



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**  
**COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**



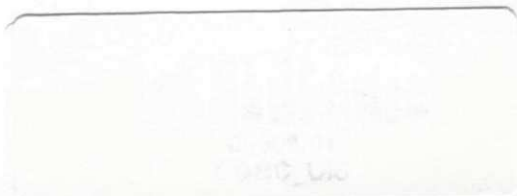
Centro de Ciências  
e Tecnologia

**DISSERTAÇÃO**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PROCESSAMENTO E**  
**ARMAZENAMENTO DE PRODUTOS AGRÍCOLAS**

**CULTIVO IN VITRO E CRIOARMazenagem de sementes de**  
**MAMONA (*Ricinus communis* L.)**

**AILTON MELO DE MORAES**

**Campina Grande - Paraíba**  
**JULHO - 2001**



**AILTON MELO DE MORAES**

**CULTIVO *IN VITRO* E CRIOARMazenagem DE SEMENTES  
DE MAMONA (*Ricinus communis* L.)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**

**Campina Grande – Paraíba  
JULHO - 2001**

**AILTON MELO DE MORAES**

**CULTIVO *IN VITRO* E CRIOARMAZENAGEM DE SEMENTES  
DE MAMONA (*Ricinus communis* L.)**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de Mestre.**

**Área de concentração: Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – DEAg/CCT/UFPB**

**Co-orientadores: Dr<sup>a</sup>. Julita Maria Frota Chagas Carvalho – Embrapa/CNPA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josivanda P. Gomes de Gouveia – DEAg/CCT/UFPB**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**JULHO - 2001**



M827c Moraes, Ailton Melo de  
Cultivo in vitro e criação e armazenamento de sementes de mamona  
(*Ricinus communis* L.) / Ailton Melo de Moraes. - Campina  
Grande, 2001.  
95 f. : il.

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

1. Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas  
2. Mamona - Cultura 3. Engenharia Agrícola 4. Dissertação  
I. Almeida, Francisco de Assis Cardoso II. Carvalho, Julita  
Maria Frota Chagas III. Gouveia, Josivanda Palmeira Gomes  
de IV. Universidade Federal da Paraíba - Campina Grande  
(PB) V. Título


CDU 631.563(043)

**AILTON MELO DE MORAES**

**CULTIVO *IN VITRO* E CRIOARMazenagem DE SEMENTES  
DE MAMONA (*Ricinus communis* L.)**

Aprovada em \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**



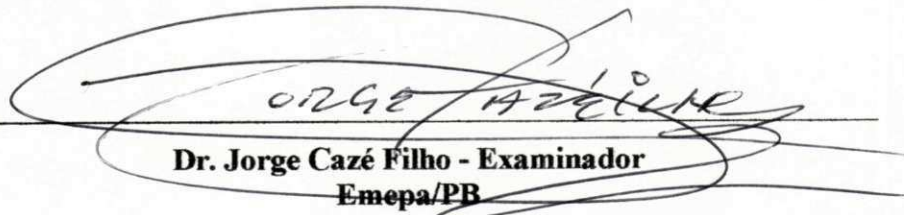
**Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida – Orientador  
DEAg/CCT/UFPB**



**Dr.ª. Julita Maria Frota Chagas Carvalho – Co-orientadora  
Embrapa/CNPA**



**Prof. Dr.ª. Josivanda Palmeira Gomes de Gouveia – Co-orientadora  
DEAg/CCT/UFPB**



**Dr. Jorge Cazé Filho - Examinador  
Emepa/PB**

*A Deus,*

*Aos meus pais, irmãos, esposa, filhos, avós, tios e primos,*

*Aos meus amigos e as pessoas que admiro e amo,*

*A todos que acreditam no futuro,*

*Dedico este trabalho*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal da Paraíba, por minha formação profissional, bem com a Coodenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

De um modo especial aos meus orientadores: Prof. Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida; Dr<sup>a</sup>. Julita Maria Frota Chagas Carvalho e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Josivanda Palmeira Gomes de Gouveia na elaboração deste trabalho.

A Secretaria de Educação do Estado da Paraíba por minha liberação para a realização desta pesquisa.

A secretária do DEAg/UFPB, na pessoa de Rivanilda Diniz Sobreiro de Almeida, pelas constantes colaborações.

Aos amigos de turma: Adjailsa, Alana, Antônio, Bené, Elaine, Elessandra, Flávio, José Carlos, Márcia, Michel, Patrícia, Paulinho, 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.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Algodão Embrapa/CNPA - Campina Grande, PB pela realização de parte do trabalho no Laboratório de Biotecnologia e pela doação das sementes, facilitadas pelos Drs. Demóstenes Marcos Pedrosa de Azevedo e Emídio Ferreira Lima.

Aos auxiliares de laboratório do CNPA Mário Brito do Nascimento e Dione Márcia de Souza pela convivência amigável e ao Sérgio Cobel pelas fotografias.

## SUMÁRIO

Páginas

**LISTA DE FOTOGRAFIAS**

**LISTA DE GRÁFICOS**

**LISTA DE QUADRO**

**LISTA DE TABELAS**

**RESUMO**

**SUMMARY**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>22</b>
2.1. Descrição Geral, Importância e Origem da Espécie.....	23
2.2. Qualidade Fisiológica das Sementes.....	24
2.3. Crioarmazenagem.....	25
2.4. Cultivo <i>In vitro</i> .....	30
2.4.1. Assepsia das Sementes.....	30
2.4.1. Indução a Calogênese.....	33
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1. Indução a Calogênese.....	38
3.1.1. Material Vegetal.....	38
3.2. Crioarmazenagem.....	39
3.3. Procedimento Geral do Cultivo <i>In vitro</i> .....	40
3.3.1. Explantes Primários.....	40



3.3.2. Assepsia do Material Vegetal.....	41
3.3.3. Esterilização dos Instrumentos.....	41
3.3.4. Recipientes de Cultivo.....	42
3.3.5. Meios de Cultivo.....	42
3.3.6. Reguladores de Crescimento.....	44
3.3.7. Preparação dos Reguladores de Crescimento.....	45
3.3.8. Obtenção e Análise dos Dados.....	46
3.4. Procedimento Geral de Crioarmazenagem.....	48
3.4.1. Obtenção do Nível Crítico de Umidade para Crioarmazenagem.....	48
3.4.2. Teste Padrão de Germinação – TPG.....	50
3.4.3. Testes de Vigor.....	51
3.4.4. Análise dos Dados Estatísticos.....	52
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
4.1. Nível Crítico de Umidade para Crioarmazenagem (NCUC).....	54
4.2. Crioarmazenagem.....	57
4.3. Cultivo <i>In vitro</i> .....	64
4.3.1. Assepsia das Sementes.....	64
4.3.2. Indução a Calogênese.....	68
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>80</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografias	Páginas
1. Variedades de <i>Ricinus communis</i> nordestina (N) e pernambucana (P).....	39
2. Plântulas de <i>Ricinus communis</i> germinadas <i>in vitro</i> .....	40
3. Sementes inoculadas em meio MS.....	47
4. Sementes de <i>Ricinus communis</i> germinadas em papel germitest.....	50
5. Peso seco das plântulas consideradas normais: nordestina (N) e pernambucana (P).....	51
6. Calos friáveis, induzidos a partir de explantes do hipocótilo da variedade nordestina em meio MS suplementado com reguladores de crescimento.....	75
7. Calos friáveis, induzidos a partir de explantes do hipocótilo da variedade pernambucana em meio MS suplementado com reguladores de crescimento.....	76

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráficos	Páginas
1. Efeito da adição de reguladores de crescimento para a interação <i>variedades versus concentração de reguladores de crescimento</i> ao meio MS sobre o Incremento de Peso Unitário (IPU) das duas variedades de <i>Ricinus communis</i> , em cada meio (a) e do efeito dos meios sobre as variedades (b) depois do vigésimo oitavo dia da inoculação.....	74

## LISTA DE QUADROS

Quadros	Páginas
1. Limite Máximo de umidade para congelamento (HMFL) de sementes de algumas espécies.....	27
2. Características de alguns desinfestantes.....	31
3. Alguns meios recomendados e usados em cultura de tecidos vegetais.....	36
4. Composição das soluções concentradas utilizadas na preparação do meio de cultivo MS.....	43
5. Quantidade de soluções concentradas, fonte de carbono e solidificante necessárias para preparação de 1 l do meio MS.....	44
6. Combinações de auxina e citocinina adicionadas ao meio básico MS.....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabelas	Páginas
1. Análise de variância da viabilidade das sementes de duas variedades de <i>Ricinus communis</i> , após a crioarmazenagem em nitrogênio líquido a -196 °C, durante três dias.....	54
2. Valores médios da viabilidade das sementes de duas variedades de <i>Ricinus communis</i> , após a crioarmazenagem em nitrogênio líquido a - 196 °C, durante três dias.....	55
3. Valores médios do desdobramento da interação <i>variedade versus teor de umidade</i> para a variável <i>viabilidade</i> das sementes de duas variedades de <i>Ricinus communis</i> crioarmazenadas por três dias.....	57
4. Análise de variância da viabilidade das sementes de duas variedades de <i>Ricinus communis</i> , com teor de umidade de 6% b.u., acondicionadas em canister de PVC e de alumínio e crioarmazenadas durante 3, 30, e 60 dias..	58
5. Valores médios da crioarmazenagem sobre a viabilidade das sementes de duas variedades de <i>Ricinus communis</i> , com teor de umidade de 6%b.u., acondicionadas em canister de PVC e de alumínio, durante 3, 30 e 60 dias.	59
6. Valores médios do desdobramento da interação <i>variedade versus temperatura de crioarmazenagem</i> para a variável <i>viabilidade</i> das sementes com teor de umidade de 6% b.u., submetida a crioarmazenagem em dois tipos de acondicionamento por três períodos.....	61
7. Valores médios do desdobramento da interação <i>variedade versus acondicionamento das sementes</i> para a variável <i>viabilidade</i> das sementes com teor de umidade de 6% b.u., submetida a crioarmazenagem em dois tipos de acondicionamento por três períodos.....	62

8.	Valores médios do desdobramento da interação <i>período versus temperatura de criarmazenagem</i> para a variável <i>viabilidade</i> das sementes com teor de umidade de 6% b.u., submetida a criarmazenagem em dois tipos de acondicionamento por três períodos.....	63
9.	Valores médios do desdobramento da interação <i>temperatura versus acondicionamento das sementes</i> para a variável <i>viabilidade</i> das sementes com teor de umidade de 6% b.u., submetida a criarmazenagem em dois tipos de acondicionamento por três períodos.....	64
10.	Análise de variância de <i>plântulas sadias e sementes contaminadas</i> de duas variedades de <i>Ricinus communis</i> , tratadas com hipoclorito de sódio a 2,0 e 2,5% durante 5 e 10 minutos, utilizando como substrato o meio MS.....	65
11.	Efeito dos tratamentos de assepsia em sementes de duas variedades de <i>Ricinus communis</i> na produção de plântulas em meio MS.....	66
12.	Valores médios do desdobramento da interação <i>quebra de dormência versus concentração de NaOCl</i> para as variáveis plântulas sadias de duas variedades de <i>Ricinus communis</i> , tratadas com hipoclorito de sódio a 2,0 e 2,5%, durante 5 e 10 minutos, utilizando como substrato meio MS.....	67
13.	Análise de variância da indução de calos de duas variedades de <i>Ricinus communis</i> , cultivadas em meio MS suplementado com reguladores de crescimento.....	68
14.	Valores médios da indução de calos no vigésimo oitavo dia da inoculação de duas variedades de <i>Ricinus communis</i> , cultivadas em meio MS suplementado com reguladores de crescimento.....	69
15.	Valores médios no vigésimo oitavo dia da inoculação do desdobramento da interação <i>variedade versus concentração de reguladores de crescimento</i> , para a variável Incremento de Peso Unitário (IPU).....	73
16.	Caracterização das sementes das duas variedades de <i>Ricinus communis</i> em diferentes teores de umidade.....	93

**RESUMO**

## RESUMO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) tem grande importância para a economia do semi-árido nordestino que é responsável por 80% da produção nacional, mas, entre a década de 70 e o ano 2000, a produção líquida dessa oleaginosa foi reduzida de 80%. Registrou-se também a existência de uns 90 tipos diferentes de sementes empregadas no cultivo desta *Euforbiaceae*. Devido a este problema, o trabalho objetivou desenvolver técnica de criarmazenagem e de micropropagação visando manter a estabilidade genética de duas variedades de *Ricinus communis* ou ao menos reduzir o risco de instabilidade no tempo. Em toda a pesquisa o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo que, na desinfestação das sementes os dados foram tomados no 14º dia da inoculação, com arranjo fatorial 2 x 2 x 2 x 2 (2 variedades x 2 métodos de quebra de dormência x 2 concentrações de cloro ativo x 2 períodos de descontaminação) com dez repetições contendo três sementes por frasco; na indução a calogênese os dados foram tomados no 28º dia da inoculação dos explantes, com arranjo fatorial 2 x 12 (2 variedades x 12 concentrações de reguladores de crescimento) com dez repetições contendo três explantes por frasco e na criarmazenagem os dados foram tomados no 7º e 14º dia depois da semeadura, com arranjo fatorial 2 x 3 x 2 x 2 (2 variedades x 3 períodos de criarmazenagem x 2 temperaturas de criarmazenagem x 2 tipos de acondicionamento) com oito repetições de vinte e cinco sementes cada. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos fatores qualitativos comparados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Com os resultados obtidos concluiu-se que: o nível crítico de umidade para a criarmazenagem das sementes das duas variedades de *Ricinus communis* (nordestina e pernambucana) encontra-se entre 4 e 10% base úmida; as sementes das variedades de *Ricinus communis* estudadas obtiveram uma melhor performance na sua qualidade fisiológica aos trinta dias de sua criarmazenagem e podem ser criarmazenadas tanto no vapor (-176 °C) como na imersão (-196 °C) em nitrogênio líquido; o canister de alumínio utilizado para acondicionar as sementes mostrou-se superior ao de PVC; a melhor metodologia para a desinfestação de sementes das duas variedades de *Ricinus communis* estudadas é a que utiliza sementes sem tegumento esterilizadas em solução com 2,0% de cloro ativo durante 10 minutos; a melhor produção de calos friável foi obtida com explante do hipocótilo em meio composto por 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de ANA com 2,0 mg.l<sup>-1</sup> de 2iP (MS10) para a variedade nordestina e o meio composto por 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de ANA com 2,0 mg.l<sup>-1</sup> de BAP (MS6) para a variedade pernambucana.



## SUMMARY

The castor (*Ricinus communis* L.) has great importance for the economy of the half-barren northeastern that is responsible for 80% of the national production, but between the decade of 70 and the year 2000, the liquid production of this oleaginous was reduced at 80%. The existence of about 90 different types of seeds used in the culture of this Euphorbiaceous was also registered. According to this problem the objective of this was work to develop a technique of cryoconservation and micropropagation aiming during to keep the genetic stability of two varieties of *Ricinus communis* or at least reducing the risk of instability during the time. In all the research the used experimental delineation was entirely casually, being that in the sterilized of the seeds the data was taken at the 14<sup>th</sup> day of the inculcator, with a factorial array of 2 x 2 x 2 x 2 (2 varieties x 2 methods of dormancy in addition x 2 active chlorine concentrations x 2 periods of decontamination) with ten replications containing three seeds for bottle; in the induction callus the data had been taken in 28<sup>o</sup> day of the inoculation of the explants, with factorial array 2 x 12 (2 varieties x 12 concentrations of regulators of growth) with ten replications containing three explants for each bottle and in the crioconservation the data was taken at the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day after the sowing, with a factorial array of 2 x 3 x 2 x 2 (2 varieties x 3 periods of crioconservation x 2 temperatures of crioconservacion x 2 types of preservation) with eight replications of twenty and five seeds each. The obtained data were submitted to analysis of variance and their averages of the qualitative factors compared by the test of Tukey, 5% of probability. With the obtain results it can be concluded that: the critical level of moisture for the crioconservation of the seeds of the two varieties of *Ricinus communis* (northeastern and pernambucana) was between 4 and 10% wet base; the seeds of the studied varieties of *Ricinus communis* had a better performance in its physiological quality at its thirty days of crioconservation and can either be cryostoraged in the vapor (-176 °C) or by immersion (-196 °C) in liquid nitrogen; canister of aluminum to condition the seeds revealed to be betterthan the one of PVC; the best methodology for the decontamination of seeds of the two studied varieties of *Ricinus communis*. Is the one that uses seeds without sterilized tegument in a solution with 2,0% of active chlorine during 10 minutes; the best production of friables calluses was obtained by with explained of hypocotyls with half composition of 1,0 mg.l-1 of ANA and 2,0 mg.l-1 of 2iP (MS10) for the variety northeastern and the half composition of 1,0 mg.l-1 of ANA and 2,0 mg.l-1 of BAP (MS6) for the pernambucana variety.

---

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura da mamona tem grande importância para a economia do semi-árido nordestino, por sua resistência à seca, como fator fixador de mão-de-obra, gerador de emprego e de matéria-prima indispensáveis ao desenvolvimento da região e do País (Azevedo et al., 1997).

O Brasil figurou, durante algumas décadas, como maior produtor mundial de mamona e maior exportador de seu principal subproduto, o óleo. Na safra de 1974 foram produzidas aproximadamente 573.000 t de mamona; já em 2000, a produção nacional foi de apenas 115.000 t, o que representa uma redução líquida de 80% (Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 1975 e 2001).

A Associação Nacional das Indústrias de Mamona (ANIMA, 1991) relata que a situação da ricinocultura brasileira é de descaso quase total. No Nordeste, onde se concentra a maior produção nacional (80%) falta semente melhorada e há degenerescência dos materiais cultivados, além da ausência de sistemas de cultivo mais produtivos, racionais e adaptados às condições do semi-árido.

No nosso país há uma heterogeneidade muito grande da cultura de mamona, cerca de 90 tipos diferentes de sementes, necessitando estudos para conservar este patrimônio e definição das melhores para as diferentes regiões.

