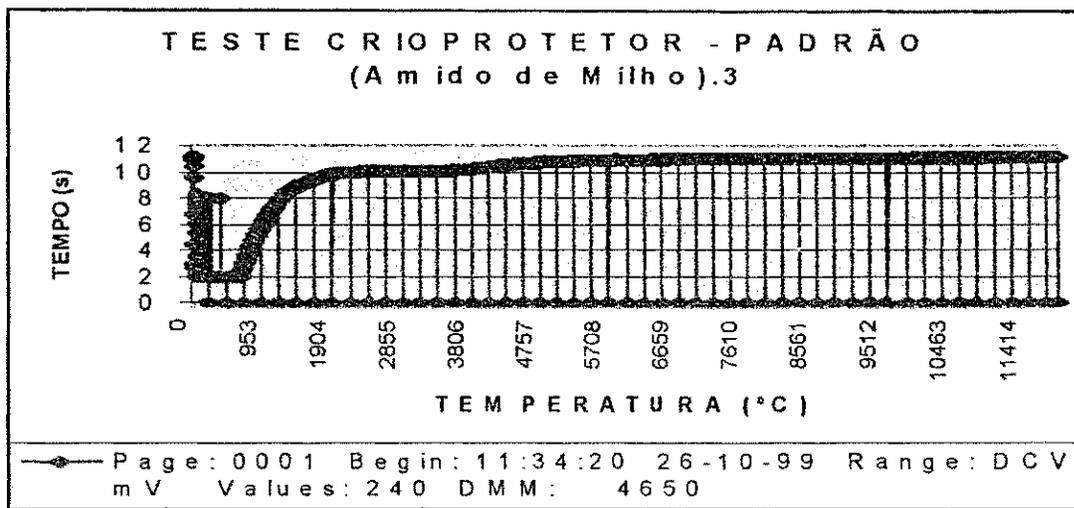


Gráfico N° 11 – Crioprotetor-3.3 (Amido de milho) imerso em nitrogênio líquido.



De acordo com os gráficos 12 e 13 pode-se observar que o tubo polietileno minimizou o efeito de choque térmico exercido pela temperatura oferecida do nitrogênio líquido. Quanto aos testes de germinação e vigor, estes apresentaram-se com índices em torno de 88% e 42% respectivamente.

Gráfico N° 12 – Crioprotetor -2 Tubo polietileno imerso em nitrogênio líquido.

