

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA
MESTRADO

**ANÁLISE DE DIFERENTES MÉTODOS DE
CRIOCONSERVAÇÃO NA PRESERVAÇÃO DE
SEMENTES DE MILHO (*Zea mays*, L.)**

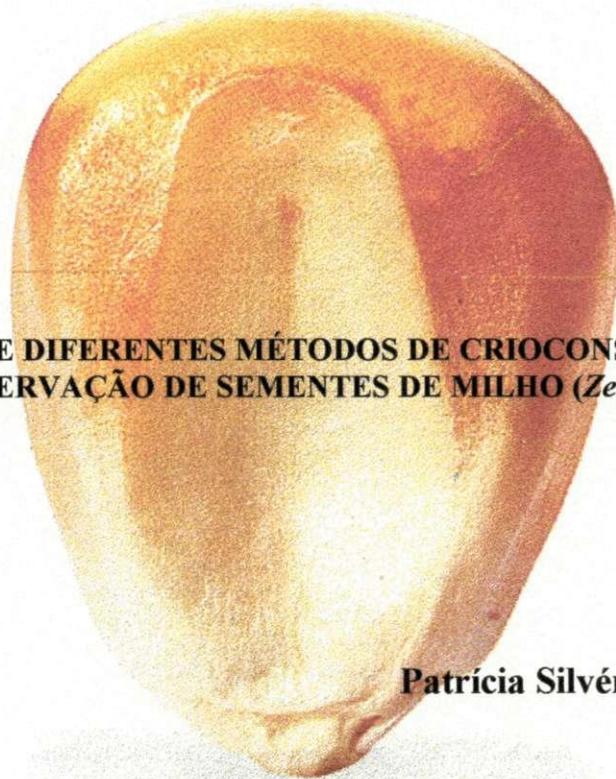
DISSERTAÇÃO

PATRÍCIA SILVÉRIO CÉSAR DINIZ

Campina Grande – Paraíba
Janeiro – 1999



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



**ANÁLISE DE DIFERENTES MÉTODOS DE CRIOCONSERVAÇÃO NA
PRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO (*Zea mays* L.)**

Patrícia Silvério César Diniz

**Campina Grande - Pb
Janeiro de 1999**

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

ANÁLISE DE DIFERENTES MÉTODOS DE CRIOCONSERVAÇÃO NA
PRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO (*Zea mays* L.)

PATRÍCIA SILVÉRIO CÉSAR DINIZ

CAMPINA GRANDE - PARAÍBA
JANEIRO - 1999

ANÁLISE DE DIFERENTES MÉTODOS DE CRIOCONSERVAÇÃO NA
PRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO (*Zea mays* L.)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Engenharia Agrícola da
Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento as exigências para obtenção do grau
de mestre.

Área de Concentração: Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas

ORIENTADOR: MARIO EDUARDO RANGEL MOREIRA CAVALCANTI MATA

CAMPINA GRANDE - PARAÍBA
JANEIRO - 1999



D585a	<p>Diniz, Patrícia Silvério César. Análise de diferentes métodos de crioconservação na preservação de sementes de milho (<i>Zea mays</i>, L.) / Patrícia Silvério César Diniz. - Campina Grande, 1999. 80 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências e Tecnologia, 1999. "Orientação : Prof. Dr. Mário Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti Mata". Referências.</p> <p>1. Milho - Sementes. 2. Sementes de Milho - Crioconservação. 3. Sementes de Milho - Qualidade Fisiológica. 4. Dissertação - Engenharia Agrícola. I. Mata, Mário Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti. II. Universidade Federal da Paraíba - Campina Grande (PB). III. Título</p> <p>CDU 633.15(043)</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

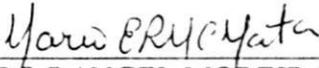
ANÁLISE DE DIFERENTES MÉTODOS DE CRIOCONSERVAÇÃO NA
PRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO (*Zea mays* L.)

Por

PATRÍCIA SILVÉRIO CÉSAR DINIZ

Dissertação aprovada em 11 de janeiro de 1999

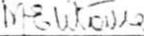
Aprovada:



Prof. Dr. MARIO EDUARDO RANGEL MOREIRA CAVALCANTI MATA
Orientador



Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS CARDOSO ALMEIDA
Examinador



Prof. Dra. MARIA ELITA DUARTE BRAGA
Examinadora



Prof. Dr. PAULO CÉSAR CORRÊA
Examinador

CAMPINA GRANDE - PARAÍBA
JANEIRO - 1999

DEDICO ESTE TRABALHO

AOS MEUS PAIS

ERALDO VIEIRA CÉSAR E ZULEIDE SILVÉRIO CÉSAR

E AOS MEUS FILHOS

DIEGO CÉSAR DINIZ E MATEUS CÉSAR DINIZ

AGRADECIMENTOS

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

De um modo especial ao meu orientador Dr. Mario Eduardo R. M. Cavalcanti Mata pelas imprescindíveis orientações na elaboração deste trabalho.