Na atualidade, a agricultura do mundo depende fundamentalmente das sementes, logo, a manutenção de sua viabilidade durante o seu armazenamento é de particular importância. Para Chin (1988), a maioria das sementes se mantém viáveis por mais tempo quando secas e armazenadas a baixas temperaturas, em recipientes fechados.

---

Os termos sementes *ortodoxas e recalcitrantes*, introduzidos por Roberts (1973) descrevem o comportamento das sementes durante o seu armazenamento. As sementes *ortodoxas* podem ser secas e conservadas a baixas temperaturas durante longos períodos de tempo, no entanto as *recalcitrantes* perdem sua viabilidade quando secas abaixo de um, relativamente elevado, nível crítico de umidade (12 – 13% b.u.).

As técnicas de conservação de recursos fitogenéticos serão tanto mais efetivas quanto maior for o conhecimento que se adquira da fisiologia do material a conservar, seja este semente, propágulo vegetativo ou pólen. Concretamente, os estudos sobre fisiologia da semente estão adquirindo nos dias atuais uma importância que encontra sua justificação muito maior no interesse de sua conservação que na sua multiplicação em escala comercial.

A conservação *ex situ* surge como alternativa aos problemas que planeia a conservação *in situ*, já que o estudo da espécie no próprio ecossistema resulta num trabalho moroso e caro, e às vezes inviável.

Entre as alternativas a conservação de sementes fora de seu ambiente se apresenta a crioconservação que utiliza o congelamento rápido a baixas temperaturas como método de conservação do material vivo, por meio da redução ou inibição total do seu metabolismo, sem causar danos ao material vegetal, pois se obtém a vitrificação das células, isto é, os componentes celulares solidificam, formando *um vidro*, sem haver formação de gelo. Sendo a conservação em nitrogênio líquido (-196 °C) apontado como o método mais seguro para manter por períodos teoricamente ilimitados os recursos fitogenéticos (González-Armao, 2000).

A expressão “cultivo *in vitro* de plantas” é utilizada para denominar de forma genérica um conjunto de técnicas nas quais, ao menos em algum momento do seu desenvolvimento, recorre-se ao cultivo do material em condições assépticas dentro de um recipiente, mais ou menos hermético contendo um meio nutritivo sintético, sobre condições ambientais controladas.

Por meio da multiplicação vegetativa *in vitro* se dirige o crescimento e o desenvolvimento do explante, permitindo a obtenção, em um curto período de tempo, a um grande número de indivíduos geneticamente idênticos entre si e ao material vegetal de partida, independentemente da época do ano e em um espaço físico reduzido.

As técnicas de cultivo *in vitro* são utilizadas para a conservação de germoplasma, tanto a médio quanto a longo prazo, sendo necessário, para tal fim, muitas vezes recorrer a micropropagação da espécie ou variedade que se deseja conservar.

Desta forma pode-se enumerar como os principais objetivos da conservação *in vitro*: (a) manter a estabilidade genética do material conservado ou ao menos reduzir os riscos de instabilidade no tempo; (b) evitar os subcultivos regulares, pelos riscos da variação somaclonal e custo; (c) permitir a propagação em grande escala; (d) obter aplicabilidade a um grande número de espécies e genótipos; (e) permitir o intercâmbio de material vegetal de forma rápida e eficiente; (f) desenvolver uma tecnologia econômica e simples que diminua o trabalho.

Entretanto, de acordo com o objetivo e o tipo de cultura, existem três fatores os quais estão relacionados entre si e que devem estar sempre em mente das pessoas envolvidas com a cultura de tecidos: a metodologia de obtenção de preparo e de desinfestação do material vegetal, a composição do meio nutritivo e as condições do ambiente físico da sala de crescimento e do recipiente de cultivo (Aitken-Christie et al., 1995).

Em razão da importância da cultura da mamona para o Nordeste do Brasil e dos problemas em que se encontra a ricinocultura brasileira, realizou-se o presente trabalho visando desenvolver técnicas de conservação *ex situ* para duas variedades de mamona com o objetivo geral de manter a estabilidade genética do material conservado ou ao menos reduzir o risco de instabilidade no tempo, com uma tecnologia simples e econômica e, como específicos:

✓ determinar o Nível Crítico de Umidade para a Crioarmazenagem (NCUC) de sementes de duas variedades de *Ricinus communis* (nordestina e pernambucana).

✓ avaliar a qualidade fisiológica das sementes de duas variedades de *Ricinus communis* (nordestina e pernambucana) submetidas a crioconservação no vapor (-176 °C) e na imersão (-196 °C) em nitrogênio líquido, acondicionadas em canister de PVC e de alumínio, durante 3, 30 e 60 dias de Crioarmazenagem;

---

✓ estabelecer metodologia para a desinfestação de sementes de duas variedades de *Ricinus communis*, utilizando hipoclorito de sódio (NaOCl) e como substrato para a germinação o meio MS;

✓ comparar o Incremento de Peso Unitário (IPU) de calos produzidos a partir de segmentos do hipocótilo de duas variedades de *Ricinus communis*, cultivadas *in vitro* em meios MS modificados e suplementadas com auxina (ANA) e citocinina (BAP, CIN e 2iP).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Descrição Geral, Importância e Origem da Espécie

A mamoneira pertence à classe Dicotyledoneae, série Geraniales, família Euforbiaceae e espécie *Ricinus Communis* L. Entre os seus parentes mais próximos estão a mandioca, a seringueira e o pinhão. Apresenta grande variação quanto ao porte, à coloração da folhagem e do caule, ao tamanho da semente a cor e ao conteúdo de óleo; sua semente é carunculada de forma e tamanho variado, podendo apresentar várias cores; sendo basicamente constituída por carúncula, radícula, hipocótilo, cotilédone, endosperma, tegumento externo e película (Weiss, 1983).

Segundo Azevedo et al. (1997) a cultura da mamona reveste-se de grande importância para a economia do semi-árido nordestino, tanto como cultura alternativa de reconhecida resistência à seca, como fator fixador de mão-de-obra, gerador de emprego e de matéria-prima indispensável ao desenvolvimento da região e do país. Seus restos culturais podem devolver ao solo 20 t.ha<sup>-1</sup> de biomassa e as folhas podem servir de alimento para o bicho da seda. Sua haste, além da celulose para a fabricação de papel, pode fornecer matéria-prima para tecidos grosseiros e, das sementes, são extraídos a torta e o óleo, que é tido como um dos mais versáteis da natureza, de qualidade só comparável à do petróleo, com a vantagem de ser um produto renovável e barato.

Os botânicos não chegaram a uma conclusão quanto à origem da mamoneira, visto que, ela tem uma ampla disseminação, uma ótima adaptação e se estabelece como planta



nativa nas diferentes partes do mundo. O Leste africano, particularmente a Etiópia, parece ser o seu centro de origem (Weiss, 1971 e 1983). Azevedo et al. (1997) cita que para melhoristas soviéticos há quatro principais centros de origem: a região iraniana-afegã-soviética, a Palestina/Oeste asiático, Índia/China e Península arábica.

## 2.2. Qualidade Fisiológica das Sementes

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

Para Puzzi (2000) a qualidade fisiológica está relacionada com a capacidade da semente desempenhar funções vitais, como germinação, vigor e longevidade e que os efeitos sobre a qualidade fisiológica, geralmente são traduzidos pelo decréscimo na porcentagem de germinação, no aumento de plântulas anormais e pela redução do vigor das plântulas.

Almeida et al. (1999) revisando sobre sementes relata que o primeiro atributo da qualidade fisiológica a ser considerado em um lote de sementes é a porcentagem de germinação, que representa a capacidade da semente em dar origem a uma plântula normal. Assim, toda semente destinada ao plantio deverá ser cuidadosamente beneficiada e conservada durante o período de armazenamento, até o momento de sua utilização, para garantir a preservação de sua qualidade fisiológica.

Almeida et al. (1999) adverte que a qualidade da semente não melhora durante o armazenamento e, por isso, ao ser armazenada, a qualidade inicial da semente é o fator fundamental na conservação da germinação e do vigor.

Pesquisas realizadas por Lima et al. (1999); Cavalcanti Mata et al. (1999) e Sousa et al. (1999) revelaram que a germinação e o vigor são influenciados pelo armazenamento, ocorrendo perdas mais acentuadas ao longo do período de armazenagem.

Vieira e Carvalho (1994) afirmam que a altura ou comprimento da planta visa determinar o vigor relativo de um lote de sementes, avaliando-se a altura média das plantas, baseado no princípio de que sementes que produzem plantas com maiores valores de comprimentos médios da parte aérea são consideradas mais vigorosas, e que 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.

Ainda os mesmos autores relatam que as principais associações que congregam tecnologistas de sementes (ISTA e AOSA) têm, cada uma, a sua definição de vigor.

Para a ISTA (1981): “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” e para a AOSA (1983): “Vigor de sementes compreende aquelas 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”.

A longevidade natural das sementes pode variar de poucos dias a centenas de anos, existindo relatos de sementes que se mantiveram viáveis por mais de 3.000 anos (Roos, 1986 e Chin, 1988).

### 2.3. Criarmazenagem

A técnica da criopreservação, isto é, o armazenamento em nitrogênio líquido (NL, -196 °C), proporciona o potencial para uma preservação sem limites de tempo, com a redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é virtualmente paralisada (Kantha,

1985). Os outros métodos de conservação somente adiam a deterioração por um período de tempo determinado e específico de acordo com o material a espécie em questão.

Para Vieira (2000) a criopreservação é uma técnica que permite manter o germoplasma por vários anos (*long term storage*) sob temperatura ultra-reduzida, em geral, -196 °C. Nessa temperatura, a movimentação de moléculas é super reduzida e não há fase líquida na célula. A maioria das sementes tolerantes à desidratação sobrevive a tratamentos criogênicos, isto é, a temperaturas abaixo de -130 °C; no entanto nesse estado, muitas das reações celulares que levam à deterioração são minimizadas e se obtêm longevidade extremamente alta, isto é, por dezenas de anos. Na prática, devido ao seu custo relativamente baixo, utiliza-se nitrogênio líquido (NL -196 °C) ou o seu vapor (-150 a -180 °C) para a conservação de sementes. Já as sementes sensíveis à dessecação, ditas recalcitrantes, comuns em espécies aquáticas, plantas de sementes grandes, certas espécies tropicais e algumas arbóreas nativas de áreas temperadas. O coco, o cacau, a manga e a seringueira são alguns exemplos de plantas com sementes recalcitrantes, que sob baixa temperatura e relativa umidade, sua viabilidade pode se manter por poucas semanas ou até por alguns meses, o que representa muito pouco em termos de conservação.

Ainda Vieira (2000) relata que todos os procedimentos de criopreservação têm uma etapa em comum, que é a de preparar a estrutura vegetal a ser conservada para a imersão em NL. É uma etapa de desidratação para evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula, o que é fatal. A desidratação pode ser induzida por cristalização do meio externo durante uma fase lenta de resfriamento até atingir -30 a -40 °C. Transferindo-se rapidamente o material vegetal para o NL, obtém-se a *vitrificação* da célula, isto é, os componentes celulares solidificam, formando *um vidro*, sem haver formação de gelo.

Henshaw et al. (1980) alertam que embora seja possível criopreservar várias partes da planta, os sistemas organizados como sementes e embriões são os mais adequados para a conservação de recursos genéticos.

A utilização do NL como um meio de armazenamento pressupõe que as sementes sobrevivam à exposição do NL sem sofrer danos à sua viabilidade.

Para Stanwood (1985) as sementes podem ser classificadas em três grupos de acordo com sua sensibilidade ao dessecação e sua tolerância ao NL: (a) sementes tolerantes ao dessecação e ao congelamento em NL, (b) sementes tolerantes ao dessecação, mas

sensíveis ao congelamento em NL e (c) sementes sensíveis ao dessecamento e ao congelamento em NL.

Cunha (1996) descreve que o teor de umidade da semente é, provavelmente, o mais crítico fator para o sucesso da criopreservação e se a umidade da semente é muito alta, observa-se a sua morte instantânea durante o processo de congelamento e, ou, descongelamento.

Existe um limite máximo de umidade para o congelamento (High Moisture Freezing Limit – HMFL), acima do qual a viabilidade da semente é reduzida durante o congelamento (Stanwood, 1985). Este limite crítico é normalmente uma faixa relativamente estreita de umidade dentro da espécie, mas pode variar entre espécies. O autor relaciona no quadro a seguir teores de umidade crítico que vai de 9,3 por cento para sementes de gergelim até 27,2 por cento para feijão (Quadro 1).

**Quadro 1.** Limite Máximo de Umidade para Congelamento (HMFL) de sementes de algumas espécies

Espécie	Germinação		
	HMFL	Umidade abaixo de HMFL	Umidade acima de HMFL
<i>Hordeum vulgare</i>	20,8	98	18
<i>Phaseolus vulgare</i>	27,2	99	84
<i>Brassica oleraceae</i>	13,8	90	0
<i>Cucumis sativus</i>	16,4	98	1
<i>Festuca sp</i>	23,0	98	2
<i>Allium cepa</i>	24,7	70	0
<i>Raphanus sativus</i>	16,8	99	4
<i>Sesamum indicum</i>	9,3	97	0
<i>Lycopersicon esculentum</i>	18,5	93	0
<i>Triticum aestivum</i>	26,8	96	25

FONTE: Stanwood, 1985

Ramos e Seijo (1999) verificaram aquisição de tolerância ao congelamento durante o desenvolvimento de sementes de ervilha (*Pisum sativum* L.) cv. Akabana no qual foi estudada em relação às alterações de crescimento, acumulação de matéria seca e conteúdo de água. Mediante o resfriamento na imersão em nitrogênio líquido dos tecidos das sementes

abaixo de um determinado conteúdo de água, vitrificaram-se e em consequência as sementes sobreviveram ao congelamento. No entanto, as sementes colhidas depois de 35 dias do florescimento não germinaram quando imersos no nitrogênio líquido, porém as colhidas depois de 50 dias do florescimento germinaram em 90%.

Pence (1991) verificando a viabilidade das sementes de 237 plantas em processo de extinção em Ohio (USA), observou que pelo menos 25% das espécies podem ser criopreservadas em nitrogênio líquido.

González-Benito et al. (1998) estudaram a viabilidade de sementes criopreservadas de algodão *Gossypium hirsutum* L. (CNPA 4M, CNPA 5M, CNPA Precoce 1, CNPA precoce 2 e Coker 312), como um método de conservação do patrimônio genético, na qual as sementes foram submetidas à dessecação e, ou, imersão em nitrogênio líquido. A germinação não foi afetada por nenhum dos tratamentos nas cultivares CNPA 4M, CNPA Precoce 1 e Coker 312 e a viabilidade das sementes das cultivares CNPA 5M e CNPA Precoce 2 foi reduzida quando estas sementes foram dessecadas e o teor de umidade baixou de 9,8 e 15,6% para 2,8 e 3%, respectivamente. Entretanto, a germinação das sementes dessecadas foi aumentada depois da imersão em nitrogênio líquido.

Almeida et al. (2000) estudaram o efeito da criopreservação sobre 10 espécies de leguminosas de interesse econômico para a Espanha e Brasil, tendo concluído que antes de se generalizar o uso da criopreservação em sementes de leguminosas, deve-se avaliar nas diferentes espécies e cultivares, o efeito de possíveis alterações anatômicas sobre a viabilidade e vigor das sementes e, que a criopreservação se apresentam como uma boa alternativa para a conservação das sementes de *Lathyrus cicera*, *L. sativus*, *Lens culinaris*, *Lupinus albus*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Vicia articulata*, *V. faba*, *V. monanthos* e *V. sativa*.

Medeiros e Cavallari (1992) relatam que Stanwood e Roos submetendo sementes de hortaliças e de flores à imersão em nitrogênio líquido por 7, 30 e 180 dias, verificaram que não ocorreu efeito prejudicial à germinação e ao vigor das sementes e apontaram o nitrogênio líquido como meio promissor à conservação de sementes a longo prazo.

Pesquisas realizadas por Chandel et al. (1995) revelaram que sementes recalcitrantes de chá (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze), Cacau (*Theobroma cacao* L.) e Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* larmk) apresentaram mudanças nas características

fisiológicas quando submetidos à dissecação e ao congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido.

Touchell e Dixon (1993) crioarmazenaram 90 espécies representando 84 gêneros e 33 famílias de espécies nativas da região ocidental da Austrália, na qual só mantiveram a germinação 68 espécies depois de duas semanas armazenadas em nitrogênio líquido.

Wiesner et al. (1994) observaram quebra de cotilédones em sementes de alfafa após serem submetidas ao armazenamento no vapor (-160 °C) e na imersão (-196 °C) no nitrogênio líquido por 24 horas, no entanto, a germinação não foi afetada.

Bhat et al. (1994) relatam que as sementes de *Musa balbisiana* (*Ofusa balbisiana*) com um conteúdo de umidade entre 13 e 18%, apresentaram condições para sobreviver em exposição ao nitrogênio líquido. Após o processo, cerca de 90% dos embriões germinaram originando as mudas. No entanto, o tegumento da semente foi a principal barreira, evitando a penetração de água e prevenindo a germinação de sementes inteiras.

A germinação de *Elettaria cordamomun maton* melhorou significativamente, depois de tratadas as sementes com ácido e lavadas em água; tendo as sementes com teores de umidade compreendido entre 7,7 e 14,3% germinadas cerca de 80% depois de um ano do armazenamento no vapor do nitrogênio líquido (Chaudhury e Chandel, 1995).

Iriondo et al. (1992) analisaram a influência da conservação em nitrogênio líquido em diversas espécies de plantas silvestres, com teores de umidade e tempo de exposições diferentes. Os resultados não indicaram diferenças significativas na maioria das espécies em relação ao percentual de germinação, seja nas amostras de sementes com teores de umidade diferentes, seja nas amostras de sementes com diferentes tempos de exposição ao nitrogênio líquido.

Touchell e Dixon (1994) armazenaram, em nitrogênio líquido, espécies de sementes nativas australianas, em que 40% se compunham de espécies raras ameaçadas de extinção no Oeste da Austrália e verificaram que, após a crioconservação, as propriedades físicas e químicas das sementes são preservadas. Eles avaliaram, também, as regras para os métodos *in vitro* de determinação da viabilidade/recuperação de espécies de sementes danificadas pelo nitrogênio e com dificuldades para germinação.