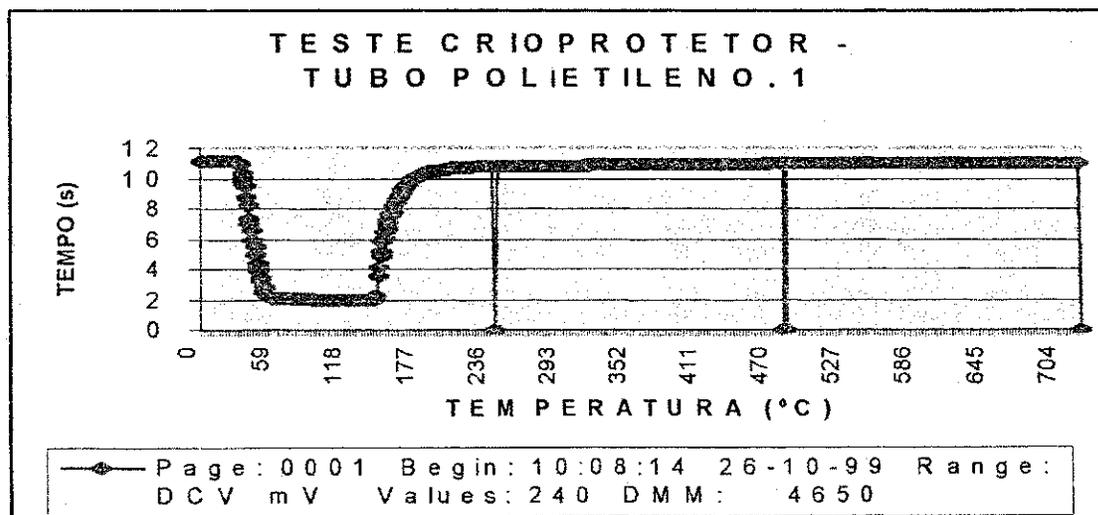
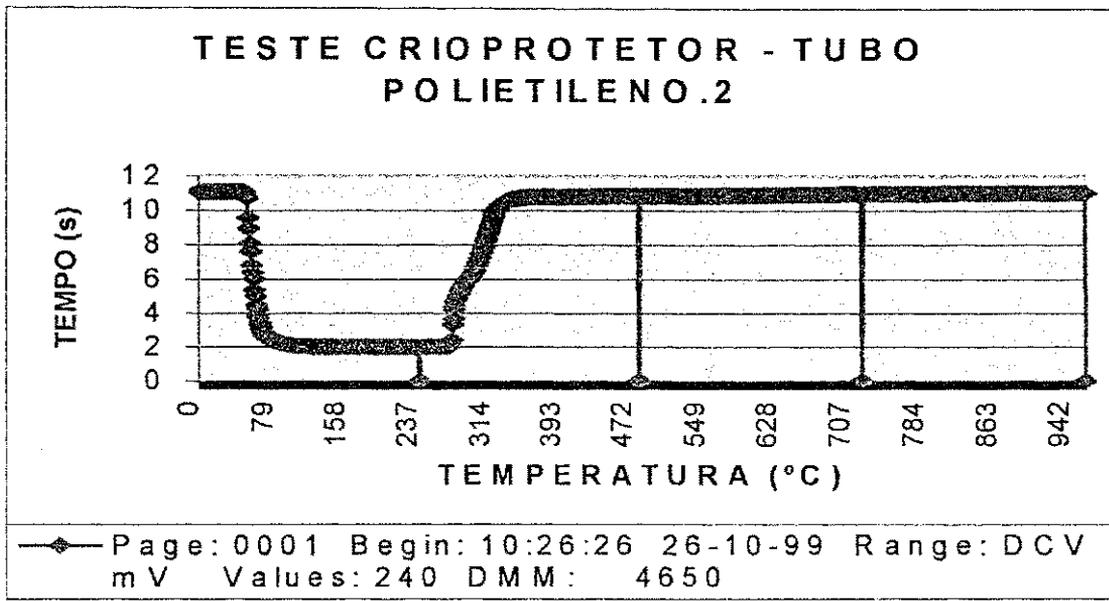


Gráfico N° 13 - Crioprotetor-2.2 Tubo polietileno imerso em nitrogênio líquido.



De acordo com os gráficos 14, 15 e 16 pode-se observar que envelope de alumínio foi quem apresentou melhor desempenho em reter o aumento da temperatura para o interior do envelope. Quanto os índices de germinação e vigor, foram os maiores entre os crioprotetores, ficando em torno de 90 e 45%, respectivamente.

Gráfico N° 14 – Crioprotetor-3.1 Envelope de alumínio imerso em nitrogênio líquido.