Ao prefeito Cássio Cunha Lima como também ao secretário Antônio Felinto Neto por minha liberação para a realização desta pesquisa.

Ao amigo e colega Alberto Catão pelos constantes incentivos.

Aos professores Dra. Maria Elita Duarte e Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida pelas preciosas colaborações.

As amigas Avani de Oliveira e Silva e Mércia Melo de Almeida pelo companheirismo e incentivo durante todo este trabalho.

Ao Agrônomo José Wellington dos Santos (EMBRAPA/CNPA) pelos importantes esclarecimentos estatísticos.

Ao Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo – CNPMS da EMBRAPA, na pessoa do Dr. Elton Gama, pelo fornecimento das sementes.

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

CONTEÚDO

	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
RESUMO	ix
SUMMARY	x
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	5
2. 1 - Germinação	5
2. 2 - Vigor	6
2. 3 - Armazenamento a baixas temperaturas	9
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	17
3. 1 - Determinação do teor de umidade limite para crioconservação.....	17
3. 1. 1 - Secagem das sementes	18
3. 1. 2 - Umedecimento das semente.....	19
3. 2 - Crioconservação das sementes	21
3. 2.1. - Descongelamento das sementes	21
3. 2.2. - Análise da qualidade fisiológica	22
3. 2. 2.1 - Teste de germinação	22
3. 2.2.2 - Teste de vigor	22
3. 3 - Análise estatística	24
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4. 1 - Teor de umidade limite para crioconservação – TULC	25
4. 2 - Germinação	28
4. 3 - Vigor	38
5 - CONCLUSÕES	55
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
7 - APÊNDICE A	63

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		PÁGINA
1	Variedades de milho estudadas.....	17
2	Dissecador utilizado na secagem das sementes de milho.....	19
3	Recipiente hermético contendo sementes de milho.....	19
4	Técnicas de criopreservação em nitrogênio líquido.....	20
5	Germinação das sementes de milho.....	22
6	Comprimento do coleótilo da plântula de milho.....	23

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
1	Efeitos de 10 anos de armazenamento a -18°C em algumas espécies conservadas em bancos de germoplasma.....	13
2	Alterações dos valores médios de germinação e vigor - 1ª contagem das 4 variedades de milho em função do seu teor de umidade e de técnicas de crioconservação depois de 3 dias de crioconservadas.....	26
3	Análise comparativa da germinação e vigor - 1ª contagem das sementes de milho para os fatores variedade, métodos de crioconservação e teores de umidade.....	27
4	Valores médios da germinação das 4 variedades de sementes de milho para os diferentes métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem.....	29
5	Análise da variância da germinação das sementes de milho para as diferentes variedades, métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem.....	30
6	Valores médios da germinação das sementes de milho para os fatores: variedades, métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem.....	31
7	Valores médios da germinação das sementes de milho antes e após a crioconservação.....	33
8	Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x período de armazenagem.....	33
9	Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento.....	34
10	Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x método de descongelamento.....	35
11	Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento.....	36

TABELA		PÁGINA
12	Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação método de congelamento x período de armazenagem.....	37
13	Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação método descongelamento x período de armazenagem....	38
14	Valores médios do vigor – 1ª contagem das 4 variedades de sementes de milho para os diferentes métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem.....	39
15	Valores médios do vigor – comprimento do coleóptilo da plântula das 4 variedades de milho para os diferentes métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem.....	40
16	Análise da variância do vigor – matéria seca das plântulas de milho para as diferentes variedades, métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem.....	41
17	Análise da variância do vigor – 1ª contagem das sementes de milho para as diferentes variedades, métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem.....	42
18	Análise da variância do vigor – comprimento do coleóptilo da plântula de milho para as diferentes variedades, métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem.....	43
19	Análise da variância do vigor – matéria seca das plântulas de milho para as diferentes variedades, métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem.....	44
20	Valores médios do vigor das sementes de milho para os fatores: variedade, método de congelamento, método de descongelamento e período de armazenagem.....	45
21	Valores médios do vigor das sementes de milho antes e após a crioconservação.....	47
22	Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento.....	48

TABELA		PÁGINA
23	Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação variedade x método de descongelamento.....	49
24	Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação variedade x período de armazenagem.....	50
25	Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento.....	51
26	Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação método de congelamento x período de armazenagem.....	53
27	Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação método de descongelamento x período de armazenagem.....	54
1A	Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento x método de descongelamento.....	64
2A	Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento x período de armazenagem.....	65
3A	Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x método de descongelamento x período de armazenagem.....	66
4A	Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento x período de armazenagem.....	67
5A	Valores médios do vigor – 1ª contagem das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento x método de descongelamento.....	68
6A	Valores médios do vigor – 1ª contagem das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento x período de armazenagem.....	69
7A	Valores médios do vigor – 1ª contagem das sementes de milho para a interação variedade x método de descongelamento x período de armazenagem.....	70