González-Benito et al. (1995) não observaram redução da germinação em sete cultivares de aipo (*Apium graveolens* L.) armazenadas em nitrogênio líquido, a crioconservação também foi aplicada em sementes sem casca de primeira qualidade.

Zewdie e Ellis (1991) crioarmazenaram sementes de tef (*Eragrostis tef* Zucc T.) e niger (*Guizotia abyssinica* L.) com o teor de umidade variando entre 4,4 a 14,6% e 2,7 a 14,0% respectivamente, por 693 dias, observaram um declínio na germinação das sementes crioconservadas com alto teor de umidade.

Para se fazer da crioconservação de sementes uma técnica rotineira em laboratório, deve-se avaliar a susceptibilidade dos danos que podem vir a causar as sementes quando exposta ao NL (Dussert et al., 2000; Lu et al., 2000; Normah et al., 2000; Quat Ng e Daniel, 2000; Niino e Murayama, 2000).

Todos estes trabalhos referenciados indicam que a crioconservação pode ser utilizada com sementes de inúmeras plantas cultivadas desde que seja observada e avaliada a influência de numerosos fatores antes da crioconservação: conteúdo de umidade das sementes, anatomia e as velocidades de congelamento e descongelamento (Stanwood e Bass, 1981; Vertucci, 1989; Engelmann, 2000; Almeida, 2000).

## 2.4. Cultivo *In vitro*

### 2.4.1. Assepsia das Sementes

O elevado grau de contaminação e a localização sistêmica de microorganismos são responsáveis, em alguns casos, pelo insucesso da implantação de cultura *in vitro*. A contaminação tem prejudicado inclusive a condução de experimentos em função do reduzido número de explantes obtidos. No entanto, a contaminação em laboratório de cultura de tecidos

é dependente da espécie de planta a ser trabalhada, das condições ambientais locais, do treinamento dos técnicos e das medidas de assepsias seguidas na rotina laboratoriais (Pasqual et al., 1997).

Por falta de literatura que descreva a metodologia de desinfestação de sementes usadas na obtenção de plantas matrizes, utiliza-se a metodologia usada para fazer a desinfestação dos explantes. Contudo vários compostos com ação germicida (Quadro 2) podem ser utilizados; os mais comuns são o etanol e os compostos à base de cloro como o hipoclorito de sódio (0,5 a 2,0%) e de cálcio. Algumas gotas de detergente são comumente adicionadas às soluções a base de cloro para melhorar o contato desta com os tecidos. Um espalhante adesivo é também utilizado, a exemplo do Tween 20 (1 a 2 gotas por 100 ml) o qual aumenta a penetração da solução no tecido. O uso de vácuo à solução aumenta a dilatação dos poros do propágulo, facilitando a penetração da solução desinfestante (Pasqual et al., 1997).

**Quadro 2.** Características de alguns desinfestantes

Desinfestação	Concentração (%)	Facilidade de remoção	Tempo (minutos)	Eficiência
Hipoclorito Ca	9 – 10	+++	5 – 30	Alta
Hipoclorito Na	0,5 – 2,0	+++	5 – 30	Alta
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 – 12	+++++	5 – 15	Boa
Br <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	1 – 2	+++	2 – 10	Alta
Nitrato Ag	1	+	5 – 30	Boa
HgCl <sub>2</sub>	1	+	2 – 30	satisfatória

FONTE: Pasqual et al., 1997.

Outros agentes usados incluem o cloreto de mercúrio, o ácido clorídrico, o cloreto de benzalcônio e o peróxido de hidrogênio (água oxigenada). Também são citados ácidos ou bases concentradas, o mertiolate, outros tipos de álcool como o isopropanol e algumas substâncias do grupo das bases quartenárias, como os triquartenários de amônio. No entanto, algumas gotas de detergente são comumente adicionadas às soluções a base de cloro para melhorar o contato desta com os tecidos. O Tween 20 é o mais utilizado em concentrações de 0,01 a 0,05% (v/v), porém, detergentes normais de cozinha são bons substitutos. Contudo, as concentrações das soluções desinfestantes assim como as



combinações dos princípios ativos desinfestantes e os tempos de exposição podem variar muito. Considerando a sensibilidade do tecido a ser desinfestado, manipula-se a concentração da solução e tempo de exposição de maneira inversamente proporcional. O etanol geralmente é utilizado a 70% e 80% (v/v), pois acima dessa concentração é menos eficiente e pode desidratar rapidamente os tecidos. Além da ação germicida, o etanol é surfactante, e, aplicado inicialmente, facilita a ação dos outros produtos.

Carvalho et al. (2000) avaliaram a capacidade de germinação *in vitro* de três variedades de *Ricinus communis* (BRS 149, BRS 188 e SIPEAL 28) após serem desinfestadas em duas concentrações de NaOCl (hipoclorito de sódio) a 2,0 e 2,5% de cloro ativo por um período de 5 e 10 minutos, no qual concluíram que o maior número de sementes de *Ricinus communis* germinadas *in vitro* foram às sementes que tiveram seu tegumento removido e esterilizadas numa solução de hipoclorito de sódio a 2,0% por um período de 10 minutos.

Batista (2000) analisando a assepsia de sementes de gergelim em cinco concentrações de hipoclorito de sódio (0; 10; 20; 30 e 40%) durante 10 minutos, concluiu que as melhores concentrações de hipoclorito de sódio para desinfestação das sementes de gergelim encontram-se variando entre 10 e 20%.

Carvalho (1996) desinfestou sementes deslintadas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em solução de água sanitária comercial (5% de hipoclorito de sódio) a 20%, adicionada com uma gota de Tween 20 por cada 100ml de solução, durante quinze minutos em um agitador magnético.

Salazar citado por Batista (2000) cultivou *in vitro* segmentos de plantas de gergelim (*Sesamum indicum* L.) variedades Inamar e Arawaca, proveniente 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 à solução desinfestante (0; 3; 5 e 10 min) 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 de exposição.

Sementes de *Vaccinium cylindraceum* foram desinfestadas superficialmente com sucesso numa solução de benomyl (Benlate) a 1% por 30 minutos, seguindo-se uma tripla lavagem com água destilada e esterilizada, uma agitação numa solução de água sanitária

comercial a 10% com algumas gotas de Tween 20 (Sigma) durante 10 minutos e finalmente uma lavagem com seis mudanças de água destilada esterilizada (Pereira, 1999).

Leifert et al. (1994) referem que a utilização de álcool como pré-tratamento de uma desinfecção com hipoclorito de sódio tem-se mostrado eficaz, por facilitar a penetração desinfectando o material vegetal.

Arellano et al. (1991) esterelizaram capítulos jovens de *Gerbera jamesonii* com álcool a 70% por dois minutos e solução de hipoclorito de sódio a 1,5% por vinte minutos.

Vianna et al. (1997) observaram que o uso de desinfestantes superficiais, como o álcool e hipoclorito de sódio, na descontaminação de explantes de mamoeiro, garantiram níveis aceitáveis de controle apenas para fungos, não para bactérias e que a rifampicina, por tratamento de imersão ou introdução em meio de cultura, controlou satisfatoriamente as contaminações de caráter endofítico, obtendo-se 7% de explantes sadios, sem sinais de fitotoxicidade.

#### 2.4.1. Indução a Calogênese

Calo é um aglomerado de células não organizadas, irregularmente diferenciadas, que se multiplicam desordenadamente e se desenvolvem a partir de tecidos vegetais, normalmente em respostas a injúrias químicas ou físicas (Pasqual et al., 1997).

Surge geralmente sobre lesão de órgãos e tecidos diferenciados, chama-se de indução de calos o início de sua formação. É possível a formação de calos em muitas espécies diferentes e posteriormente estes calos podem ser cultivados em meios diferentes, no qual chama-se de subcultivos de calo. Em condições excepcionais e às vezes de forma espontânea, pode-se produzir a regeneração de órgão adventício e ou embriões a partir de calos, em meio líquido, um calo pode formar massas celulares, ou células individuais, contudo é possível regenerar plantas completas inclusive a partir de células individuais (Pierik, 1990).

Este mesmo autor descreve que qualquer tipo de tecido de órgão (raiz, talo, folha, flor, etc.) pode ser utilizado como material inicial para a indução de calo. Se estes órgãos não servirem ou se precisa de um calo jovem, utilizam-se embriões (imaturos) ou fragmentos de plântulas. No entanto, para iniciar a formação de calos a partir de um explante, recomenda-se freqüentemente o fornecimento de reguladores exógenos. As exigências de reguladores exógenos (tipo de regulador, concentração, proporção auxina/citocinina), dependem em grande parte do genótipo e de seu conteúdo de hormônios endógenos.

O contínuo aprimoramento da técnica de cultivo de tecidos tem permitido a obtenção de calos radiculares de muitas espécies, tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas (Klein e Edsall, 1968; Kuneida e Kerbaury, 1986; Mathur, 1992).

Kerbaury (1999) cita que a exemplo das respostas morfogenéticas dos calos oriundos de órgãos da parte aérea, os calos radiculares apresentam, basicamente, o mesmo comportamento e expressão morfogenética diante do sinergismo auxina/citocinina.

Barrueto Cid (1998) descreve que em geral, calos friáveis são induzidos a partir de calos compactos, obtidos inicialmente em meio sólido, entretanto várias formulações minerais, tais como o MS, WH, LS e SH, acrescidas de substâncias reguladoras de crescimento, podem ser usadas na sua indução.

Athama e Reddy (1983) utilizaram na regeneração dos explantes (raiz, broto e folha) de *Ricinus communis* o meio MS suplementado com 2 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, 0,5 – 2,0 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, sendo subcultivado em meio MS suplementado somente com o 2,4-D; no entanto a obtenção de calos através de brotos foi maior (90 – 98%) seguida pela raiz (88 – 91%) e pela folha (73 – 83%).

Reddy et al. (1987) obtiveram calos em *Ricinus communis* a partir de segmentos do ápice do hipocótilo e de broto. Contudo, o fitohormônio CIN provou ser superior ao BAP na indução de brotos, enquanto o ANA foi superior ao AIA na emissão das raízes dos calos provenientes dos ápices dos brotos.

Matsumoto et al. (1991) obtiveram calos embriogênicos friáveis a partir de folhas imaturas de mandioca (*Manihot esculenta* Cranz) cultivadas em meio MS modificado e suplementado com altas concentrações de ácido 2,4 – diclorofenociacético (2,4-D). No entanto observaram que a indução dos embriões somáticos foi mais eficiente no meio de cultura suplementado com 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D + 1 mg.l<sup>-1</sup> ácido giberélico (GA3), após duas

semanas de pré-cultivo num meio com 10 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D. Ainda verificaram que o número dos embriões somáticos aumentou, ao ser suplementado com 1 mg.l<sup>-1</sup> de GA3 ao meio, o que sugere que o ácido giberélico tem uma importante função na indução e crescimento de embriões somáticos de mandioca.

Quoirim et al. (1998) utilizaram várias combinações de reguladores de crescimento na indução da organogênese indireta em tecidos jovens de hipocótilos e cotilédones de *Acacia mearnsii* cultivados *in vitro*, e observaram a formação de calos em vários meios, no entanto, gemas e raízes se desenvolveram na presença de diferentes combinações de CIN ou TDZ e ANA quando os calos permaneceram dois a três meses nos mesmos meios e as melhores taxas de regeneração de gemas foram obtidas a partir de cotilédones cultivados na presença de 2,33 a 9,30 µM de CIN ou 1,82 µM de TDZ e 2,69 µM de ANA.

As células do calo podem apresentar morfologia, tamanho, coloração e ploidia variada, dependendo da espécie, período de cultura e composição do meio nutritivo (Narayanaswany, 1977).

Bespalhok e Hattori (1997) obtiveram embriogênese somática em *Stevia rebaudiana* usando-se floretes cultivados em meio MS adicionado de 2,4-D (9,05 e 18,10 µM) e cinetina (0 a 9,29 µM). Quando a concentração de 2,4-D era 9,05 µM o melhor tratamento foi obtido em meio sem cinetina. Quando a concentração de 2,4-D era 18,10 µM o melhor tratamento foi obtido em meio adicionado de 2,32 µM de cinetina. Os calos embriogênicos começaram na base da corola e ovário.

Mendes e Goes (1996) revisando sobre meios de cultura descrevem que no início dos estudos de meios nutritivos para cultura de tecidos *in vitro* tinha por objetivo a identificação dos compostos essenciais para o cultivo de células e órgãos isolados das plantas. Por muito tempo, o meio de cultura, desenvolvido por White para o cultivo de raízes de tomate, foi muito utilizado. Com base no meio de White (1963) e por teste de suplementação com extrato de folha de fumo, Murashige e Skoog definiram em 1962 um meio básico, para cultura de tecidos vegetais (conhecido como meio MS em homenagem a eles). Gamborg, Miller e Ojima, trabalhando com suspensão de células de raízes de soja, definiram em 1968 o denominado meio básico B5. Atualmente, os meios básicos MS e B5, com algumas

adaptações, são os mais utilizados em laboratórios de cultura de tecidos para a maioria das espécies.

**Quadro 3.** Alguns meios recomendados e usados em cultura de tecidos vegetais

Componentes	B5(1) mg.l <sup>-1</sup>	H(2) Mg.l <sup>-1</sup>	LS(3) mg.l <sup>-1</sup>	MS(4) mg.l <sup>-1</sup>	White(5) mg.l <sup>-1</sup>	WPM(6) mg.l <sup>-1</sup>
<b>MACRONUTRIENTES</b>						
CaCl <sub>2</sub>	-	166	-	-	-	-
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	150	-	440	440	-	96
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	300	556
KCl	-	-	-	-	65	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	68	170	170	-	170
KNO <sub>3</sub>	2.500	950	1.900	1.900	80	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	990
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250	185	370	370	720	370
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	150	-	-	-	19	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	200	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	720	1.650	1.650	-	400
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	-	-	-	-	-
<b>MICRONUTRIENTES</b>						
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	-	0,025	0,025	-	-
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,001	0,25
Fe (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-	-	-	-	2,5	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	10	6,2	6,2	1,5	6,2
KI	0,75	-	0,85	0,83	0,75	-
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10	-	-	-	-	-
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	-	25	22,3	22,3	7	22,3
MoO <sub>3</sub>	-	-	-	-	0,0001	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,25	-	0,25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2	10	8,6	8,6	3	8,6
FeEDTA	-	-	-	-	-	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8	27,8	-	27,8
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,2	37,2	37,2	37,2	-	37,2
<b>ORGANICOS</b>						
Ácido fólico	-	0,5	-	-	-	2,0
Ácido indol acético	-	0,1	-	-	-	-
Ácido nicotínico	1,0	5,0	-	0,5	0,5	0,5
Biotina	-	0,05	-	-	-	-
Glicina	-	2,0	-	2,0	3,0	-
Mio-inositol	100	100	100	100	100	100
Piridoxina.HCl	1,0	0,5	-	0,5	0,1	0,5
Tiamina.HCl	10,0	0,5	0,4	0,5	0,1	1,0
Sacarose (g/l)	20	20	30	30	30	20

(1) Gambor et al., 1968; (2) Nitsch, 1969; (3) Imsmaier & Skoog, 1965; (4) Murashige & Skoog, 1962; (5) White, 1963; (6) Wood, 1982

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

1

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Indução a Calogênese

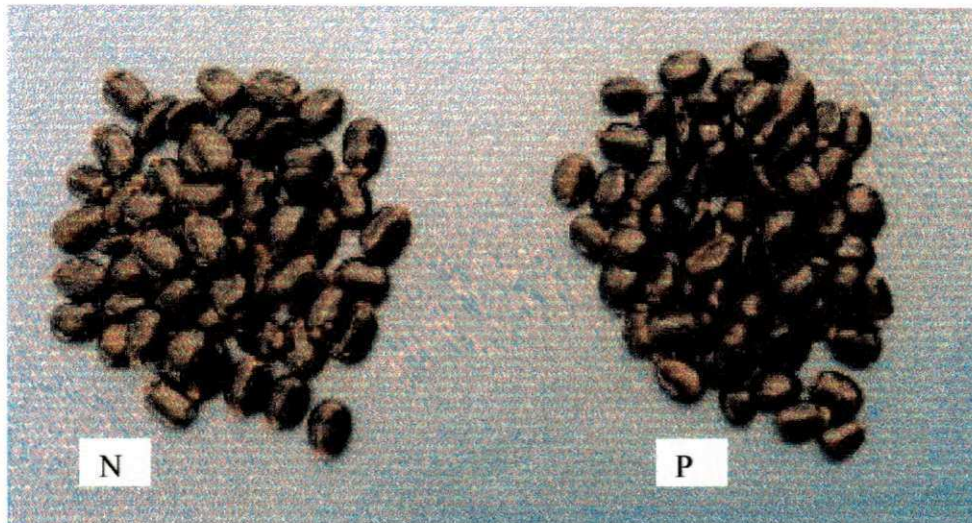
##### 3.1.1. Material Vegetal

No desenvolvimento do presente trabalho foram utilizadas as variedades: nordestina e pernambucana de mamona (*Ricinus communis*), procedentes de campos experimentais da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB.

Como material de partida de *Ricinus communis* foi empregado sementes colhidas no ano agrícola 1999/2000. Em laboratório as sementes foram limpas e selecionadas, ficando para o trabalho as que apresentavam germinação entre 70 e 90% (Fotografia 1).

A germinação das sementes foi feita, após a retirada do tegumento e sua esterilização, em recipiente de vidro contendo o meio básico de cultivo de Murashige e Skoog (1962). Os ditos recipientes foram mantidos em uma câmara de germinação, com termoperíodo de  $25 \pm 1$  °C e com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro.

A fonte de iluminação utilizada foi tubos fluorescentes de luz fria (General Electric), com uma intensidade de  $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , sendo que nos primeiros três dias de germinação as sementes foram mantidas no escuro. As plântulas obtidas foram utilizadas na produção dos explantes primários.