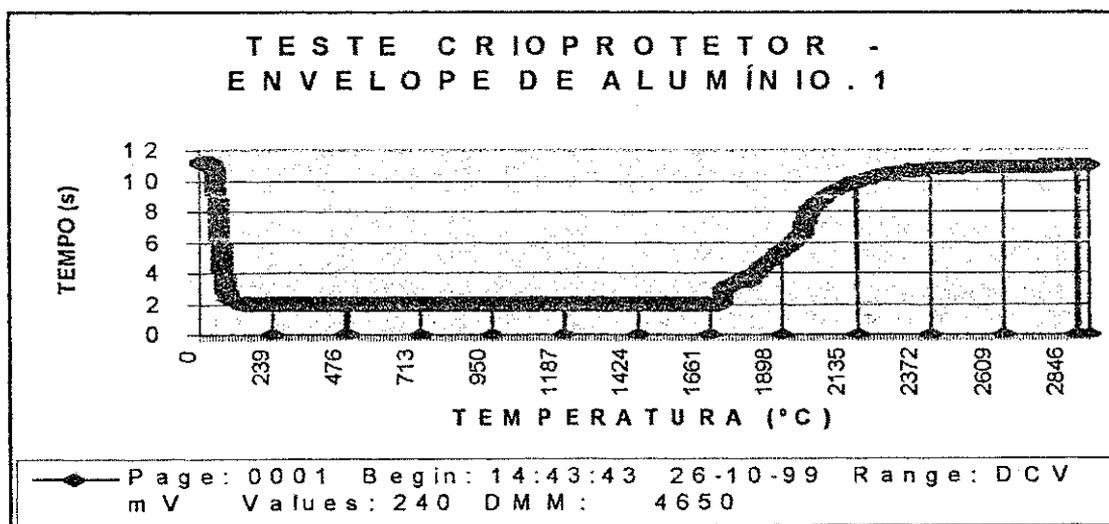


Gráfico Nº 15 – Crioprotetor –3.2 Envelope de alumínio imerso em nitrogênio líquido.

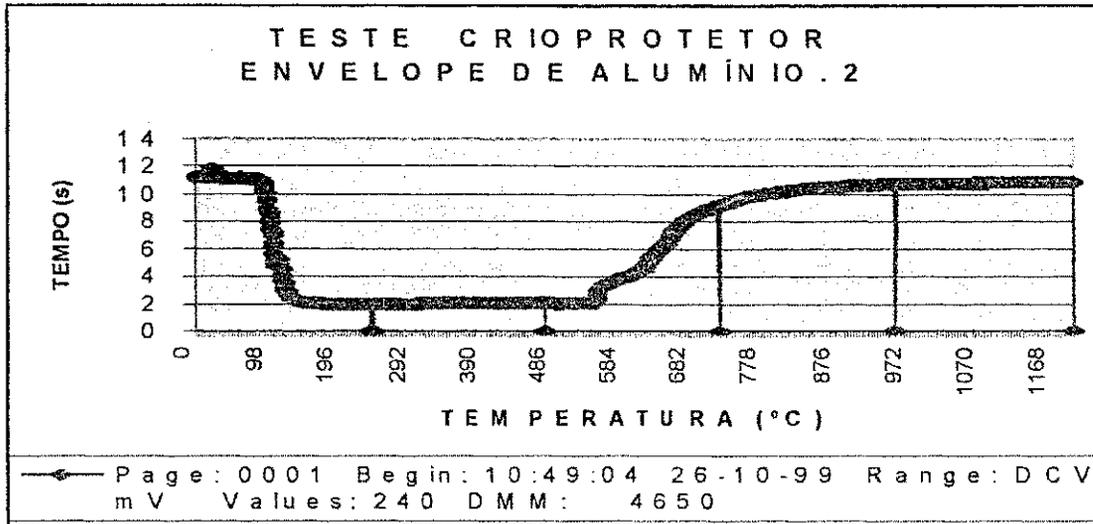
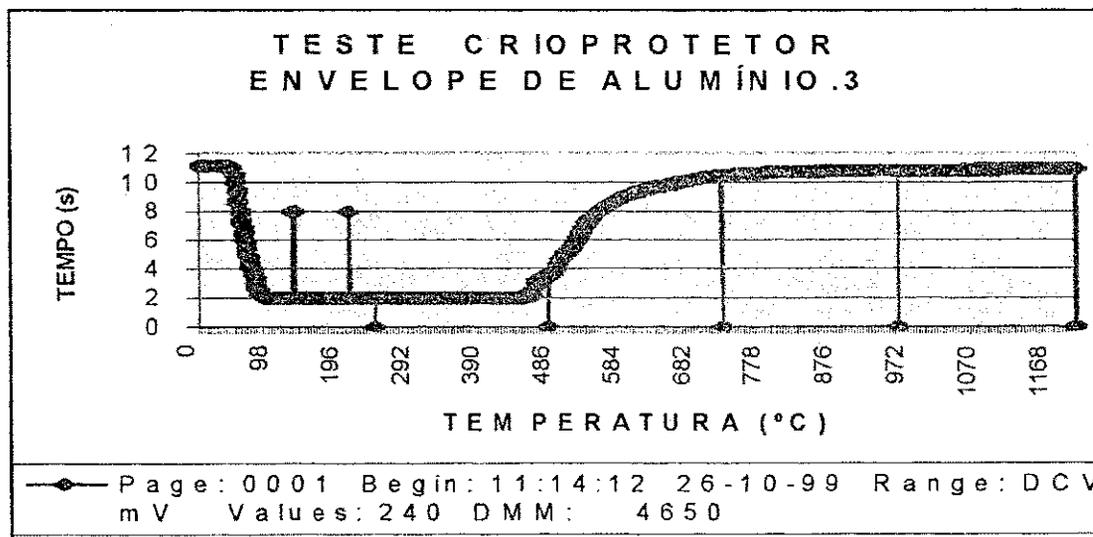