TABELA		PÁGINA
8A	Valores médios do vigor – 1ª contagem das sementes de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento x período de armazenagem.....	71
9A	Valores médios do vigor – comprimento do coleóptilo da plântula de milho para a interação variedade x método de congelamento x método de descongelamento.....	72
10A	Valores médios do vigor – comprimento do coleóptilo da plântula de milho para a interação variedade x método de congelamento x período de armazenagem.....	73
11A	Valores médios do vigor – comprimento do coleóptilo da plântula de milho para a interação variedade x método de descongelamento x período de armazenagem.....	74
12A	Valores médios do vigor – comprimento do coleóptilo da plântula de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento x período de armazenagem.....	75
13A	Valores médios do vigor – matéria seca das plântulas de milho para a interação variedade x método de congelamento x método de descongelamento.....	76
14A	Valores médios do vigor – matéria seca das plântulas de milho para a interação variedade x método de congelamento x período de armazenagem.....	77
15A	Valores médios do vigor – matéria seca das plântulas de milho para a interação variedade x método de descongelamento x período de armazenagem.....	78
16A	Valores médios do vigor – matéria seca das plântulas de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento x período de armazenagem.....	79
17A	Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação método de descongelamento x período de armazenagem.....	80

RESUMO

Este trabalho teve por objetivos 1) **Determinar o Teor de Umidade Limite para Crioconservação (TULC) das sementes de milho** e 2) **Estudar a qualidade fisiológica de 4 variedades de sementes de milho (BR-451, BR-201, BR-2121 e CMS-54) submetidas a 3 técnicas de crioconservação** (a) imersão em N₂L a -196°C; b) conservação em vapor do N₂L a -170 °C; c) imersão em N₂L por uma hora e posterior conservação em câmaras a -18°C); **3 técnicas de descongelamento** (a) temperatura ambiente; b) banho-maria a 40°C; c) microondas) e **3 períodos de armazenagem** (3, 30 e 90 dias). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 4 x 3 x 3 x 3 + 4 (4 variedades x 3 métodos de congelamento x 3 métodos de descongelamento x 3 períodos de armazenagem + 4 testemunhas), com duas repetições. As análises estatísticas foram feitas pelo programa computacional SAS (Statistical Analysis System), versão 5, através do Proc GLM (SAS INSTITUTE, 1985). De acordo com os resultados obtidos concluiu-se que: a) o teor de umidade limite para a crioconservação - TULC, durante 3 dias, para as variedades de sementes de milho BR-451, BR-201, BR-2121, CMS-54, está em torno de 9% b.u.; b) o método de congelamento que menos efeito teve sobre a germinação e o vigor das sementes de milho foi quando estas foram crioconservadas no vapor do nitrogênio líquido (N₂L); c) de uma maneira genérica, as sementes de milho perdem um percentual significativo de sua germinação e vigor até 30 dias de crioconservadas, e estas tendem a manter sua qualidade fisiológica depois deste período; d) as sementes de milho, variedades BR-451 e CMS-54, crioconservadas sob imersão em nitrogênio líquido, por 90 dias, têm um percentual de germinação maior ao serem descongeladas à temperatura ambiente quando comparado com os outros métodos de descongelamento (banho-maria e microondas). Este fato também ocorre quando a variedade BR-451 é crioconservada no vapor do nitrogênio líquido; e) as sementes de milho, variedades BR-201, BR-2121 e CMS-54, crioconservadas no vapor do nitrogênio líquido, por 90 dias, têm percentuais de vigor (1ª contagem) superiores, ao serem descongeladas à temperatura ambiente, quando comparado com os outros métodos de descongelamento (banho-maria e microondas). Este fato, também ocorre quando as variedades BR-201 e CMS-54 foram crioconservadas por imersão em nitrogênio líquido.