**Fotografia 1.** Variedades de *Ricinus communis*: nordestina (N) e pernambucana (P).

Para os ensaios de indução a calogênese das duas variedades de *Ricinus communis*, partiu-se de parte do hipocótilo (pedaços) seccionado de plântulas procedentes de sementes multiplicadas *in vitro* no Laboratório de Biotecnologia da Embrapa - Algodão, em Campina Grande, PB, após 10 dias do início da sua incubação. O meio de cultivo utilizado para este ensaio foi o de Murashige e Skoog (1962), modificado e suplementado com fitohormônios: auxina e citocinina.

### 3.2. Crioarmazenagem

Para o estudo da influência das condições da Crioarmazenagem em nitrogênio ( $-176\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) sobre a capacidade germinativa das duas variedades de semente de *Ricinus communis*, foi realizado ensaios de germinação e vigor, com as sementes contendo os seus tegumentos. Depois da determinação do Nível Crítico de Umidade para a Crioarmazenagem (NCUC), realizado no Setor de Criogenia do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Campus II, Campina



Grande, PB. Nestes ensaios estudou-se também o efeito da crioarmazenagem mediante a viabilidade das sementes acondicionadas em canister de alumínio e de PVC, durante 3, 30 e 60 dias. O congelamento e o descongelamento foram feitos em intervalos regulares de três horas para cada temperatura (+25, - 30, - 176 e - 196 °C).

### 3.3. Procedimento Geral do Cultivo *In vitro*

#### 3.3.1. Explantes Primários

Foram utilizadas partes do hipocótilo de plântulas obtidas depois do 10º dia da inoculação das sementes das duas variedades de *Ricinus communis* que germinaram *in vitro* (Fotografia 2).



**Fotografia 2.** Plântulas de *Ricinus communis* germinadas *in vitro*.

### 3.3.2. Assepsia do Material Vegetal

Para a assepsia do material vegetal das duas variedades de *Ricinus communis* estabeleceu-se a metodologia para desinfestação das sementes utilizando-se nos tratamentos duas concentrações de cloro ativo (2,0 e 2,5%), dois períodos de exposição às soluções (5 e 10 min) e dois métodos de quebra de dormência (sementes sem carúncula e sementes sem tegumento); elegendo-se a desinfestação em solução contendo 2,0% de cloro ativo, durante 10 minutos em sementes sem tegumento, conforme os procedimentos que se segue:

1. selecionou-se as sementes das duas variedades (nordestina e pernambucana) de *Ricinus communis* e cuidadosamente se removeu o tegumento destas sementes;

2. os lotes de sementes, sem tegumentos, foram envolvidos em atadura de gaze e esterilizados em uma solução composta por 80% de água sanitária e 20% de água destilada e desmineralizada (H<sub>2</sub>O), ou seja, foram esterilizados a 2% de cloro ativo, adicionada de um espalhante adesivo Tween 20 (Polyoxythylene-sorbitan monolaurate) na proporção de uma gota para cada 100 ml da solução, em um agitador-aquecedor durante 5 minutos;

3. posteriormente as sementes foram lavadas por três vezes consecutivas com água destilada e esterilizada, para eliminar possíveis resíduos do hipoclorito. Em seguida, na câmara de fluxo laminar onde as sementes foram lavadas, procedeu-se à semeadura, distribuindo-se as sementes nos respectivos meios.

### 3.3.3. Esterilização dos Instrumentos

Todo o material utilizado (Becker, erlenmeyers, frascos de vidro, placa de petri com papel de filtro, etc.) foram esterilizados em estufa a  $\pm 160$  °C por aproximadamente 3 horas.

Os instrumentos utilizados na extração e manipulação dos explantes (bisturis, pinças, etc.), dentro da câmara de fluxo laminar, foram submergidos em álcool (95%) e flambados antes de cada utilização.

#### 3.3.4. Recipientes de Cultivo

Utilizou-se nos ensaios de germinação recipientes de vidro medindo 5 cm de diâmetro e 9 cm de altura; igualmente na indução de calo, utilizou-se os mesmos recipientes, diferenciando apenas a altura do vidro que foi de 6 cm. Todos os recipientes cultivados receberam tampa transparente de polipropileno e foram selados com parafilme.

#### 3.3.5. Meios de Cultivo

O meio base utilizado em todos os ensaios de geminação foi o MS (Murashige e Skoog, 1962), amplamente utilizado em cultivo de espécies lenhosas, cuja composição encontra-se no Quadro 4.

No preparo das soluções concentradas, procedeu-se como se descreve a seguir:

1. pesagem dos diferentes compostos e dissolução em água destilada e desmineralizada com auxílio de um agitador-aquecedor adicionando-se água até o volume final;

2. para o preparo da fonte de ferro os compostos  $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  foram pesados e dissolvidos separadamente em água destilada e desmineralizada; aquecendo-se as soluções com o auxílio de um agitador-aquecedor. A estas se adicionou água até o volume final.

**Quadro 4.** Composição das soluções concentradas utilizadas na preparação do meio de cultivo MS

<b>Solução A (Macronutrientes):</b>	<b>mg.l<sup>-1</sup></b>
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16.500
$\text{KNO}_3$	19.000
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4.400
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.700
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.700
<b>Solução B (Micronutrientes):</b>	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.200
$\text{MnSO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16.900
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600
KI	830
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	25
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	25
<b>Solução C (Fonte de ferro):</b>	
$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.725
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.785
<b>Solução D (Vitaminas e outros suplementos orgânicos):</b>	
Mioinositol	10.000
Tiamina-HCl	10
Piridoxina-HCl	50
Ácido Nicotínico	50
Glicina	200

O meio MS foi preparado a partir das soluções contidas no Quadro 4, conforme procedimentos:

1. em um Becker de 1.000 ml de capacidade, foi adicionado um volume de aproximadamente sua metade com água destilada;
2. depois, adicionou-se a solução concentrada A, B, C e D juntamente com a fonte de carbono (Quadro 5);
3. levou-se a um agitador-aquecedor, para uma boa mistura dos componentes, e adicionou-se água destilada até o volume final desejado;

4. ajustou-se o pH entre os valores 5,7 – 5,8 usando soluções de NaOH e HCl (0,01N, 0,1N, e 1N) conforme o caso;

5. transferiu-se o meio para um erlenmeyers de 1.500 ml de capacidade e adicionou-se 5,5 mg.l<sup>-1</sup> de solidificante (Quadro 5);

6. posteriormente o erlenmeyers contendo o meio com o solidificante, era tampado com dupla folha de alumínio e levado ao autoclave por um tempo de 10 minutos a 120 °C e 1 Kgf.cm<sup>2</sup> para a dissolução do solidificante;

7. passados este tempo, o erlenmeyers foi retirado do autoclave e colocado em um agitador-aquecedor para homogeneização do meio; depois se distribuía 20 ml do mesmo por *frasco de vidro* que eram tampados com tampas de polipropileno, selados com parafilme para impedir a contaminação do meio por patógenos (anexo: Ficha 1)

**Quadro 5.** Quantidade de soluções concentradas, fonte de carbono e solidificante necessárias para preparação de 1 l do meio MS

<b>Soluções</b>	<b>mg.l<sup>-1</sup></b>
A	100
B	1
C	10
D	10
<b>Fonte de carbono</b>	
Sacarose	30
<b>Solidificante</b>	
Difco bacto ágar	5,5

Para os ensaios de indução da calogênese foram adicionados ao meio básico MS, descrito anteriormente, soluções concentradas de auxina e citocinina nas combinações apresentadas no Quadro 6.

### 3.3.6. Reguladores de Crescimento

Para os ensaios em que foram utilizados reguladores de crescimento (Quadro 6), adicionou-se nas diferentes combinações e concentrações segundo o ensaio, antes de adicionar água até o volume final desejado, os reguladores utilizados pertencem aos dois grupos:

- ✓ Auxina:  
ácido naftalenoacético (ANA)
- ✓ Citocininas:  
6 – benzilaminopurina (BAP)  
6 – furfurilaminopurina ou cinetina (CIN)  
6 – (y, y – dimetilalamino) purina ou isopenteniladenina (2iP).

**Quadro 6.** Combinações de auxina e citocinina adicionadas ao meio básico MS

Meios	Auxina	Citocininas		
	ANA(mg.l <sup>-1</sup> )	BAP(mg.l <sup>-1</sup> )	CIN(mg.l <sup>-1</sup> )	2iP(mg.l <sup>-1</sup> )
MS1	0,5	2,0		
MS2	1,0	2,0		
MS3	0,5	4,0		
MS4	1,0	4,0		
MS5	0,5		2,0	
MS6	1,0		2,0	
MS7	0,5		4,0	
MS8	1,0		4,0	
MS9	0,5			2,0
MS10	1,0			2,0
MS11	0,5			4,0
MS12	1,0			4,0

### 3.3.7. Preparação dos Reguladores de Crescimento

As soluções combinadas de auxina (ANA) e citocininas (BAP, CIN e 2iP), foram preparadas pesando-se as quantidades desejadas de cada uma e em seguida

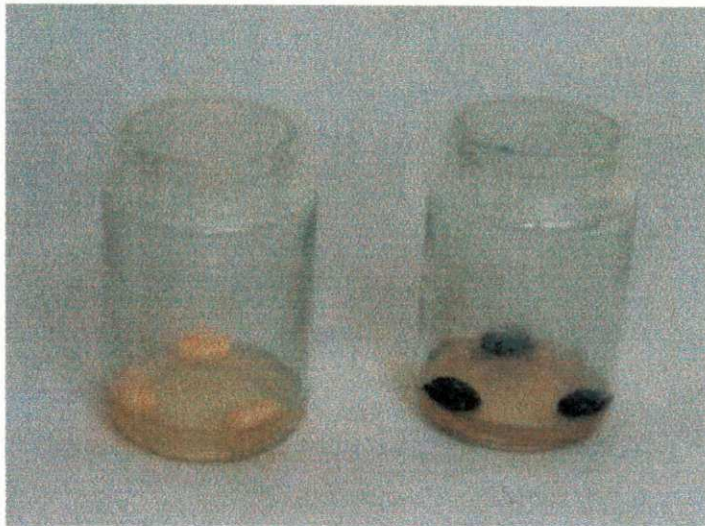
adicionado-se gotas de NaOH (Hidróxido de sódio) ou HCl (Ácido clorídrico) 1N, respectivamente, por se tratar a primeira de um ácido (ANA) e as demais (BAP, CIN e 2iP) de uma base. Depois eram levadas a uma agitador-aquecedor e aquecidos até completar a dissolução. Por último, adicionou-se água destilada e desmineralizada até o volume final desejado. Depois de sua preparação foram armazenadas a 4 °C até o momento do seu uso.

Na fase de obtenção dos explantes (germinação) foi utilizado o meio básico MS (Quadro 5) sem adição de fitohormônios.

Na fase de indução de calos foi utilizado o meio básico MS (Quadro 5) adicionando-se a auxina (ANA) e as citocininas (BAP, CIN e 2iP) referenciadas no item 3.3.5 nas quantidades apresentadas na Quadro 6. Nesta fase, cada tratamento foi composto por dez repetições com três explantes por recipiente. Posteriormente a distribuição dos explantes nos recipientes, os mesmos eram pesados e levados para a sala de crescimento, nas mesmas condições de luz e temperatura descrita anteriormente, durante um período de 28 dias.

### 3.3.8. Obtenção e Análise dos Dados

Na desinfestação das sementes os dados foram tomados no 14º dia da inoculação e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 2 x 2 x 2 (2 variedades x 2 métodos de quebra de dormência x 2 concentrações de cloro ativo x 2 período de descontaminação) com dez repetições contendo três sementes por frasco (Fotografia 3).



**Fotografia 3.** Sementes inoculadas em meio MS

Já na indução a calogênese o incremento de peso unitário dos calos foi calculado mediante a fórmula:

$$IPU = \frac{Pf - Pi}{Pi}$$

em que:

$IPU$  = incremento em peso unitário (grama);

$Pi$  = peso inicial: peso recipiente com explante – peso recipiente sem explante (grama);

$Pf$  = peso final: peso recipiente com explante desenvolvido – peso recipiente sem explante desenvolvido (grama).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 2 x 12 (2 variedades x 12 concentrações de fitohormônios), com dez repetições contendo três explantes por recipientes ao 28º dia da inoculação.

Contudo, tanto na desinfestação como na calogênese os dados obtidos foram submetidas à análise de variância pelo programa computacional ASSISTAT Versão 6.2 beta (1996) e as médias dos fatores qualitativos comparados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.



### 3.4. Procedimento Geral de Crioarmazenagem

#### 3.4.1. Obtenção do Nível Crítico de Umidade para Crioarmazenagem

Previamente aos ensaios foi estudado o Nível Crítico de Umidade para Crioarmazenagem (NCUC) que as sementes de cada variedade de *Ricinus communis* poderia suportar ao ser imersa em nitrogênio líquido e apresentar viabilidade, avaliada pela percentagem de germinação e vigor das sementes crioarmazenadas.

A obtenção da umidade inicial das duas variedades de *Ricinus communis* foi feita pelo método padrão da estufa, conforme recomenda as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992); calculando-se a porcentagem de umidade em base de peso úmido, mediante a fórmula seguinte:

$$\%U = \frac{P_i - P_f}{P_i - t} \times 100$$

em que:

$U$  = teor de umidade, em percentagem de base úmida (b.u.);

$P_i$  = peso inicial da subamostra (grama);

$P_f$  = peso final da subamostra (grama);

$t$  = tara do recipiente (grama).

Para a caracterização do material quanto ao teor da umidade, os lotes das duas variedades de *Ricinus Communis* eram submetidas aos processos de hidratação ou secagem até estas alcançarem os teores de umidades estabelecidos para a instalação dos diferentes ensaios de determinação do NCUC (4; 6; 8; 10 e 12%, b.u.). A perda ou ganho

de água pelas sementes foi determinado por meio da fórmula recomendada por Almeida et al. (1997).

$$Pf = Pi \times \frac{100 - Ui}{100 - Uf}$$

em que:

*Pf* = peso final da amostra (grama);

*Pi* = peso inicial da amostra (grama).

*Ui* = umidade inicial das sementes (% b.u.);

*Uf* = umidade desejada das sementes (% b.u.);

Para o umedecimento das sementes, três subamostra de 200 g de cada variedades de *Ricinus communis*, foram distribuídas entre seis folhas de papel toalha medindo cada uma 100 x 22 cm. Em seguida estas foram umedecidas com água destilada dentro de uma bandeja plástica até a sua saturação, deixando escorrer o excesso de umidade.

Posteriormente, formaram-se rolos os quais foram colocadas em germinador a uma temperatura constante de  $20 \pm 3$  °C e umidade relativa de  $95 \pm 2\%$ , onde permaneceram até alcançar as umidades de 8, 10 e 12% b.u., em seguida as sementes eram secas em papel toalha e pesadas em balança eletrônica com precisão de 0,01 g, depois armazenadas a  $4 \pm 1$  °C até alcançarem a umidade de equilíbrio.

Para a secagem das sementes, duas subamostra de 200 g de cada variedade de *Ricinus communis*, foram colocadas em estufa com circulação de ar e temperatura constante de  $33 \pm 2$  °C até atingirem as umidades desejadas (4 e 6% b.u.).

O tempo de permanência das sementes na estufa variou em função da umidade inicial dos lotes de sementes e da umidade pretendida para a criarmazenagem. Todos os demais procedimentos foram os adotados no processo de umedecimento.

Formado os lotes (200 g cada) das duas variedades de *Ricinus communis* com os teores de umidades de 4, 6, 8, 10 e 12% b.u. estabelecidas para os ensaios, estes eram acondicionados em tubos cilíndricos de alumínio (canister), os quais, com as sementes, eram resfriadas em câmara a  $-30$  °C,  $-176$  °C por um período de 3 horas para

depois serem imersos em nitrogênio líquido (NL a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), onde permaneceram por 3 dias.

Decorridos os 3 dias de crioarmazenamento, retirava-se os canister dos botijões criogênicos e submetia as sementes a um descongelamento gradativo ( $-196$ ;  $-170$ ;  $-30$  e  $\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), com intervalo de 3 horas para cada temperatura.

Em seguida foram feitos os testes de qualidade fisiológica das sementes (germinação e vigor) descritos no item 3.4.2.

Determinado o NCUC, foi separado um lote de 2.500 sementes das duas variedades de *Ricinus communis* e ajustado seu teor de umidade para 6% b. u., em seguida foram acondicionadas em tubos cilíndricos de PVC e de alumínio para posterior congelamento, sendo que um lote de sementes foi imerso no nitrogênio líquido (NL  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e o outro no vapor do nitrogênio (NL  $-176\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) durante 3, 30 e 60 dias de crioarmazenagem, depois deste período as sementes foram submetidas ao descongelamento e avaliada a sua qualidade fisiológica mediante teste de germinação e vigor.

#### 3.4.2. Teste Padrão de Germinação - TPG

O teste de germinação foi realizado obedecendo-se os procedimentos prescritos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992), exceto o número de sementes que foi de 200, em 8 repetições de 25 sementes (Fotografia 4).



**Fotografia 4.** Sementes de *Ricinus communis* germinadas em papel germitest

As sementes foram semeadas sobre papel toalha (germitest) em recipientes plástico de 12 x 12 x 14 cm, contendo duas folhas na base, umedecidas com água destilada, e em seguida, postas dentro de um germinador à temperatura alternada de 20 e 30 °C e umidade relativa do ar entre 90 e 95%.

Foram consideradas plântulas normais, aquelas que desenvolveram radícula e hipocótilo acima de 3 cm de comprimento, com leituras no 7º e 14º dia após a semeadura.

### 3.4.3. Testes de Vigor

Os testes de vigor foram realizados através da primeira contagem do teste padrão de germinação e do peso da matéria seca.

A primeira contagem de TPG foi feita de acordo com os procedimentos descritos em 3.4.2, conforme recomenda as Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992).

A determinação do peso seco das plântulas consideradas normais de cada repetição foi feita retirando-as do substrato e colocando-as em sacos de papel, que separadas por tratamento e repetições, eram postas para secar em estufa a  $80 \pm 3$  °C, durante 24 horas (Vieira et al.,1994). Depois deste período, estas eram retiradas da estufa e colocadas para resfriar em dessecador por 30 minutos e em seguida pesadas em balança eletrônica Mettler modelo PC 440, com precisão de 0,01 g (Fotografia 5).