Gráfico Nº 16 – Crioprotetor-3.3 Envelope de alumínio imerso em nitrogênio líquido.



Os gráficos apresentam valores referentes ao tempo de exposição das sementes ao nitrogênio líquido, desde o momento de imersão no botijão criogenico, até a estabilidade da temperatura entre o nitrogênio e o material biológico imerso.

FICHA TÉCNICA UTILIZADA NO TESTE DE GERMINAÇÃO – TG e TESTE DE VIGOR – TV.

TESTE DE GERMINAÇÃO

Esp. Gergelim (*Sesamum indicum* L.)

Var. () Seridó-1 () CNPA-G2 () CNPA-G3

DATA: ___ / ___ / ___ - ___ / ___ / ___

Tamanho da amostra: 200 sementes

1. Repetição com 50 sementes em cada placa de Petri, no total de 4 repetições.

$$R = Z \times 2 = Y$$

Z = Número de sementes;

Y = Número total em porcentagem;

Contagem de Dias

Teste de 1ª contagem

Teste final

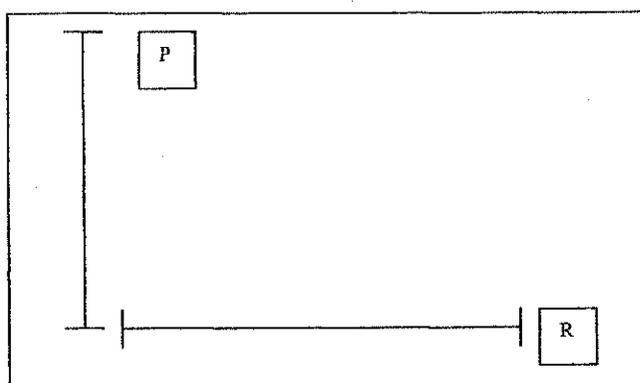
R.1 = () x 2 = (%)	R.1 = () x 2 = (%)
R.2 = () x 2 = (%)	R.2 = () x 2 = (%)
R.3 = () x 2 = (%)	R.3 = () x 2 = (%)
R.4 = () x 2 = (%)	R.4 = () x 2 = (%)
R total = (%)	R total = (%)

TESTE DE VIGOR

2. Número de plântulas com maior vigor, desenho esquemático da plântula média

(Hipocótilo + Raiz).

R.1 = () - (cm)
R.2 = () - (cm)
R.3 = () - (cm)
R.4 = () - (cm)
R total = (cm)



DADOS COLETADOS NOS TESTES DE GERMINAÇÃO (TG) E TESTE DE VIGOR (TV).Cultivar: GERGELIM (*Sesamum indicum* L.)

Variedade: Seridó - 1

Períodos de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias

Crioprotetores: Sem Crioprotetor, Crioprotetor 1 - Tubo polietileno, Crioprotetor 2 - Envelope de alumínio e Crioprotetor 3 - Amido de milho.

Temperatura de descongelamento : Temperatura Ambiente e Banho Termostatizado (40°C).