SUMMARY

This work has had its aim 1) **Determining the High Moisture Freezing Limit – (HMFL)** from corn seeds and 2) **Studying the physiologic quality of 4 varieties of corn seeds** (BR-451, BR-201, BR-2121 and CMS-54) put into 3 techniques for cryoconservation (a) immersion in N_2L at $-196^\circ C$; b) conservation in vapor the N_2L at $-170^\circ C$; c) immersion in N_2L for one hour and later conservation in chambers at $-18^\circ C$); 3 **defrosting techniques** (a) environment temperature; (b) floating bath at $40^\circ C$; c) microwave) and 3 **storing periods** (3, 30 and 90 days). The experimental outline has been entirely casual, with factorial arrange $4 \times 3 \times 3 \times 3 + 4$ (4 varieties \times 3 freezing methods \times 3 defrosting methods \times 3 storing periods + 4 witnesses), with two repetitions. The statistical analyses have been done by computation program SAS (Statistical Analysis System), version 5, trough Proc GLM (SAS INSTITUTE, 1995). According to obtained results, the conclusions are: a) the meaning of limit wet for cryoconservation - HMFL, during 3 days for varieties of corn seeds BR-451, BR-201, BR-2121, CMS-54 is around 9% w.b.; b) the freezing methods with less effect over germination and strength of corn seeds happened while cryoconservation in vapor of liquid nitrogen (N_2L); c) in a general way, corn seeds lose a remarkable percentage of germination and strength up to 30 days in cryoconservation, and the seeds have got a tendency to keep their physiologic quality after this period of time; d) corn seeds typed BR-451 and CMS-54 crioconserved under liquid nitrogen immersion for 90 days has got a bigger germination percentage while defrosting in room temperature when compared with other defrosting methods (floating and microwave). This can also happen when the BR-451 variety is crioconserved in liquid nitrogen vapor; e) corns seeds, types BR-451, BR-2121 and CMS-54 crioconserved in liquid nitrogen vapor for 90 days have got superior strength percentage (1st count) when defrosting in room temperature, when compared to other defrosting methods (floating and microwave). This also happens when varieties BR-201 and CMS-54 are crioconserved in liquid nitrogen immersion.

1. INTRODUÇÃO

Os cereais constituem a maior fonte de alimentação para o homem. Aproximadamente 90% dos grãos produzidos para consumo provêm dos cereais, que apresentam a base da alimentação de muitos países. Em consequência disso, qualquer modificação na disponibilidade e qualidade dos grãos ou seus derivados, causa ao homem grandes repercussões sócio-econômicas.

Dentre os cereais produzidos no País, o milho é uma das mais importantes culturas, podendo ser avaliada por meio de alguns fatos, como: cultura de maior área cultivada, responsável pelo maior emprego de mão-de-obra rural e, principalmente, fornecedora de insumos alimentícios para a atividade de criação animal.

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo, superado apenas pelos Estados Unidos e pela China Continental, os quais são responsáveis por 70% da produção mundial (CENÁRIO, 1995). De acordo com os dados da safra de 96, a produção total de cereais, leguminosas e oleaginosas no Brasil alcançou 73,275 milhões de toneladas. Em 1997, o milho teve uma variação positiva em relação à produção de aproximadamente 28 milhões de toneladas obtidas em 1996. Na primeira safra, o aumento estimado foi de 7,63%, e na segunda o aumento foi de 12,07% (IBGE, 1997).¹⁾

O Brasil, devido a sua diversidade edafoclimática, tem a necessidade de desenvolver novas variedades de milho comum e híbridos, mais adaptadas às diferentes microregiões com a finalidade de obter maiores produtividade e renda, sendo que os materiais fitogenéticos utilizados para este desenvolvimento vêm de sementes provenientes de outros países, bem como de variedades consideradas nativas e ou já cultivadas pelo homem a séculos.

Portanto, é de grande necessidade a preservação do patrimônio genético das sementes para que haja uma melhoria na produtividade, pois os recursos fitogenéticos proporcionam matéria-prima para se obter melhores e novas variedades de plantas mediante melhoramento vegetal ou através da engenharia genética. A manutenção da

adversidade genética constitui o melhor sistema de luta contra a degradação e conservação ambiental e na preservação de espécies ameaçadas de extinção. Em países desenvolvidos, como os Estados Unidos e a Europa, já se tem a preocupação da conservação dos recursos fitogenéticos, devido ao enorme valor estratégico que eles representam.

Para preservar os recursos fitogenéticos existentes por longos períodos de tempo, tem sido normalmente utilizado, o banco de germoplasma, que consiste no armazenamento de pequenas amostras de sementes, previamente secas, consideradas raras, nativas ou em extinção, a temperaturas que variam de 0 a 10°C e umidade relativa entre 20 e 40%, podendo existir, em muitos casos, sementes que são conservadas sob a forma congelada (-18 °C). A desvantagem da conservação de sementes em banco de germoplasma tradicional é que após determinado período de armazenamento, as sementes começam a perder sua viabilidade, existindo a necessidade de sua multiplicação em campo sob pena de perder-se a sua produtividade, o que caracteriza a erosão genética das espécies, mesmo sob boas condições de conservação, além de ter um custo considerado elevado. Em decorrência destes fatos, o material armazenado deve ser renovado mediante novas coletas e/ou feita uma nova multiplicação em campo dessas sementes conservadas.