**Fotografia 5.** Peso seco das plântulas consideradas normais: nordestina (N) e pernambucana (P)

#### 3.4.4. Análise dos Dados Estatísticos

Os dados analisados foram tomados no 7º e 14º dia depois da sementeira.

O delineamento estatístico utilizado, neste experimento, foi o inteiramente casualizado em um arranjo fatorial 2 x 3 x 2 x 2 (2 variedades x 3 períodos de criarmazenagem x 2 temperaturas de criarmazenagem x 2 tipos acondicionamento) com oito repetições de vinte e cinco sementes cada.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo programa computacional ASSISTAT Versão 6.2 beta (1996) e as médias dos fatores qualitativos comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Nível Crítico de Umidade para Crioarmazenagem (NCUC)

Pela a análise de variância, observou-se diferença estatística para as variáveis *variedade e umidade* e para a interação dessas variáveis com a matéria seca (Tabela 1). A não significação da interação *variedade versus umidade* para a germinação e sua primeira contagem, descreve que as variáveis atuam isoladamente, isto é, o comportamento de uma não interfere no desempenho da outra.

**Tabela 1.** Análise de variância da viabilidade das sementes de duas variedades de *Ricinus communis*, após a Crioarmazenagem em nitrogênio líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante três dias

Fonte de variação	Grau de liberdade	Germinação F	1ª contagem F	Mat. Seca F
Variedade (V)	1	33,33 **	33,33 **	576,07 **
Umidade (U)	5	1138,13 **	1138,13 **	406,55 **
V x U	5	0,53 ns	0,53 ns	10,13 **
Resíduo	36			
Total	47			

\*\* F significativo ao nível de 1 % de probabilidade  
ns F não significativo

A viabilidade das variedades nordestina e pernambucana de *Ricinus communis* depois da crioarmazenagem por três dias em nitrogênio líquido foi de 71,33 e 68,00% respectivamente com diferença estatística entre elas (Tabelas 2 e 3). No entanto, quando se compara o valor absoluto individuais dessas médias, constata-se que não há diferença marcante entre elas, o que se conclui que a diferença deva-se provavelmente ao patrimônio genético de cada variedade, não tendo em valores absolutos havido efeito da crioarmazenagem sobre a viabilidade das variedades estudadas (Tabela 16). Este comportamento foi observado em *Sesamum indicum* por Batista (2000) depois de submeter três variedades de sementes desta oleaginosa por um período de cinco dias a crioarmazenagem.

**Tabela 2.** Valores médios da viabilidade das sementes de duas variedades de *Ricinus communis*, após a crioarmazenagem em nitrogênio líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante três dias

Fatores	Germinação (%)	1ª contagem (%)	Mat. Seca (g)
Variedade			
nordestina	71,33 a	71,33 a	25,51 a
pernambucana	68,00 b	68,00 b	18,27 b
DMS	1,17	1,17	0,61
Teor de umidade(%)			
Testemunha	79,00 a	79,00 a	24,55 a
4	80,00 a	80,00 a	25,43 a
6	80,00 a	80,00 a	25,01 a
8	78,00 a	78,00 a	24,67 a
10	80,00 a	80,00 a	25,00 a
12	21,00 b	21,00 b	6,70 b
DMS	3,01	3,01	1,57

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade. Testemunha com 6% b.u.

Ainda nas Tabelas 2 e 3, pode-se constatar para os níveis de umidade em que as sementes foram crioarmazenadas por três dias com o objetivo de se conhecer o nível crítico de umidade acima do qual a semente perde sua viabilidade (NCUC), que este se encontra na faixa de 4 a 10 % b.u., visto que neste intervalo as médias dos fatores utilizados para determinar o



NCUC não diferiram do ponto de vista da estatística. Porém por se tratar de uma espécie rica em óleo, os teores menores de umidade (4 – 8%) devem ser os preferidos para a crioarmazenagem. Esta indicação encontra apoio em trabalhos desenvolvidos com *Sesamum indicum* por Batista (2000) e por Almeida et al. (2000) que trabalharam com 10 leguminosas crioarmazenadas com 6 – 7% de umidade. Em conjunto estes resultados indicam para esta faixa de umidade que a crioarmazenagem pode ser um método adequado para a preservação das sementes das variedades de *Ricinus communis* estudadas.

Estes resultados condizem com os que estão contidos na Tabela 3, onde o efeito da interação *variedade versus teor de umidade* deu-se apenas para a crioarmazenagem da semente com umidade de 12% b.u.

Na mesma Tabela tem-se para germinação e sua primeira contagem das sementes crioarmazenadas igualdade estatística para 12% de umidade b.u., frente à testemunha, mas com redução de 73,4% da sua germinação.

No que se refere à colheita destas sementes nas regiões produtoras do Nordeste do Brasil, sabe-se que as mesmas são colhidas com umidade em torno de 6% (Tabela 16) e pelo que foi discutido anteriormente, a faixa de umidade de 4 - 8% b.u. deve ser a preferida para a crioarmazenagem deste material.

Em concreto tem-se que o conteúdo de umidade das sementes é um dos principais fatores controlador da crioarmazenagem. Sementes de alface foram danificadas quando crioarmazenadas com mais de 18% de umidade em b.u. (Roos e Stanwood, 1981).

Igualmente se passou com a crioarmazenagem de sementes de *Sesamum indicum* com 12% de umidade (Stanwood, 1987). A uma taxa de congelamento de 200 °C.min<sup>-1</sup> a danificação das sementes de *Sesamum* se registra a conteúdo de umidade inferior a 6% b.u., o que leva a concluir que a taxa de esfriamento pode interagir com o conteúdo de umidade da semente afetando a sobrevivência da mesma. Este fato põe de manifesto a importância de se estabelecer o NCUC.

**Tabela 3.** Valores médios do desdobramento da interação *variedade versus teor de umidade* para a variável *viabilidade* das sementes de duas variedades de *Ricinus communis* crioarmazenadas por três dias

Germinação e sua 1ª contagem (%)							
Variedade	Teor de umidade (% b.u.)						média
	(Test.)	(4)	(6)	(8)	(10)	(12)	
Nordestina	80,00 aA	82,00 aA	82,00 aA	80,00 aA	82,00 aA	22,00 aB	71,33
pernambucana	78,00 aA	78,00 bA	78,00 bA	76,00 bA	78,00 bA	20,00 aB	68,00
Média	79,00	80,00	80,00	78,00	80,00	21,00	69,66
DMS/colunas = 2,87 (letras minúsculas)				DMS/linhas = 4,26 (letras maiúsculas)			
Matéria seca (g)							
Variedade	Teor de umidade (% b.u.)						média
	(Test.)	(4)	(6)	(8)	(10)	(12)	
Nordestina	28,60 aA	29,62 aA	29,00 aA	28,75 aA	29,20 aA	7,92 aB	25,51
pernambucana	20,50 bA	21,25 bA	21,02 bA	20,60 bA	20,80 bA	5,47 bB	18,27
Média	24,55	25,43	25,01	24,67	25,00	3,34	21,89
DMS/colunas = 1,50 (letras minúsculas)				DMS/linhas = 2,22 (letras maiúsculas)			

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Test. = testemunha (6% b.u.).

#### 4.2. Crioarmazenagem

A análise de variância (Tabela 4) revelou valores significativos de **F** para todas as variáveis, com exceção da variável *temperatura*, e que apenas as interações *variedade versus período e período versus acondicionamento* de segunda ordem não foram significativas estatisticamente.

**Tabela 4.** Análise de variância da viabilidade das sementes de duas variedades de *Ricinus communis*, com teor de umidade de 6% b.u., acondicionadas em canister de PVC e de alumínio e crioarmazenadas durante 3, 30, e 60 dias

Fonte de variação	Grau de liberdade	Germinação F	1ª contagem F	Mat. Seca F
Variedades (V)	1	98,00 **	98,00 **	2729,43 **
Período (P)	2	8,66 **	8,66 **	3,89 *
Temperatura (T)	1	0,22 ns	0,22 ns	0,00 ns
Acondicionamento (A)	1	80,22 **	80,22 **	43,24 **
V x P	2	0,66 ns	0,66 ns	0,46 ns
V x T	1	5,55 *	5,55 *	15,77 **
V x A	1	18,00 **	18,00 **	0,02 ns
P x T	2	13,55 **	13,55 **	13,26 **
P x A	2	0,22 ns	0,22 ns	2,55 ns
T x A	1	5,55 *	5,55 *	13,47 **
V x P x T	2	8,22 **	8,22 **	9,22 **
V x P x A	2	2,00 ns	2,00 ns	7,42 **
V x T x A	1	18,00 **	18,00 **	8,19 **
P x T x A	2	1,55 ns	1,55 ns	0,48 ns
V x P x T x A	2	0,66 ns	0,66 ns	0,42 ns
Resíduo	72			
Total	95			

\*\* F significativo ao nível de 1 % de probabilidade

\* F significativo ao nível de 5 % de probabilidade

ns F não significativo.

Nos ensaios de viabilidade das sementes crioarmazenadas por 3, 30 e 60 dias, revelado pelo teste de germinação, vigor dado pela primeira contagem da germinação e também pela determinação da matéria seca para as variáveis *variedade*, *período*, *temperatura* e *acondicionamento* (Tabela 5) e sua interação de segunda ordem (Tabelas de 6 a 9), tem-se um comportamento similar para todos os fatores da Tabela 5, onde se verifica que a variedade nordestina foi superior a pernambucana e que em comparação com os valores absolutos antes da crioarmazenagem, estes foram superiores em 3,0 e 1,5 pontos percentuais de viabilidade e 2,92 e 0,33 de matéria seca, respectivamente, para as variedades estudadas, na ordem apresentada.

Estes resultados devem-se provavelmente as mudanças de temperatura e a expansão do nitrogênio líquido durante o reaquecimento que originaram uma quebra de

dormência nestas sementes. A diferença entre variedades que se observa pode ser devido a sua composição química e, ou, a sensibilidade das sementes aos danos físicos, conforme observado por Almeida et al. (2000) e por Vertucci (1989) ao afirmarem que as sementes com maior conteúdo de óleo, parece ser mais susceptíveis a crioarmazenagem; se bem que segundo Iriando et al. (1992) não está claro a existência de uma correlação entre a sensibilidade das sementes com a crioarmazenagem e seu conteúdo de óleo. No entanto, Stanwood (1980) destaca que o efeito da crioarmazenagem pode variar entre cultivares da mesma espécie; destacando sua atuação em algumas sementes de leguminosas (Stanwood, 1985).

**Tabela 5.** Valores médios da crioarmazenagem sobre a viabilidade das sementes de duas variedades de *Ricinus communis*, com teor de umidade de 6% b.u., acondicionadas em canister de PVC e de alumínio, durante 3, 30 e 60 dias

Fatores	Germinação (%)	1ª cont. ger. (%)	Mat. Seca (g)
<b>Variedade</b>			
nordestina	81,00 a	81,00 a	29,32 a
pernambucana	77,50 b	77,50 b	20,63 b
DMS	0,70	0,70	0,33
<b>Período</b>			
3 dias	78,50 b	78,50 b	24,70 b
30 dias	80,25 a	80,25 a	25,27 a
60 dias	79,00 b	79,00 b	24,94 a b
DMS	1,03	1,03	0,48
<b>Temperatura</b>			
vapor de NL	79,16 a	79,16 a	24,98 a
imersão em NL	79,33 a	79,33 a	24,97 a
DMS	0,70	0,70	0,33
<b>Acondicionamento</b>			
canister de PVC	77,66 b	77,66 b	24,42 b
canister de Alumínio	80,83 a	80,83 a	25,52 a
DMS	0,70	0,70	0,33

As médias seguidas das mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5 % de probabilidade.

Dados da caracterização do material com 6 % b.u.:

- nordestina: germinação e primeira contagem da germinação = 78 %; matéria seca = 26,4g

- pernambucana: germinação e primeira contagem da germinação = 76 %; matéria seca = 20,3g.

Para o fator período de crioarmazenagem, verifica-se uma maior germinação aos 30 dias, retornando esta ao nível inicial aos 60 dias da crioarmazenagem. Sobre o tema, Batista (2000) obteve para duas variedades de *Sesamum indicum* maior porcentagem de germinação depois de 60 dias das sementes imersas em nitrogênio líquido, frente à germinação calculada aos 5 e 30 dias de crioarmazenagem. Almeida et al. (2000) também encontraram para algumas sementes de leguminosas, depois de sua imersão em nitrogênio líquido, respostas heterogêneas; no entanto, em 6 destas amostras a viabilidade foi menor.

Para estes autores nem o conteúdo de umidade, nem o tamanho das sementes, nem a velocidade de esfriamento ou de reaquecimento, parecem justificar as respostas observadas para a imersão em nitrogênio líquido das sementes avaliadas.

No presente estudo o fato deveu-se provavelmente a adaptação das sementes a crioarmazenagem, o que vem a concordar com Stanwood e Roos (1979) que obtiveram 91, 95 e 93 % de germinação para *Capsicum frutescens* depois de 7, 30 e 180 dias, respectivamente, após a crioarmazenagem.

A temperatura não exerce influência sobre a viabilidade e o acúmulo de matéria seca das duas variedades de *Ricinus communis* estudadas. Este comportamento se apresenta como uma vantagem deste material a crioarmazenagem, pois o nitrogênio líquido é volátil e pode alterar a temperatura interna dos botijões criobiológicos.

Para o fator acondicionamento, o canister de PVC apresentou-se inferior estatisticamente ao de alumínio, provavelmente devido à velocidade de congelamento admitida por estes materiais, sendo o canister de PVC dotado de uma menor condutividade térmica que o de alumínio deve ter provocado um maior choque térmico à semente, favorecendo a uma velocidade de emergência mediante a quebra de dormência (Tabela 5).

O estudo dos resultados da germinação, sua primeira contagem e a matéria seca deixa claros os efeitos imediatos da interação *variedade versus temperatura de crioarmazenagem* (Tabela 6), mostrando que a variedade pernambucana comportou-se de forma inferior quando submetida ao vapor do nitrogênio líquido (-176 °C) e que a viabilidade da variedade nordestina teve o mesmo comportamento tanto na crioarmazenagem a -176 °C, quanto à -196 °C. Porém o comportamento da matéria seca foi variável, tendo sido maior para

a variedade nordestina crioarmazenada no vapor do nitrogênio líquido (-176 °C) e a pernambucana imersa diretamente no nitrogênio líquido.

Resultados que em parte diferem dos obtidos por Diniz (1999) que trabalhou com *Zea mays* e constatou melhor viabilidade para a crioarmazenagem das sementes submetidas ao vapor do nitrogênio líquido (-176 °C).

**Tabela 6.** Valores médios do desdobramento da interação *variedade versus temperatura de crioarmazenagem* para a variável *viabilidade* das sementes com teor de umidade de 6% b.u., submetida a crioarmazenagem em dois tipos de acondicionamento por três períodos

<b>Germinação e sua 1ª contagem (%)</b>			
<b>Variedade</b>	<b>Temperatura de crioarmazenagem (°C)</b>		<b>média</b>
	<b>(-176)</b>	<b>(-196)</b>	
nordestina	81,33 aA	80,66 aA	80,99
pernambucana	77,00 bB	78,00 bA	77,50
média	79,16	79,33	79,24
DMS/colunas = 0,99 (letras minúsculas)		DMS/linhas = 0,99 (letras maiúsculas)	
<b>Matéria seca (g)</b>			
<b>Variedade</b>	<b>(Temperatura de crioarmazenagem (°C))</b>		<b>média</b>
	<b>(-176)</b>	<b>(-196)</b>	
nordestina	29,65 aA	28,98 aB	29,31
pernambucana	20,30 bB	20,95 bA	20,62
média	24,97	24,96	24,96
DMS/colunas = 0,46 (letras minúsculas)		DMS/linhas = 0,46 (letras maiúsculas)	

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

As médias estatisticamente significativas para a interação *variedades versus acondicionamento das sementes*, de acordo com a Tabela 7, confirmam discussão apresentada anteriormente da superioridade da variedade nordestina sobre a pernambucana com respeito a sua viabilidade revelada pela germinação, sua primeira contagem e a matéria seca. Entretanto, tem-se mediante esta Tabela que as sementes crioarmazenadas em canister de alumínio mantiveram uma maior média de viabilidade que as crioarmazenadas em canister de PVC, o que indica efeito do material usado para acondicionar as sementes sobre o comportamento da germinação e da matéria seca das variedades de mamona estudadas.

**Tabela 7.** Valores médios do desdobramento da interação *variedade versus acondicionamento das sementes* para a variável *viabilidade* das sementes com teor de umidade de 6% b.u., submetida a crioarmazenagem em dois tipos de acondicionamento por três períodos

Germinação e sua 1ª contagem (%)			
Variedade	Acondicionamento das sementes em canister		média
	(PVC)	(alumínio)	
nordestina	78,66 aB	83,33 aA	81,00
pernambucana	76,66 bB	78,33 bA	77,49
média	77,66	80,83	79,24
DMS/colunas = 0,99 (letras minúsculas)		DMS/linhas = 0,99 (letras maiúsculas)	
Matéria seca (g)			
Variedade	Acondicionamento das sementes em canister		média
	(PVC)	(alumínio)	
nordestina	28,78 aB	29,85 aA	29,31
pernambucana	20,07 bB	21,18 bA	20,62
média	24,42	25,51	24,96
DMS/colunas = 0,46 (letras minúsculas)		DMS/linhas = 0,46 (letras maiúsculas)	

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados da interação *período versus temperatura de crioarmazenagem* apresentados na Tabela 8 indicam que não houve efeito estatístico do tempo (período de crioarmazenagem) sobre a viabilidade das sementes no vapor do nitrogênio líquido (-176 °C) e que a imersão das sementes no nitrogênio líquido (-196 °C) apresentou comportamento de viabilidade diferente, tendo a viabilidade aos 30 dias sido superior a de 60 dias para a germinação e sua primeira contagem; no entanto, para a matéria seca, tem-se igualdade estatística do seu acúmulo para estes dois períodos (3 e 60 dias). Com relação às temperaturas da crioarmazenagem (-176 e -196 °C), as variedades tiveram o mesmo comportamento do ponto de vista da estatística, com diferença que confere superioridade para as sementes crioarmazenadas a -196 °C aos trinta dias frente às submetidas a -176 °C (vapor do nitrogênio); é de destaque que o comportamento das sementes crioarmazenadas no vapor do nitrogênio e diretamente no nitrogênio líquido é diferente ao longo dos três períodos, mas com igualdade matemática no terceiro período (60 dias).