GERMINAÇÃO																
T.ARMazen.	0				5				30				60			
SEM CRIOPROT.	T. A				T. A				T. A				T. A			
	96	95	95	97	70	70	69	68	64	70	66	70	80	86	82	86
	B. T				B. T				B. T				B. T			
CRIOP. 1	98	98	97	99	72	70	70	73	76	74	64	60	72	70	74	76
	T. A				T. A				T. A				T. A			
	90	93	92	93	82	80	80	80	84	84	82	76	96	92	96	90
CRIOP. 2	B. T				B. T				B. T				B. T			
	95	95	97	96	70	70	65	65	70	70	66	62	80	76	74	78
	T. A				T. A				T. A				T. A			
CRIOP. 3	93	93	90	92	83	85	84	84	86	88	82	88	78	82	74	80
	B. T				B. T				B. T				B. T			
	93	93	94	92	75	70	60	60	74	72	60	60	86	88	90	88
CRIOP. 3	T. A				T. A				T. A				T. A			
	88	88	90	86	35	30	30	30	34	26	28	28	62	50	54	50
	B. T				B. T				B. T				B. T			
CRIOP. 3	88	88	94	90	35	30	30	20	38	32	24	20	78	62	60	60
	VIGOR															
	SEM CRIOP	T. A				T. A				T. A				T. A		
50		50	52	56	20	20	20	22	14	20	22	16	50	62	46	50
B. T				B. T				B. T				B. T				
CRIOP. 1	60	60	62	58	50	50	40	45	52	56	40	44	40	46	50	44
	T. A				T. A				T. A				T. A			
	53	54	56	61	30	30	35	35	30	28	34	26	70	56	70	60
CRIOP. 2	B. T				B. T				B. T				B. T			
	58	58	58	57	20	20	30	20	18	24	30	20	52	48	50	50
	T. A				T. A				T. A				T. A			
CRIOP. 3	48	48	48	47	31	39	50	50	30	58	48	44	38	44	44	40
	B. T				B. T				B. T				B. T			
	52	52	50	54	25	25	20	22	26	24	20	22	50	46	44	40
CRIOP. 3	T. A				T. A				T. A				T. A			
	42	40	38	40	15	19	20	20	10	10	10	10	24	20	22	24
	B. T				B. T				B. T				B. T			
CRIOP. 3	43	43	43	42	10	10	20	20	16	12	12	20	24	20	30	26

DADOS COLETADOS NOS TESTES DE GERMINAÇÃO (TG) E TESTE DE VIGOR (TV).Cultivar: GERGELIM (*Sesamum indicum* L.)

Variedade: CNPA – G2

Períodos de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias

Crioprotetores: Sem Crioprotetor, Crioprotetor 1 – Tubo polietileno, Crioprotetor 2 – Envelope de alumínio e Crioprotetor 3 – Amido de milho.

Temperatura de descongelamento : Temperatura Ambiente e Banho Termostatizado (40°C).

GERMINAÇÃO																
T.ARMazen.	0				5				30				60			
SEM CRIOPROT.	T. A															
	97	97	98	96	70	70	60	65	70	74	78	72	92	96	92	86
	B. T				B. T				B. T				B. T			
CRIOP. 1	96	97	98	98	80	80	65	60	82	80	64	62	78	90	82	88
	T. A				T. A				T. A				T. A			
	95	95	95	94	80	90	85	85	88	90	82	80	96	92	90	90
CRIOP. 2	B. T															
	96	96	94	98	70	75	75	70	76	74	74	72	94	90	90	86
	T. A				T. A				T. A				T. A			
CRIOP. 3	94	94	97	95	90	80	80	85	92	84	90	86	96	94	84	82
	B. T				B. T				B. T				B. T			
	92	92	90	94	80	85	90	90	84	88	90	86	96	90	96	94
SEM CRIOP	T. A															
	90	88	89	93	45	40	50	55	44	40	54	56	80	84	88	90
	B. T				B. T				B. T				B. T			
CRIOP. 1	92	90	91	95	78	60	60	65	78	64	66	62	84	86	82	80
	T. A				T. A				T. A				T. A			
	65	65	64	65	40	40	30	20	40	38	30	20	64	58	58	64
CRIOP. 2	B. T															
	67	65	69	67	30	40	25	30	32	40	24	26	36	60	46	50
	T. A				T. A				T. A				T. A			
CRIOP. 3	62	60	60	64	55	50	60	50	56	50	60	50	64	70	48	56
	B. T				B. T				B. T				B. T			
	63	63	62	64	50	58	40	30	50	58	40	48	75	66	66	60
SEM CRIOP	T. A															
	60	60	62	58	40	40	40	25	46	50	44	30	72	74	70	70
	B. T				B. T				B. T				B. T			
CRIOP. 1	62	62	60	64	30	45	45	50	36	40	50	56	68	62	74	70
	T. A				T. A				T. A				T. A			
	62	62	58	58	15	20	20	20	18	10	20	30	34	48	50	40
CRIOP. 2	B. T															
	63	61	60	68	30	30	20	25	32	24	26	40	26	38	34	36
	T. A				T. A				T. A				T. A			