A criopreservação tem sido utilizada como um método alternativo ao banco de germoplasma tradicional, uma vez que a conservação das sementes abaixo de -130°C permite que o seu metabolismo seja paralisado, impedindo a sua deterioração. A criopreservação tem se mostrado como um método eficiente, prático e de baixos custos na preservação dos recursos fitogenéticos, além de manter a semente viável por tempo considerado indefinido (PITA VILLAMIL, 1997).

¹⁾ A armazenagem de 14 variedades de sementes de cebola em nitrogênio líquido (-196°C) pelo período de 10 anos, foi realizada por STANWOOD e SOWA (1995), onde o autores não observaram, durante esse período, uma redução significativa do seu poder germinativo médio de 92%, demonstrando desta forma, o sucesso que se pode obter com a criopreservação de sementes. ⁱⁱ⁾

Contudo, isto que poderia parecer uma solução definitiva, na realidade não se comporta desta forma para todas as sementes, pois existem sementes que não toleram o frio ou seja a criopreservação, e outras sementes que perdem sua viabilidade quando secas. As sementes que toleram a dissecação e podem ser armazenadas a baixas temperaturas, inclusive às temperaturas criogênicas (entre -130°C e -196°C) são denominadas de sementes ortodoxas (ALMEIDA e CALVACANTI MATA, 1997).

Existem ainda as sementes recalcitrantes, que perdem sua viabilidade quando secas e não toleram as condições de conservação a baixas temperaturas inclusive as temperaturas criogênicas ou ainda a associação desses dois parâmetros. Essas sementes, dependendo da espécie e do tempo de armazenamento, perdem sua capacidade de germinação quando criopreservadas (CHANDEL *et al.*, 1995).

No entanto, existem algumas sementes que, mediante o estudo do teor de umidade mais adequado para criopreservação, permitem ser armazenadas a temperaturas criogênicas. Contudo, para que essas sementes possam ser armazenadas e não apresentem problemas com relação ao teor de umidade, é necessário a determinação do teor de umidade limite que as sementes podem ser criopreservadas, isto é, a determinação do HMFL – High Moisture Freezing Limit.

Uma vez estabelecido o Teor de Umidade Limite para Criopreservação (TULC), as sementes podem ser criopreservadas e este método se apresenta como uma alternativa aos métodos tradicionais de conservação de sementes que consiste na imersão das sementes em nitrogênio líquido (N_2L a -196°C), ou na sua exposição ao vapor de nitrogênio líquido (N_2L entre -160 e -180°C). Todavia a determinação do TULC, por si só não determina que as sementes possam ser criopreservadas por tempo ilimitado, e neste caso, cabe uma investigação para cada espécie e cada variedade dentro das espécies.

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

descongelamento lento (temperatura ambiente) se torna questionável, uma vez que existe a possibilidade do recongelamento durante este período, necessitando desta forma, estudos em relação aos métodos mais rápidos como o descongelamento em banho-maria (temperatura de 40°C) e a utilização do microondas.

Portanto, diante do exposto, este trabalho teve como objetivos:

1. Determinar o Teor de Umidade Limite para Crioconservação (TULC) das sementes de milho;

2. Estudar a qualidade fisiológica de 4 variedades de sementes de milho (BR-451, BR-201, BR-2121 e CMS-54) submetidas a 3 técnicas de crioconservação, 3 técnicas de descongelamento e 3 períodos de armazenagem:

Congelamento

- imersão em N₂L a -196°C;
- no vapor do N₂L a -170 °C
- imersão em N₂L e conservação em câmaras a -18°C.

Descongelamento

- temperatura ambiente;
- banho maria a 40°C;
- microondas.

Períodos de armazenagem

- 3dias
- 30 dias
- 90 dias

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Germinação

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

O primeiro atributo da qualidade fisiológica a considerar-se em um lote de sementes é a porcentagem de germinação, que representa a capacidade da semente em dar origem a uma plântula normal (DIAS e CROCHEMORE, 1993).

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

De acordo com POPINIGIS (1985) a germinação é o reinício do crescimento do embrião paralisado nas fases finais de maturação. Os processos fisiológicos do crescimento exigem atividades metabólicas aceleradas, e a fase inicial da germinação consiste primariamente na ativação daqueles processos, pelo aumento do teor de umidade e da atividade respiratória da semente. Já, CARVALHO e NAKAGAWA (1988), definem germinação como o fenômeno pelo qual, sob condições apropriadas, o eixo embrionário dá prosseguimento ao seu desenvolvimento, o qual tem sido interrompido por ocasião da maturidade fisiológica.

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

Para PUZZI (1986) o teste de germinação avalia a capacidade da semente produzir uma plântula normal, sob condições artificiais altamente favoráveis. É um método padronizado e o único reconhecido para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes. Esse é o teste mais comum e freqüente para a determinação da qualidade fisiológica de sementes, sendo o seu procedimento padronizado, o que o torna a mais importante informação para fins de comercialização de sementes (MARTINS NETO, 1994).

Segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) germinação de sementes em teste de laboratório é a emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo. E, para que uma plântula possa continuar seu desenvolvimento até tornar-se uma planta normal, deve apresentar as seguintes estruturas essenciais: sistema radicular (raiz primária, raízes secundárias e em certos casos raízes seminais), parte aérea (hipocótilo, epicótilo, em certas gramíneas, mesocótilo e gemas terminais), cotilédones (um ou mais) e coleótilo (em todas as gramíneas). O objetivo final do teste de germinação é obter informações sobre o valor das sementes para fins de semeadura e fornecer dados que possam ser usados para comparar o valor de diferentes lotes de sementes.

2.2. Vigor

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

Segundo MOORE (1972) vigor é a capacidade que possui uma semente para se desenvolver e formar plântula normal, mesmo em condições que não sejam satisfatoriamente ideais, como as que ocorrem no campo comumente.

PERRY (1977) considera vigor a soma total das propriedades da semente que determinam o nível potencial de atividade e desempenho da semente ou lote de semente, durante a germinação e emergência da plântula. As sementes que apresentam

bom desempenho são chamadas “vigorosas”, enquanto as que apresentam fraco desempenho, são chamadas “sementes de baixo vigor”.

DELOUCHE (1968) afirmou que vigor e deterioração estão intimamente ligados, pois o ponto de máximo vigor da semente é o de mínima deterioração. Sendo que, deterioração inclui toda e qualquer mudança degenerativa e irreversível na qualidade, após a semente ter atingido o seu nível máximo de qualidade. Segundo SASSESON (1980) deterioração é a manifestação mais comum da queda de vigor.

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

Segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL,1992) os testes de vigor baseados na avaliação das plântulas são realizados em laboratório sob condições controladas ou em condições de campo. Os testes de laboratório são instalados, em sua maioria, nas mesmas condições e metodologia do teste padrão de germinação.

DELOUCHE e CALDWELL (1960) entendem que o vigor deve ser analisado sob dois aspectos: susceptibilidade em condições desfavoráveis de campo e velocidade de germinação e crescimento das plantas. Igualmente entendem que os testes de vigor podem ser classificados em diretos e indiretos. Os diretos simulam em laboratório as condições desfavoráveis de campo, tendo como desvantagens as grandes variações entre os resultados obtidos em diversos laboratórios ou em um mesmo laboratório. Por outro lado, a padronização é dificultada pela necessidade de simular condições adversas diferentes para a mesma cultura, e os indiretos medem certos atributos fisiológicos da semente. Os autores afirmam ainda que, esses testes possibilitam o controle de variáveis, permitindo reproduzir os resultados. A desvantagem está na impossibilidade de avaliar simultaneamente todos os fatores de vigor, particularmente, injúrias e anomalias morfológicas.

Esses testes foram classificados por ISELY (1957) da seguinte forma:

Testes Diretos:

1. Teste de frio;
2. Velocidade de emergência no campo;
3. População inicial;
4. Peso da matéria verde das plântulas;
5. Peso da matéria seca das plântulas.

Testes Indiretos:

- Fisiológicos:
1. Primeira contagem;
 2. Velocidade de germinação;
 3. Crescimento da raiz;
 4. Crescimento da plântula;
 5. Transferência de matéria seca.

- Bioquímicos:
1. Teste de respiração;
 2. Teste da descarboxilase e do ácido glutâmico (GADA);
 3. Teste de tetrazólio;
 4. Teste do teor de ácidos graxos;

- Resistência:
1. Germinação a baixa temperatura;
 2. Imersão em água quente;
 3. Teste de submersão;
 4. Imersão em soluções osmóticas;
 5. Imersão em soluções tóxicas;
 6. Teste de exaustão;
 7. Teste de envelhecimento precoce;
 8. Camada de resistência.

O teste de primeira contagem da germinação segundo CAMARGO e VECHI (1971) é um dos testes que podem ser estudados nos laboratórios e relacionados com a capacidade das sementes em armazenamento e posterior desempenho no campo.

De acordo com VIEIRA e CARVALHO (1994) 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.

Segundo MARCOS FILHO *et al.* (1987) o objetivo básico dos testes de vigor é a identificação de possíveis diferenças significativas na qualidade fisiológica de lotes que apresentem poder germinativo semelhante. Afirmam, porém, que isto não significa que se deva promover a substituição do teste de germinação pelo de vigor.