**Tabela 8.** Valores médios do desdobramento da interação *período versus temperatura de crioarmazenagem* para a variável *viabilidade* das sementes com teor de umidade de 6% b.u., submetida a crioarmazenagem em dois tipos de acondicionamento por três períodos

Germinação e sua 1ª contagem (%)			
Período de crioarmazenagem (dias)	Temperatura de crioarmazenagem (°C)		média
	(-176)	(-196)	
(3)	79,50 aA	77,50 cB	78,50
(30)	79,00 aB	81,50 aA	80,25
(60)	79,00 aA	79,00 bA	79,00
média	79,17	79,33	79,25
DMS/colunas = 1,46 (letras minúsculas)		DMS/linhas = 1,22 (letras maiúsculas)	
Matéria seca (g)			
Período de crioarmazenagem (dias)	Temperatura de crioarmazenagem (°C)		média
	(-176)	(-196)	
(3)	25,19 aA	24,22 bB	24,70
(30)	24,71 aB	25,83 aA	25,27
(60)	25,02 aA	24,86 bA	24,94
média	24,97	24,97	24,97
DMS/colunas = 0,69 (letras minúsculas)		DMS/linhas = 0,57 (letras maiúsculas)	

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Mediante a exposição dos dados da interação *temperatura versus acondicionamento* (Tabela 9), verifica-se igualdade estatística para as temperaturas estudadas ao analisar a germinação das sementes e sua primeira contagem quando acondicionadas em canister de PVC. Com a matéria seca o comportamento foi diferente, as sementes acondicionadas em canister de PVC se comportaram com superioridade estatística quando crioarmazenadas no vapor do nitrogênio líquido (-176 °C) frente às imersas diretamente no nitrogênio líquido (-196 °C). Para o acondicionamento em canister de alumínio, a germinação, sua primeira contagem e a matéria seca tiveram o mesmo comportamento do ponto de vista estatístico com respeito às temperaturas estudadas, tendo a temperatura de -196 °C favorecido a viabilidade das sementes verificadas por esses fatores.



Observa-se, ainda, na referida Tabela, que entre os materiais utilizados no acondicionamento das sementes a superioridade do canister de alumínio em relação ao de PVC.

**Tabela 9.** Valores médios do desdobramento da interação *temperatura versus acondicionamento das sementes* para a variável *viabilidade* das sementes com teor de umidade de 6% b.u., submetida a crioarmazenagem em dois tipos de acondicionamento por três períodos

Germinação e sua 1ª contagem (%)			
Temperatura de crioarmazenagem (°C)	Acondicionamento das sementes em canister		média
	(PVC)	(Alumínio)	
(-176)	78,00 aB	80,33 bA	79,16
(-196)	77,33 aB	81,33 aA	79,33
média	77,66	80,83	79,24
DMS/colunas = 0,99 (letras minúsculas)		DMS/linhas = 0,99 (letras maiúsculas)	

Matéria seca (g)			
Temperatura de crioarmazenagem (°C)	Acondicionamento das sementes em canister		média
	(PVC)	(Alumínio)	
(-176)	24,73 aB	25,22 bA	24,97
(-196)	24,12 bB	25,82 aA	24,97
média	24,42	25,52	24,97
DMS/colunas = 0,46 (letras minúsculas)		DMS/linhas = 0,46 (letras maiúsculas)	

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.3. Cultivo *In vitro*

##### 4.3.1. Assepsia das Sementes

Através da análise de variância (Tabela 10) verifica-se diferença estatística para o fator *quebra de dormência* revelada pelas variáveis *plântulas sadias* e *sementes contaminadas* e que apenas a interação *quebra de dormência versus concentração de hipoclorito de sódio* para a variável *plântulas sadias* apresenta diferença estatística.

**Tabela 10.** Análise de variância de *plântulas sadias* e *sementes contaminadas* de duas variedades de *Ricinus communis*, tratadas com hipoclorito de sódio a 2,0 e 2,5% durante 5 e 10 minutos, utilizando com substrato o meio MS

Fonte de variação	Grau de liberdade	Plântulas sadias F	Sementes contaminadas F
Variedade (V)	1	2,07 ns	0,46 ns
Quebra de dormência (D)	1	26,24 **	9,72 **
Conc. de hipoclorito (C)	1	2,56 ns	0,90 ns
Período de desinfestação (P)	1	0,64 ns	0,29 ns
V x D	1	0,23 ns	0,07 ns
V x C	1	0,02 ns	0,07 ns
V x P	1	0,10 ns	0,01 ns
D x C	1	0,00 **	0,07 ns
D x P	1	0,02 ns	0,01 ns
C x P	1	0,23 ns	0,16 ns
V x D x C	1	0,02 ns	0,01 ns
V x D x P	1	0,10 ns	0,00 **
V x C x P	1	0,00 **	0,00 **
D x C x P	1	0,02 ns	0,00 **
V x D x C x P	1	0,00 **	0,01 ns
Resíduo	144		
Total	159		

\*\* F significativo ao nível de 1% de probabilidade  
ns F não significativo.

Segundo os resultados contidos na Tabela 11, pode-se apreciar que a porcentagem de *plântulas sadias* apresentou-se muito baixa e a de *sementes contaminadas* muito alta em todos os fatores estudados. Para o fator *quebra de dormência*, observa-se uma superioridade estatística de 26,67 pontos percentuais, revelado pela porcentagem de *plântulas sadias*, com as sementes cujos tegumentos foram removidos e, de 19,17 pontos percentuais

para as sementes sem carúncula, frente à geração de *sementes contaminadas*; tendo o incremento de *sementes contaminadas*, sem carúncula sido superior em 22,92 pontos percentuais ao de *plântulas sadias*. Comportamento contrário foi constatado com as sementes em que os tegumentos não foram removidos.

**Tabela 11.** Efeito dos tratamentos de assepsia em sementes de duas variedades de *Ricinus communis* na produção de plântulas em meio MS

Fatores	Plântulas sadias (%)	Sementes contaminadas (%)
<b>Variedades</b>		
nordestina	37,92 a	32,08 a
pernambucana	30,41 a	36,25 a
DMS	10,29	12,15
<b>Quebra de dormência</b>		
sem carúncula	20,83 b	43,75 a
sem tegumento	47,50 a	24,58 b
DMS	10,29	12,15
<b>Concentração de NaOCl (%)</b>		
2,0	38,33 a	31,25 a
2,5	30,00 a	37,08 a
DMS	10,29	12,15
<b>Período de desinfestação (min)</b>		
5	32,08 a	35,83 a
10	36,25 a	32,50 a
DMS	10,29	12,15

As médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Dados da caracterização do material com 6 % b.u.:

- nordestina: germinação e primeira contagem da germinação = 78 %; matéria seca = 26,4g

- pernambucana: germinação e primeira contagem da germinação = 76 %; matéria seca = 20,3g.

Os dados dos outros fatores tiveram o mesmo desenvolvimento do ponto de vista da estatística, indicando que tanto as concentrações do NaOCl quanto o tempo em que as sementes das duas variedades permaneceram embebidas em soluções a 2,0 e 2,5% deste produto, não exerceram influência na produção de plântulas sadias e sementes contaminadas.

Aprecia-se claramente que tanto as concentrações de NaOCl quanto os períodos de permanência das sementes nas duas concentrações, controla aproximadamente 50% a

geração de sementes não germinadas (contaminadas). Este resultado demonstra a necessidade de se continuar com o estudo desta técnica com o fim de se obter protocolos e tratamentos ótimos para a assepsia deste material, semeado em meio MS.

Com respeito à remoção do tegumento tem-se que este procedimento favorece a germinação das sementes *in vitro*, conduzindo a se concluir que o foco contaminante (patógenos) é o tegumento, onde os patógenos podem alojar-se tanto externamente quanto internamente, fato observado mediante a diminuição do número de sementes contaminadas e o aumento da porcentagem de plântulas sadias decorrentes da remoção do tegumento.

Comportamento similar foi também observado na interação *quebra de dormência versus concentração de NaOCl*, para a variável *plântulas sadias* representado na Tabelas 12.

**Tabela 12.** Valores médios do desdobramento da interação *quebra de dormência versus concentração de NaOCl* para a variável *plântulas sadias* de duas variedades de *Ricinus communis*, tratadas com hipoclorito de sódio a 2,0 e 2,5%, durante 5 e 10 minutos, utilizando como substrato meio MS

Quebra de dormência	Plântulas sadias (%)		média
	Concentração de NaOCl (%)		
	(2,0)	(2,5)	
sem carúncula	25,00 bA	16,67 bA	20,83
sem tegumento	51,67 aA	43,33 aA	47,50
média	38,33	30,00	34,16
DMS/colunas = 14,55 (letras minúsculas)		DMS/linhas = 14,55 (letras maiúsculas)	

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Verifica-se também a um aqueda acentuada na germinação ao comparar os dados da caracterização das sementes, em que as variedades nordestina e pernambucana obtiveram uma porcentagem de germinação em papel germitest em torno de 78 e 76%, respectivamente, com as sementes germinadas *in vitro* que só atingiram a porcentagem de germinação de 37,92% para nordestina e 30,41% para pernambucana (Tabela 11), levando a dedução que o tratamento com hipoclorito de sódio (NaOCl) e, ou substrato (meio MS) utilizado na germinação das sementes interfere no metabolismo das mesmas.

Carvalho et al. (2000) obtiveram um maior número de sementes germinadas *in vitro* com as variedades de mamona BRS 149, BRS 188 e SIPEAL, que tiveram seu tegumento retirado e que foram desinfestadas numa solução de hipoclorito de sódio a 2,0% por um período de 10 minutos.

#### 4.3.2. Indução a Calogênese

De acordo com a análise da variância, observou-se diferença estatística para *variedade*, *concentração de reguladores de crescimento* e sua interação *variedade versus concentração de fitohormônio* (Tabela 13).

**Tabela 13.** Análise de variância da indução de calos de duas variedades de *Ricinus communis*, cultivadas em meio MS suplementado com reguladores de crescimento

Fonte de variação	Grau de liberdade	F
Variedade (V)	1	169,39 **
Conc. Reg. Crescimento (C)	11	4,71 **
V x C	11	4,09 **
Resíduo	216	
Total	239	

\*\* F significativo ao nível de 1 % de probabilidade.

Provavelmente devido à característica de plasticidade organogenética do material juvenil, os explantes utilizados, segmentos do hipocótilo, mostrou satisfatória atividade em relação à indução de calo observado aos 28 dias do cultivo, com os tratamentos MS4, MS9, MS10 e MS11 apresentando um Incremento de Peso Unitário (IPU) superior a 10,6 gramas (Tabela 14).

**Tabela 14.** Valores médios da indução de calos no vigésimo oitavo dia da inoculação de duas variedades de *Ricinus communis*, cultivadas em meio MS suplementado com reguladores de crescimento

Fatores		IPU – Incremento de peso unitário (g)			
Variedade					
nordestina		11,65 a			
pernambucana		6,79 b			
DMS		0,73			
Conc. de reg. de crescimento (mg.Γ <sup>1</sup> )					
	ANA	CIN	BAP	2iP	
MS1	0,5	2,0			6,97 c
MS2	1,0	2,0			8,73 abc
MS3	0,5	4,0			8,40 abc
MS4	1,0	4,0			10,71 a
MS5	0,5		2,0		8,07 abc
MS6	1,0		2,0		9,35 abc
MS7	0,5		4,0		8,39 abc
MS8	1,0		4,0		7,49 bc
MS9	0,5			2,0	10,69 a
MS10	1,0			2,0	10,94 a
MS11	0,5			4,0	10,86 a
MS12	1,0			4,0	10,05 ab
DMS					3,02

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

ANA – ácido naftalenoacético

CIN – 6 – furfurilaminopurina ou cinetina

BAP – 6 – benzilaminopurina

2iP – Isopenteniladenina.

Comparando os resultados dos tratamentos acima referenciados, tem-se que os tratamentos MS10 e MS11, em valores absolutos, deram lugar a calos com máximo incremento de peso unitário. Não obstante, pode-se observar que, em geral, todas as melhores respostas sobre a indução de calos ocorreram com os meios de cultivos suplementados com ANA + 2iP, exceto o MS4 que foi suplementado com 1,0 mg.Γ<sup>1</sup> ANA + 4,0 mg.Γ<sup>1</sup> CIN, e ainda, a ocorrência de calos em todas as combinações ensaiadas no meio MS com 30 mg.Γ<sup>1</sup> de sacarose e 5,5 mg.Γ<sup>1</sup> de ágar (Fotografias 6 e 7).

Yeomon citado por Caldas et al. (1998) consideraram que o crescimento de calo em diferentes espécies pode ser: (1) independente de auxina e citocinina; (2) dependente de

auxina; (3) dependente de citocinina ou (4) dependente de ambas, auxina e citocinina. Assim, certos tecidos mostram uma dependência total da presença de reguladores exógenos no meio, enquanto outros sintetizam as quantidades que necessitam.

Comparando o resultado da primeira parte da Tabela 14, observa-se que a variedade nordestina (11,65g) produziu calos com maior peso que a variedade pernambucana (6,79g), sendo estatisticamente esta inferior aquela.

Considerando não somente a significação estatística, mas também o maior valor médio absoluto, tem-se para os meios constituídos de 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de ANA + 2,0 mg.l<sup>-1</sup> de 2iP (MS10) e 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de ANA + 4,0 mg.l<sup>-1</sup> de 2iP (MS11), um Incremento de Peso Unitário (IPU) de 10,94 e 10,86g, respectivamente, como os tratamentos de melhores resultados, e o menor incremento de peso unitário na combinação 0,5 mg.l<sup>-1</sup> de ANA + 2,0 mg.l<sup>-1</sup> de CIN, conforme se pode observar também com os resultados da interação da Tabela 15.

Resultados similares aos apresentados e discutidos foi registrado por Pescador et al. (2000) ao afirmarem que a característica de friabilidade é favorecida por uma alta relação auxina/citocinina, bem como pela adição de outros componentes ao meio nutritivo, e que o genótipo também tem a facilidade de formar massa celular (calos friáveis) cuja coloração pode variar do amarelo ao bege. O mesmo, ainda, relata que a liberação de células a partir de calos friáveis é mais rápida que os calos compactos, como também, as células podem apresentar morfologia, tamanho, coloração e ploidia variada, dependendo do período de cultivo e composição do meio nutritivo.

Barrueto Cid (1998) revisando sobre calos friáveis, relata ser provável que a característica de friabilidade é favorecida por uma alta relação auxina/citocinina, bem como pela adição de outros componentes ao meio nutritivo, como água de coco, uréia e prolina, e que o genótipo influi na facilidade de formar calos friáveis cuja coloração pode variar do amarelo ao bege.

A significação da interação dos fatores *variedades versus concentrações de reguladores de crescimento* sobre a indução de peso unitário de calo formado de *Ricinus communis* coloca-se de manifesto que as respostas frente a estes fatores são diferentes. Estes resultados evidenciam a complexidade do controle sobre respostas morfo genéticas,

aparentemente simples, como o desenvolvimento de calos e a dificuldade para realizar generalização sobre o efeito dos fatores que se consideram durante o cultivo *in vitro*.

A capacidade do explante para sobreviver, desenvolver e regenerar é uma consequência de uma ampla variedade de fatores como a origem dos cultivos, história dos explantes, estado físico dos mesmos, concentrações endógenas de reguladores e condições gerais de cultivo, por exemplo, sais minerais, carboidratos, luz, temperatura, etc. (Hu e Wang, 1986).

O comportamento do Incremento de Peso Unitário (IPU) do calo de explante das duas variedades de *Ricinus communis*, avaliado aos 28 dias de cultivo (Tabela 15), evidencia superioridade estatística de calos com maior média de peso (11,65g) para a variedade nordestina frente à pernambucana (6,79g).

Constatou-se, ainda, que os explantes da variedade nordestina cultivada nos meios MS9, MS10, MS11 e MS12, tiveram um desempenho superior ao dobro (média de 14,64g) do Incremento de Peso Unitário (IPU) na formação de calos friáveis quando comparado ao peso dos calos da variedade pernambucana (média de 6,63g) e com exceção dos meios MS5 e MS6, cujo comportamento foi igual do ponto de vista da estatística a variedade nordestina proporcionou um maior incremento de peso unitário em todos os demais meios de cultivo ensaiados. Merecendo destacar que em valores absolutos os calos da variedade nordestina foram de maior peso que os da pernambucana, excerto nos meios (MS5 e MS6) em que a estatística não encontrou diferença (Tabela 15 e Gráfico 1).

Ainda em relação à interação *variedades versus concentrações de reguladores de crescimento* (Tabela 15), observa-se flutuação na média do Incremento de Peso Unitário (IPU) promovido pelos meios de cultivo, tendo para cada bloco no balanço de reguladores de crescimento (auxina: ANA [0,5 – 1,0 mg.l<sup>-1</sup>] com citocinina: BAP, CIN e 2iP [2,0 – 4,0 mg.l<sup>-1</sup>]), proporcionando um incremento médio de peso unitário de calo quando se elevou a concentração da auxina ou da citocinina, por exemplo, os meios MS1, MS2 e MS3 frente ao MS4 excerto os meios MS7 e MS8 frente ao MS6 e MS11 e MS12 frente ao MS10.

Em resumo os dados da Tabela 15 confirma os resultados apresentados e discutidos anteriormente para a Tabela 14 e Gráficos 1 e 2, em que se evidencia uma



determinação das condições específicas dos meios de cultivo e o papel primordial dos reguladores de crescimento. Atualmente se reconhece que a maior parte da atividade fisiológica das plantas está medida pelos reguladores de crescimento, que atuam como substâncias mensageiras, a maioria das vezes em quantidades muito pequenas.