DADOS COLETADOS NOS TESTES DE GERMINAÇÃO (TG) E TESTE DE VIGOR (TV).Cultivar: GERGELIM (*Sesamum indicum* L.)

Variedade: CNPA-G3

Períodos de armazenagem: 0, 5, 30 e 60 dias

Crioprotetores: Sem Crioprotetor, Crioprotetor 1 – Tubo polietileno, Crioprotetor 2 – Envelope de alumínio e Crioprotetor 3 – Amido de milho.

Temperatura de descongelamento : Temperatura Ambiente e Banho Termostatizado (40°C).

GERMINAÇÃO																
T.ARMazen.	0				5				30				60			
SEM CRIOPROT.	T. A				T. A				T. A				T. A			
	96	95	95	97	85	85	85	80	88	82	90	90	96	96	92	94
	B. T				B. T				B. T				B. T			
CRIOP. 1	91	93	90	94	60	60	70	75	68	74	66	70	96	94	96	90
	T. A				T. A				T. A				T. A			
	94	94	93	95	90	95	95	90	96	96	94	92	96	90	94	94
CRIOP. 2	B. T				B. T				B. T				B. T			
	91	91	90	91	90	95	90	92	94	94	90	90	98	92	90	88
	T. A				T. A				T. A				T. A			
CRIOP. 3	90	88	90	92	95	95	95	95	96	94	96	96	96	94	94	90
	B. T				B. T				B. T				B. T			
	91	90	90	93	93	90	93	95	96	92	94	96	96	94	98	94
CRIOP. 3	T. A				T. A				T. A				T. A			
	88	83	88	93	48	60	50	50	48	56	50	54	76	78	74	74
	B. T				B. T				B. T				B. T			
SEM CRIOP	90	88	88	96	60	65	65	65	68	64	62	68	86	82	80	84
	VIGOR															
	SEM CRIOP	T. A				T. A				T. A				T. A		
63		62	61	66	45	45	50	50	46	50	52	40	74	72	70	70
B. T				B. T				B. T				B. T				
CRIOP. 1	60	63	57	60	41	43	45	60	46	60	54	40	76	74	76	72
	T. A				T. A				T. A				T. A			
	62	62	60	64	40	40	50	55	50	56	58	44	76	78	74	76
CRIOP. 2	B. T				B. T				B. T				B. T			
	62	58	58	62	62	61	63	63	66	72	62	60	72	70	68	68
	T. A				T. A				T. A				T. A			
CRIOP. 3	60	60	60	60	60	65	65	60	64	66	70	60	78	76	74	76
	B. T				B. T				B. T				B. T			
	59	59	57	61	70	62	60	58	70	66	60	62	70	68	66	68
CRIOP. 3	T. A				T. A				T. A				T. A			
	58	58	57	59	20	20	20	25	24	18	14	20	42	32	50	40
	B. T				B. T				B. T				B. T			
CRIOP. 3	60	60	58	62	30	20	25	25	30	20	26	22	40	46	42	50