2.3. Armazenamento a baixas temperaturas

A crioconservação em nitrogênio líquido é um método eficiente e prático para a conservação dos recursos fitogenéticos. MEDEIROS e CAVALLAR (1992) definem crioconservação em nitrogênio líquido como sendo a preservação de materiais biológicos a baixas temperaturas (entre -160 e -196°C) onde, sob essa temperatura, todos os processos metabólicos são essencialmente paralisados e mantido em estado latente, proporcionando conseqüentemente preservação indefinida. Outros autores acrescentam que a crioconservação em nitrogênio líquido está sendo um método potencialmente estudado para reduzir a taxa de deterioração, aumentando assim o tempo de armazenamento das sementes, assegurando ainda a preservação das fontes genéticas da planta além de reduzir os custos e a perda da viabilidade (STANWOOD, 1985; STANWOOD e BASS, 1981; STANWOOD e ROSS, 1979; STANWOOD e BASS, 1978; SAKAI e NOSHIRO, 1975). Pesquisas indicam que a conservação em N₂L pode ser usada para espécies de sementes de importância agrônômica (STANWOOD, 1987, 1985, 1980).

De acordo com o Internacional Board for Plant Genetic Resources – IBPGR (1982) a crioconservação é uma tecnologia indicada para as espécies de propagação vegetativa, espécies com sementes recalcitrantes, germoplasma raros ou mesmo espécies ameaçadas de extinção.

A conservação dos recursos fitogenéticos se transforma no instrumento maior na preservação de espécies ameaçadas de extinção e espécies de plantas silvestres. PENCE (1991) crioarmazenou plantas ameaçadas de extinção em Ohio. Foi feito um total de 527 testes em 237 espécies para determinar sua viabilidade de exposição ao nitrogênio líquido. Em 79% dos testes em que foram analisados a germinação não houve diferenças significativas. Estima-se que pelo menos 25% das espécies analisadas poderiam ser crioarmazenadas.

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 exposição diferentes. Os resultados não indicaram diferenças significativas na maioria das espécies em relação ao percentual de germinação, tanto nas amostras de sementes com teores de umidade diferentes, como também, nas amostras de sementes com diferentes tempo de exposição ao nitrogênio líquido.

TOUCHELL e DIXON (1994) armazenaram em nitrogênio líquido, espécies de sementes nativas Australianas, onde 40% destas espécies são raras e estão ameaçadas de extinção no oeste da Austrália e verificaram que após a crioconservação, as propriedades físicas e químicas das sementes são preservadas. Os autores avaliaram também as regras para os métodos *in vitro* de determinação da viabilidade/recuperação de espécies de sementes que estão tanto danificadas pelo nitrogênio quanto com dificuldades para germinação.

Segundo BHAT *et al.* (1994) sementes de *Musa balbisiana* com teor de umidade de 13,15% sobreviveram a exposição do nitrogênio líquido. Depois, rapidamente descongelados, mais de 90% dos embriões germinaram nas sementeiras. Observaram ainda, que, semente com casca foi a maior barreira à penetração da água, portanto, evitando assim a germinação completa das sementes.

A técnica de criopreservação, além de armazenar sementes por tempo indeterminado sem perda da viabilidade, é de grande potencial no armazenamento de sementes ortodoxas e sementes recalcitrantes (STANWOOD, 1985) e de embriões de sementes recalcitrantes (PENCE, 1990).

ROBERTS (1973) introduziu o termo ortodoxas para espécies cujas sementes podem ser submetidas a secagem e em seguida, armazenadas a baixas temperaturas, permanecendo viáveis por longo período de tempo.

GONZALEZ-BENITO *et al.* (1995) estudaram a germinação de sete cultivares de aipo (*Apium graveolens* L.) armazenados em nitrogênio líquido, no período de 1 a 3 dias. A criopreservação também foi aplicada em sementes sem casca e de primeira qualidade, e em nenhum dos tratamentos foram reduzidas as percentagens de germinação.

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

Segundo ROBERTS (1973), existem ainda as sementes recalcitrantes que perdem a viabilidade quando são desidratadas, dificultando sua conservação. De acordo com KARUNUKI e YOSHIDA (1991), sementes de chá são recalcitrantes e são muito difíceis de serem armazenadas em nitrogênio líquido, devido ao seu alto teor de umidade. Elas também são sensíveis à secagem e os percentuais de germinação diminuem rapidamente quando secas a valores abaixo de 50% b.u.. Os autores também observaram que as sementes quando foram secas até um teor de 20% b.u., estas não sobreviveram ao serem imersas em nitrogênio líquido. Entretanto, os autores observaram uma sobrevivência quando as sementes foram cortadas no seu eixo embrionário, secas entre 15 e 30% b.u. e imersas em nitrogênio líquido.