Para determinar as necessidades de auxinas e citocininas é importante saber que as citocininas promovem a formação de brotos, enquanto as auxinas são profundamente importantes para a formação de raízes. Frequentemente seus efeitos são antagônicos: uma substância inibe a ação da outra. Quando a proporção de auxina/citocinina é alta existem as diferenciações das células até a formação dos brotos, porém se a concentração de auxina e citocinina é alta, causa à formação de primórdios de raízes (Hustado e Merino, 1987).

As concentrações de reguladores mais apropriadas dependem de cada espécie, mas em geral as auxinas se utilizam em concentrações que varia de 0,01 a 10,0 mg.l<sup>-1</sup> e a citocinina de 0,01 a 30,0 mg.l<sup>-1</sup> (Pierik, 1990). No presente trabalho foram empregadas concentrações de reguladores de crescimento que variam entre 0,5 a 1,0 mg.l<sup>-1</sup> da auxina ANA e 2,0 a 4,0 mg.l<sup>-1</sup> das citocininas BAP, CIN e 2iP, em doze meios de indução a calogênese, empregando no caso o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), como o meio base.

**Tabela 15.** Valores médios no vigésimo oitavo dia da inoculação do desdobramento da interação *variedade versus concentração de reguladores de crescimento*, para a variável incremento de peso unitário (IPU)

Var	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6	MS7	MS8	MS9	MS10	MS11	MS12	média
Nor	9,47aCD	10,29aCD	10,91aBCD	12,59aBCD	8,79aD	9,86aCD	10,04aCD	9,36aCD	14,96aAB	15,31aA	14,70aAB	13,59aABC	11,65
Per	4,46bB	7,16bAB	5,89bAB	8,83bA	7,34aAB	8,85aA	6,75bAB	5,61bAB	6,43bAB	6,58bAB	7,01bAB	6,52bAB	6,79
Média	6,96	8,72	8,40	10,71	8,06	9,35	8,39	7,48	10,69	10,94	10,85	10,05	9,22
DMS/colunas = 2,55 (letras minúsculas)							DMS/linhas = 4,28 (letras maiúsculas)						

As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

ANA – ácido naftalenoacético

CIN – 6 – furfurilaminopurina ou cinetina

BAP – 6 – benzilaminopurina

2iP – Isopenteniladenina.

• Balanço de reguladores de crescimento ( $\text{mg.l}^{-1}$ ):

• Bloco I:

MS1 = ANA (0,5) + CIN (2,0)

MS2 = ANA (1,0) + CIN (2,0)

MS3 = ANA (0,5) + CIN (4,0)

MS4 = ANA (1,0) + CIN (4,0)

• Bloco II:

MS5 = ANA (0,5) + BAP (2,0)

MS6 = ANA (1,0) + BAP (2,0)

MS7 = ANA (0,5) + BAP (4,0)

MS8 = ANA (1,0) + BAP (4,0)

• Bloco III:

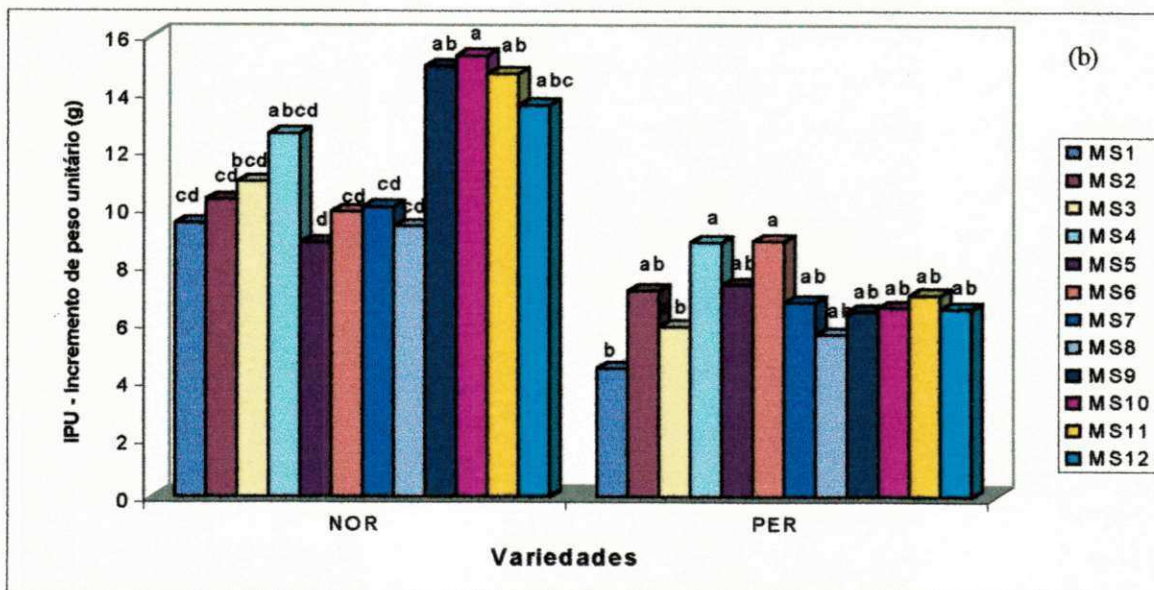
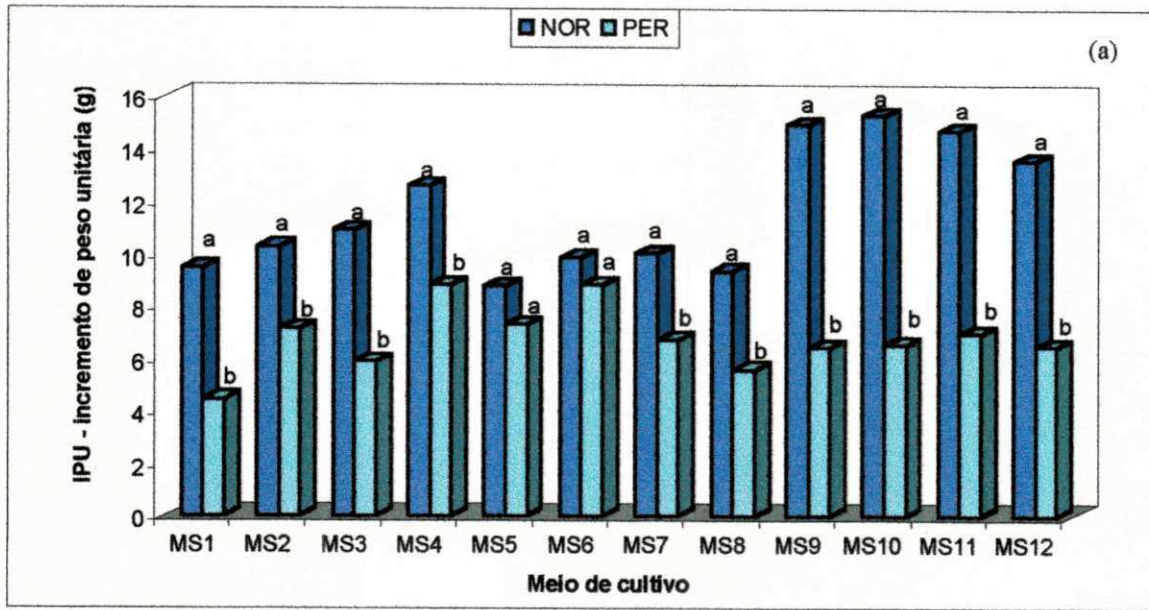
MS9 = ANA (0,5) + 2iP (2,0)

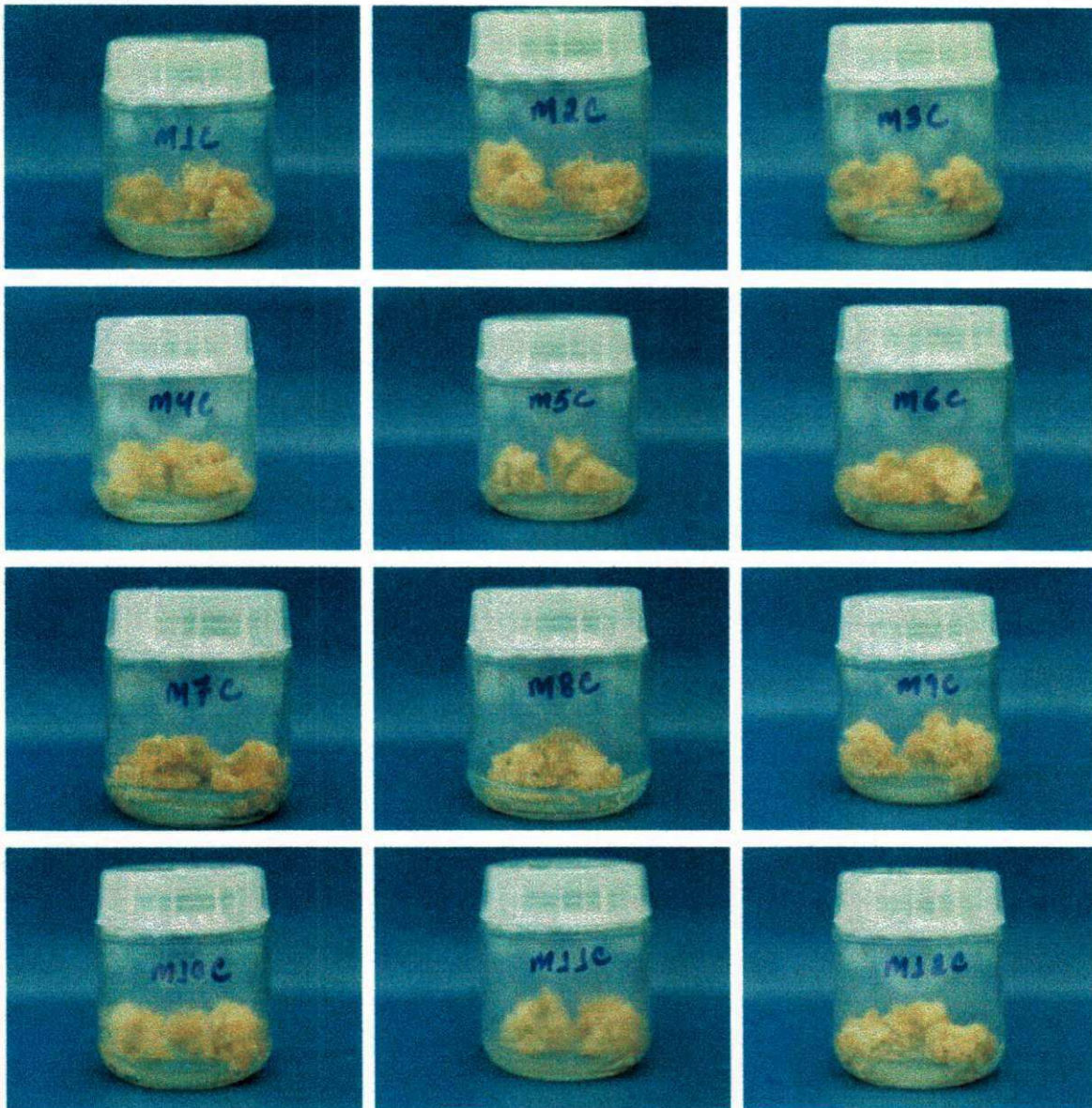
MS10 = ANA (1,0) + 2iP (2,0)

MS11 = ANA (0,5) + 2iP (4,0)

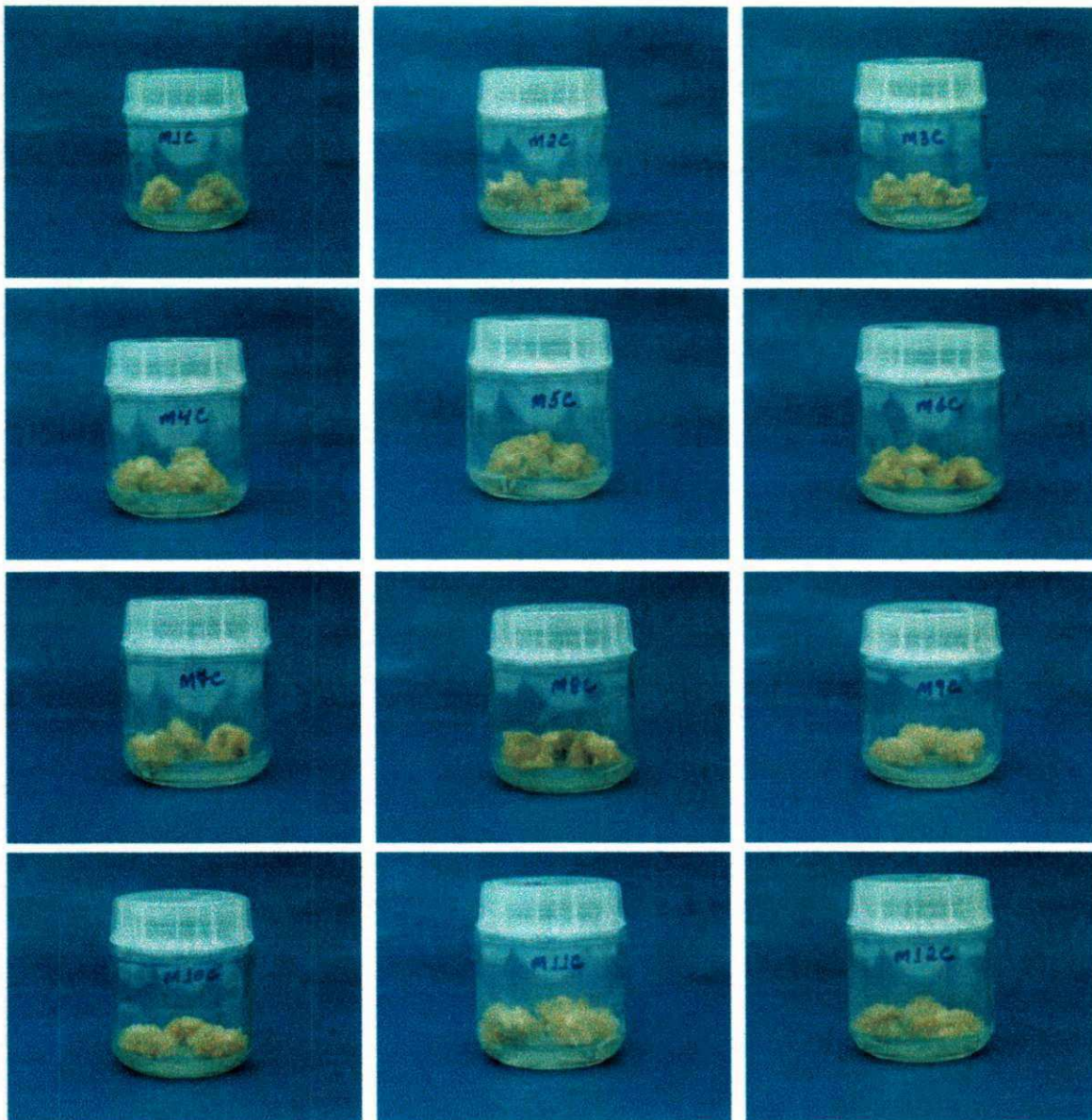
MS12 = ANA (1,0) + 2iP (4,0)

**Gráfico 1.** Efeito da adição de reguladores de crescimento para a interação variedades versus concentração de reguladores de crescimento ao meio MS sobre o incremento de peso unitário (IPU) duas variedades de *Ricinus communis*, em cada meio (a) e do efeito dos meios sobre as variedades (b) depois do vigésimo oitavo dia da inoculação





**Fotografia 6.** Calos friáveis, induzidos a partir de explantes do hipocótilo da variedade nordestina em meio MS suplementado com reguladores de crescimento.



**Fotografia 7.** Calos friáveis, induzidos a partir de explantes do hipocótilo da variedade pernambucana em meio MS suplementado com reguladores de crescimento.

## **5. CONCLUSÕES**

## 5. CONCLUSÕES

✓ O nível crítico de umidade para a crioarmazenagem (NCUC) de sementes de duas variedades de *Ricinus communis* (nordestina e pernambucana) encontra-se entre 4 e 10% base úmida;

✓ As sementes de *Ricinus communis* estudadas podem ser crioarmazenadas com a umidade de colheita que gira em torno de 6% b.u. nas regiões produtoras do Nordeste do Brasil;

✓ As sementes das variedades de *Ricinus communis* estudadas obtiveram uma melhor performance na sua qualidade fisiológica aos trinta dias de sua crioarmazenagem;

✓ As sementes das duas variedades de *Ricinus communis* estudadas podem ser crioarmazenadas tanto no vapor (-176°C) como na imersão (-196°C) em nitrogênio líquido;

✓ O canister de alumínio utilizado para acondicionar as sementes mostrou-se superior ao canister de PVC, quando imerso em nitrogênio líquido;

✓ A melhor metodologia para a desinfestação de sementes das duas variedades de *Ricinus communis* estudadas é a que utiliza sementes sem tegumento esterilizadas em solução com 2,0% de cloro ativo durante 10 minutos;

✓ Todos os tratamentos utilizados produziram calos friáveis nas duas variedades de *Ricinus communis* estudadas;

✓ O meio de cultura suplementado com 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de ANA com 2,0 mg.l<sup>-1</sup> de 2iP (MS10) para a variedade nordestina e o meio suplementado com 1,0 mg.l<sup>-1</sup> de ANA

---

com  $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$  de BAP (MS6) para a variedade pernambucana apresentaram um maior incremento de peso unitário em calos friáveis frente aos demais meios estudados.



**6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; TAKAYAMA, S. Automation in plant tissue culture – general introduction and overview. In: AITKEN-CHRISTIE, J.; KOZAI, T.; TAKAYAMA, S. (ed.). **Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1995. p. 1 – 18.

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

ALMEIDA, F. de A.C.; FONSECA, K.S.; GOUVEIA, J.P.G. de. Influência da embalagem e do local de armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de gergelim. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 3, n. 2, p. 195 – 201, 1999.

ALMEIDA, F. de A.C.; PITA VILLAMIL, J.M.; GOUVEIA, J.P.G. de. Efeito de la crioconservacion sobre la germinacion de semillas de leguminosas. **Revista Brasileira de Produtos Agróindustriais**, Campina Grande, v. 2, n. 1, p. 67 – 71, 2000.

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

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE MAMONA (ANIMA). Subprejeto fomento a lavoura de mamona. Salvador, 1991. 182p. ✕

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

ATHMA, P.; REDDY, T.P. Efficiency of callus initiation and direct regeneration from different explants of castor (*Ricinus communis* L.). **Current Science**, Bangalore - India, v. 52, n. 6, p. 265 - 257, 1983.

AZEVEDO, D.M.P. de.; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTÃO, N.E. de M.; SOARES, J.J.; VIEIRA, R.M.; MOREIRA, J. de A.N. **Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Nordeste do Brasil**. Campina Grande: Embrapa – CNPA, 1997. 52p. (Embrapa – CNPA. Circular Técnica, 25).

AZEVEDO, D.M.P. de.; BELTÃO, N.E. de M.; BATISTA, F.A.S.; LIMA, E.F. **Arranjo de fileiras no consórcio mamona/milho** Campina Grande: Embrapa – CNPA, 1997. 52p. (Embrapa – CNPA. Circular Técnica, 25).

BATISTA, R.C. **Cultivo *in vitro* e criopreservação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**. Campina Grande: DEAg/CCT/UFPB, 2000, 83p. (Dissertação de mestrado).

BARRUETO CID, L.P. Suspensão celular In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa – CNPH, 1998. v. 1, p. 330 – 353.

BESPALHOK, J.C.; HATTORI, K. Embryogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* (BERT.) Bertoni floret explants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 9, n.3, p. 185 – 188, 1997.

BHAT, S.R.; BHAT, K.H.; CHANDEL, K.P.S. Studies on germination and cryopreservation of *Musa balbisiana* seed. **Seed Science and Technology**, Zurich - Suíça, v. 22, n. 3, p. 633 – 640, 1994.

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

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa – CNPH, v. 1, p. 86 – 132, 1998.

CARVALHO, J.M.F.C. **Aplicacion de las técnicas de cultivo *in vitro* em la multiplicaciones y mejora del algodón**. Madrid: Universidade Politecnica de Madrid, 1996. 194p. (Tese, Doutorado em Engenharia Agrícola).

CARVALHO, J.M.F.C.; MORAES, A.M.; ANDRADE, W.F. de.; NOBREGA, M.B. de M.; SANTOS, J.W. dos. **Melhoria da germinação das sementes de mamoneia (*Ricinus communis* L.) *in vitro*, através da quebra de dormência e desinfestação**. Campina Grande: Embrapa - CNPA, 2000. 7p. (Embrapa – CNPA. Comunicado Técnico).

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

CHANDEL, K.P.S.; CHANDHURY, R.; RADHAMANI, J.; MALIK, S.K. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seed of tea, cocoa and jackfruit. **Annals of botany**, England, v. 76, n. 5, p. 443 – 450, 1995.

CHAUDHURY, R.; CHANDEL, K.P.S. Studies on germinação and cryopreservation of Cardamom (*Elettoria cardamomum maton*) seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich - Suíça, v. 23, n. 1, p. 235 – 240, 1995.

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

CUNHA, R. da. Cultura de tecidos na conservação de germoplasma vegetal. In: PUIGNAU, J.P. Ed. **Conservacion de germoplasma vegetal**. Monte Video: IICA, 1996. p. 129 – 138. (IICA – PROCISUR, Dialogo, 45)

DINIZ, P.S.C. **Qualidade fisiológica das sementes de milho (*Zea mays* L.) submetidas a diferentes técnicas de criopreservação**. Campina Grande: DEAg/CCT/UFPB. 1999, 80p. (Dissertação de Mestrado).

DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F; ANTHONY, F.; HOMON, S. Cryopreservation of coffe (*Coffea arabica*) seeds: toward a simplified protocol for routine in coffee genebanks. In: **Cryopreservation of tropical plant germoplasm**. International Plant Genetic Resources Institute. Itália, 2000, p. 161 – 166. (JIRCAS International Agriculture Serie N. 8).

ENGELMANN, F. Inportance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: ENGELMANN, F. (ed.). **Cryopreservation of tropical plant germoplasm**. Italia: International Plant Genetic Resouces Institute, 2000, p. 8 – 20.

GAMBOR, O.L.; MILLER, R.A.; OJIMA, K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, New York, n. 50, p 151 – 158, 1968.

GONZÁLEZ-ARNAO, M.T. Aplicación de la biotecnología para preservar recursos fitogenéticos. In: WORKSHOP DE BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS - das potencialidades à realidade, 4., 2000, Évora. **Resumos...** Universidade de Évora, 2000, p.9.

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

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

HENSHAW, G.G.; STAMP, J.A. & WESTCOTT, J.J. In: SALA, F.; PARISI, B.; CELLA, R.; CIFERRI, O. (ed.). **Tissue cultures and germplasm storage Plant Cell Cultures: results and perspectives..** Amsterdam - Holanda, 1980, p. 277 – 282.

HU, C.Y.; WANG, P. Embryo culture: technique and applications. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.A.; AMIRATO, P.V., (ed.). **Handbook of plant cell culture**. New York: Macmillan, 1986, v. 4, p. 43 – 96.

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

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION – ISTA. **Handbook of Vigour Test Methods**, Zurich – Switzerland: ISTA, 1981. 72p.

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

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

KERBAURY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (ed.). **Cultura de tecidos e**

**transformação genética de plantas.** Brasília: Embrapa – SPI/Embrapa – CNPH, 1999, v. 2, p. 519 – 531.

KLEIN, R.M.; EDSALL, P.C. Cultivation of callus monocot roots. **Phytomorphology**, New Delhi – Índia, v. 18, p. 204 – 206, 1968.

KUNEIDA, M.K.; KERBAURY, G.B. Formação de gemas em raízes adventícias de couve-flor cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 9, p. 231 – 238, 1986.

LEIFERT, C.; MORRIS, E.; WAITES, W.M. Ecology of microbial saprophytes and pathogenes in tissue culture and field-grown plants: seasons for contamination *problems in vitro*. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, Florida, v. 2, n. 13, p. 139 – 183, 1994.

LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA. Rio de Janeiro: IBGE/CPAGRO, p. 19 set. 1975.

LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA. Rio de Janeiro: IBGE/CPAGRO, p. 74 mar. 2001.

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

LINSMAIER, E.M.; SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiology Plant.**, 18: 100 – 127, 1965.

LU, Tie-Grang.; JIAN, Hing-Cheng.; SUN, Ching-San. Current status of cryopreservation in China. In: **Cryopreservation of tropical plant germoplasm**. Itália: International Plant Genetic Resources Institute, 2000, p. 310 - 314. (JIRCAS International Agriculture Serie N. 8).

MATHUR, J. *In vitro* morphogenesis in *Nardostachys jatamansi* D.C.: shoot regeneration from callus derived roots. **Annals of Botany**, London, v. 70, p. 419 – 422, 1992.

MATSUMOTO, K.; CABRAL, G.B.; TEIXEIRA, J.B.; RECH, E.L. Embriogênese somática a partir de folhas imaturas de mandioca *in vitro*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 3, n. 2, p. 107 – 110, 1991.

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

MENDES, R.A.; GOES, M. Cultura de tecidos na conservação de germoplasma vegetal. In: PUIGNAU, J.P. Ed. **Conservacion de germoplasma vegetal**. Monte Video: IICA, 1996. p. 129 – 138. (IICA – PROCISUR, Dialogo, 45)

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

NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Plant cell, tissue and organ culture**. Berlin: Springer – Verlag. 1977, p. 185.

NIINO, T.; SEGUEL, I.; MURAYAMA, T. Cryopreservation of vegetatively propagated species (mainly mulberry). In: Cryopreservation of tropical plant germoplasm. **International Plant Genetic Resources Institute**. Itália, 2000, p. 194 – 199. (JIRCAS International Agriculture Serie N. 8).

NORMAH, M.N.; MAINAH, G.; SAVASWATHY, R. Cryopreservation of zygotic embryos of tropical fruit trees a study on *Lansium domesticum* and *Baecaurea* species. In: **Cryopreservation of tropical plant germoplasm**. Itália: International Plant Genetic Resources Institute, 2000, p. 156 – 158. (JIRCAS International Agriculture Serie N. 8).



PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J.D. **Cultura de Tecidos Tecnologia e Aplicações**. 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. **Seed Science and Technology**, Zurich – Suíça, v. 19, n. 2, p. 235 – 251, 1991.

PEREIRA, M.J.B.T. Plantas de *Vaccinium cylindraceum* Smith produzidas *in vitro*. In: \_\_\_\_\_. **Contribuição para o estudo e conservação de *Vaccinium cylindraceum* Smith uma espécie endêmica da flora Açoriana**. Ponta Delgado – Portugal: Universidade dos Açores, Departamento de Biologia. 1999. Cap. 6, p. 70 – 109. (Tese de Doutorado).

PESCADOR, R.; ARAÚJO, P.S.; MAAS, C.H. Protocolos para obtenção de Safrol. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 15, p. 18 – 23, 2000.

PIERIK, R.M.; EDSALL, P.C. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores**. Madrid: Mundi Prensa, 1990, 326p.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenamento de grãos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 2000, 666p.

QUAT Ng, N.; DANIEL, I.O. Storage of pollens for long-term conservation of yam genetic resources. In: **Cryopreservation of tropical plant germoplasm**. Itália: International Plant Genetic Resources Institute, 2000, p. 136 – 139. (JIRCAS International Agriculture Serie N. 8).

QUOIRIN, M.; BITTENCOURT, J.M.; ZANETTE, F. OLIVEIRA, D.E. de. Effect of growth regulators on indirect organogenesis of *Acacia mearnsii* tissues cultured *in vitro*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Londrina, v. 10, n. 2, p. 101 – 105, 1998.

RAMOS, A.L.; SEIJO, G. Freezing tolerance acquisition during seed development of *Pisum sativum* L. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, n. 1, p. 1 – 5, 1999.

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

ROBERTS, E.H. Problems of long – term storage of seed and pollen for genetic resources conservation. In: FRANKEL, O.H.; HAWKES J.G. (ed.). **Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow**. Cambridge, 1973. p. 269 – 295.

ROOS, E.E.; STANWOOD, P.C. Effects of low temperature, cooling rate and moisture content on seed germination of lettuce. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Maunt Vernon, n. 106, p. 30 – 34, 1981.

ROOS, E.E. Precepts of successful seed storage. In: McDONALD. Jr., M.B.; NELSON, C.J. (ed.). **Physiology of seed deterioration**. Madison: CSSA, 1986. p. 1 – 25 (CSSA Special Publication, 11).

SILVA, F. de A. S. e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. **Anais...** Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996. p. 294 – 298.

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

STANWOOD, P.C.; ROOS, E.E. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). **Hortscience**, Alexandria, 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**, USA, v. 5, n. 1, p. 26 – 31, 1980.

STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, Zurich – Suíça, n. 9, p. 423 – 437, 1981.

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

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

TOUCHELL, D.H.; DIXON, K.W. Cryopreservation of seed of Western Australian native species. **Biodiversity and Conservation**, London - Inglaterra, v. 2, n. 6, p. 594 – 602, 1993.

TOUCHELL, D.H.; DIXON, K.W. Cryopreservation for seedbanking of Australian Species. **Kings Park and Botanic Garden**, West Perth - Australia, v. 74, p. 541 – 546, 1994.

VERTUCCI, C.W. Effects of cooling rate on seeds exposed to liquid nitrogen temperatures. **Plant Physiology**, Bethesda - MD, v. 90, p. 1478 – 1485, 1989.

VIANNA, G.R.; COUTO, F.A.A.; OLIVEIRA, A.B. de; ZAMBOLIM, L.; MARIA, A. A. rifampicina na descontaminação bacteriana de explantes de mamoeiro provenientes do campo. **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 2, p. 249 – 254, 1997.

VIEIRA, M.L.C. Conservação de germoplasma *in vitro*. **Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, Brasília - DF, v. 3, n. 14, p. 18 – 20, 2000.

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

- WEISS, E.A. **Castor, sesame and sunflower**. London: Leonard Hill, 1971. 250p.
- WEISS, E.A. **Oilseed Crops**. London: Longman, 1983. 660p.
- WHITE, P.R. **A handbook of plant tissue culture**. Lancaster: The Jacques Cattell Press, 1963. 277p.
- WIESNER, L.E.; LAUFMANN, J.E.; STANWOOD, P.C.; WHEELER, L.T. The effect of liquid nitrogen on alfafa seed viability, emergence, and broken cotyledons. **Journal of Seed Technology**, USA, p. 1 - 6, 1994.
- WOOD, D.W. *In vitro* proliferation of pecan shoots. **HortScience**, Alexandria – VA, 17 (6):890 – 891, 1982.
- ZEWDIE, M.; ELLIS, R.H. Survival of tef and vigor seeds following exposure to sub-zero temperature at various moisture contents. **Seed Science and Technology**, Zurich – Suíça, v. 19, n.2, p. 309 – 317, 1991.

**ANEXO**

---

**Tabela 16.** Caracterização das sementes das duas variedades de *Ricinus communis* em diferentes teores de umidade

<b>Variedade nordestina com 6,6% de umidade b.u</b>		
<b>Germinação (%)</b>	<b>1ª Contagem (%)</b>	<b>Mateira seca (g)</b>
80	80	28,6
<b>Variedade pernambucana com 6,8 % de umidade b.u.</b>		
<b>Germinação (%)</b>	<b>1ª Contagem (%)</b>	<b>Mateira seca (g)</b>
78	78	20,5
<b>Variedade nordestina com 6,0% de umidade b.u</b>		
<b>Germinação (%)</b>	<b>1ª Contagem (%)</b>	<b>Mateira seca (g)</b>
78	78	26,4
<b>Variedade pernambucana com 6,0 % de umidade b.u.</b>		
<b>Germinação (%)</b>	<b>1ª Contagem (%)</b>	<b>Mateira seca (g)</b>
76	76	20,3

Peso médio de 100 sementes da variedade nordestina = 81,0g

Peso médio de 100 sementes da variedade pernambucana = 64,3g

**Ficha:** 01**Data:** 15.12.99**Espécie:** *Ricinus communis* L.**Experimento:** Germinação de sementes**Meio:** MS**Volume final:** 2000 ml**Etapas:****1ª**

Solução	A	B	C	D	Fonte de carbono (g)	MgCl <sub>2</sub>	-
(ml)	200	2,0	20	20	60	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-

**2ª****Reguladores de crescimento:**

Nome e conc.desejada	Conc. Sol. Madre.	MI	Meio
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-

**3ª****Acrescentar água até o volume final:** 2000 ml**4ª****pH:** 5,7**5ª****Solidificante:** (5,5 g/l), (11,0 g/3.200ml)**6ª****Dissolução do solidificante:** 10 minutos no autoclave (120°C/1 atm.)**7ª****Distribuir nos frascos:** ± 20 ml/frasco**8ª****Esterilização:** 30 minutos no autoclave (120°C/1 atm.)

**Ficha:** 02**Data:** 28.12.99**Espécie:** *Ricinus communis* L.**Experimento:** Indução a calogênese**Meio:** MS**Volume final:** 3000 ml**Etapas:****1<sup>a</sup>**

Solução	A	B	C	D	Fonte de carbono (g)	MgCl <sub>2</sub>	-
(ml)	300	3,0	30	30	90	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-

**2<sup>a</sup>****Reguladores de crescimento:**

Nome e conc.desejada	Conc. Sol. Madre.	MI	Meio
ANA(0,5 ml/l)	0,1 mg/ml	1,25	MS1/250
CIN (2,0 ml/l)	1,0 mg/ml	0,50	
ANA (1,0 ml/l)	1,0 mg/ml	0,25	MS2/250
CIN (2,0 ml/l)	1,0 mg/ml	0,50	
ANA (0,5 ml/l)	0,1 mg/ml	1,25	MS3/250
CIN (4,0 ml/l)	1,0 mg/ml	1,00	
ANA (1,0 ml/l)	1,0 mg/ml	0,25	MS4/250
CIN (4,0 ml/l)	1,0 mg/ml	1,00	
ANA (0,5 ml/l)	0,1 mg/ml	1,25	MS5/250
BAP (2,0 ml/l)	1,0 mg/ml	0,50	
ANA (1,0 ml/l)	1,0 mg/ml	0,25	MS6/250
BAP (2,0 ml/l)	1,0 mg/ml	0,50	
ANA (0,5 ml/l)	0,1 mg/ml	1,25	MS7/250
BAP (4,0 ml/l)	1,0 mg/ml	1,00	
ANA (1,0 ml/l)	1,0 mg/ml	0,25	MS8/250
BAP (4,0 ml/l)	1,0 mg/ml	1,00	
ANA (0,5 ml/l)	0,1 mg/ml	1,25	MS9/250
2iP (2,0 ml/l)	1,0 mg/ml	0,50	
ANA (1,0 ml/l)	1,0 mg/ml	0,25	MS10/250
2iP (2,0 ml/l)	1,0 mg/ml	0,50	
ANA (0,5 ml/l)	0,1 mg/ml	1,25	MS11/250
2iP (4,0 ml/l)	1,0 mg/ml	1,00	
ANA (1,0 ml/l)	1,0 mg/ml	0,25	MS12/250
2iP (4,0 ml/l)	1,0 mg/ml	1,00	

**3<sup>a</sup>** = Acrescentar água até o volume final: 2000 ml; **4<sup>a</sup>** = pH: 5,7; **5<sup>a</sup>** = Solidificante: (5,5 g/l), (11,0 g/3.200ml); **6<sup>a</sup>** = Dissolução do solidificante: 10 minutos no autoclave (120°C/1 atm.); **7<sup>a</sup>** = Distribuir nos frascos: ± 20 ml/frasco; **8<sup>a</sup>** = Esterilização: 30 minutos no autoclave (120°C/1 atm.).