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

Sementes de café (*Coffea liberica* Bull ex Hiern) podem ser crioconservadas com sucesso depois de atingirem o teor de umidade de 16,7% b.u. apresentando 53,3% de sobrevivência, enquanto que embriões tem de 83 - 86% de sobrevivência depois de crioconservados a um teor de umidade entre 15 e 20% b.u.. Foi observado que sementes de café com endocarpo sobreviveram melhor do que aquelas sem endocarpo. Sementes de feijão (*Vigna sesquipedalis* L.), entretanto, mostraram características normais às sementes ortodoxas onde ambas, sementes e embriões cortados, sobreviveram em torno de 90% à crioconservação, com um teor de umidade de aproximadamente 9% no intervalo de 6,7 a 10,5% b.u. respectivamente (NORMAH e VENGADASALAM, 1992).

Sementes de 14 vegetais e de 2 espécies de flores foram colocadas dentro de envelopes de papel especial e expostas ao nitrogênio líquido (N₂L a -196°C), durante um período de 180 dias. STANWOOD e ROOS (1979) avaliaram que os testes de germinação não indicaram redução nos seus percentuais após à exposição em nitrogênio líquido. Segundo os mesmos autores, as sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e ervilha (*Pisum sativum* L.) também não indicaram redução nos testes de germinação e vigor após à exposição ao nitrogênio líquido.

Sementes de *Populus deltoides* foram analisadas por PENCE (1996) para verificar a possibilidade de secagem em fluxo laminar e armazenamento às temperaturas de 4°C, -20°C e em nitrogênio líquido. A capacidade de germinação foi mantida quando armazenada a -20°C, porém diminuem entre 40 e 70% quando as sementes são

armazenadas a 4°C. Estes resultados sugerem que o armazenamento a -20°C ou em nitrogênio líquido poderia ser usado para armazenamento em banco de germoplasma de sementes de *Populus*.

CHAUDHURY e CHANDEL (1995) crioconservaram, com sucesso, sementes de Cardamon (*Elettaria cardamomun* Maton) com teor de umidade entre 7,7 e 14,3% b.u.. As sementes apresentaram índices de germinação superior a 80% após um ano em vapor de nitrogênio líquido (-150°C).

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

STONAYOVA (1994) avaliou os efeitos da crioconservação de várias espécies de sementes a uma temperatura de -18°C, durante um período de 10 anos. Os resultados indicaram que das 253 observações feitas para as sementes de milho (*Zea mays* L.), ao longo desse período, apenas 11 observações apresentaram redução da viabilidade menor que 10%, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Efeitos de 10 anos de armazenamento a -18°C em algumas espécies conservadas em bancos de sementes.

Espécies de sementes	Número de observações Realizadas	Observações com redução de viabilidade
Cereal	1406	
<i>Triticum durum</i>	33	2*
<i>Zea mays</i>	253	11*
<i>Sorghum bicolor</i>	336	38**/40*
<i>Avena sativa</i>	2	-
<i>Secale cereale</i>	2	-
<i>Hordeum vulgare</i>	206	-

Continuação da Tabela 1.

Espécies de sementes	Número de observações realizadas	Observações com redução de viabilidade
Leguminosa	328	
<i>Pisum sativum</i>	85	4*
<i>Vicia sativa</i>	47	2*
<i>Glycine arietinum</i>	98	15*
<i>Cicer arietinum</i>	40	-
<i>Lens culinaris</i>	48	2*
Forragem	219	
<i>Lolium perenne</i>	18	-
<i>Festuca spp.</i>	15	-
<i>Dactylis glomerata</i>	172	2*
<i>Phleum pratense</i>	3	-
<i>Trifolium pratense</i>	5	-
<i>Medicago spp.</i>	5	-
<i>Kohia</i>	1	1**
Legumes	322	-
<i>Brassica napus</i>	58	-
<i>Brassica rapa</i>	9	-
<i>Crambe abyssinica</i>	12	-
<i>Lallemantia</i>	5	-
<i>Madia</i>	3	-
<i>Sinapis alba</i>	95	2*
<i>Sesamum indicum</i>	15	-
<i>Helianthus annuus</i>	106	4*
<i>Camelina sativa</i>	19	-
Vegetais	214	
<i>Brassica oleracea</i>	1	-
<i>Cucumis melo</i>	40	-
<i>Lycopersicon</i>	148	2*
<i>Lepidium</i>	6	-
<i>Lactuca sativa</i>	7	-
<i>Capsicum annum</i>	2	-
<i>Brassica campestris</i>	8	-
Flores	18	-
<i>Tagetes erecta</i>	18	-

* observações com redução de viabilidade menor que 10%

** observações com redução de viabilidade menor que 20%

PITA VILLAMIL (1997) adotou um procedimento básico para avaliar os efeitos da crioconservação de um lote de sementes. Nesse procedimento é analisado a viabilidade das sementes após a imersão em nitrogênio líquido, fazendo ou não a dissecação antes da crioconservação, para a definição de qual técnica aquele lote de sementes poderá ser melhor crioconservada, como mostra a Figura 1.

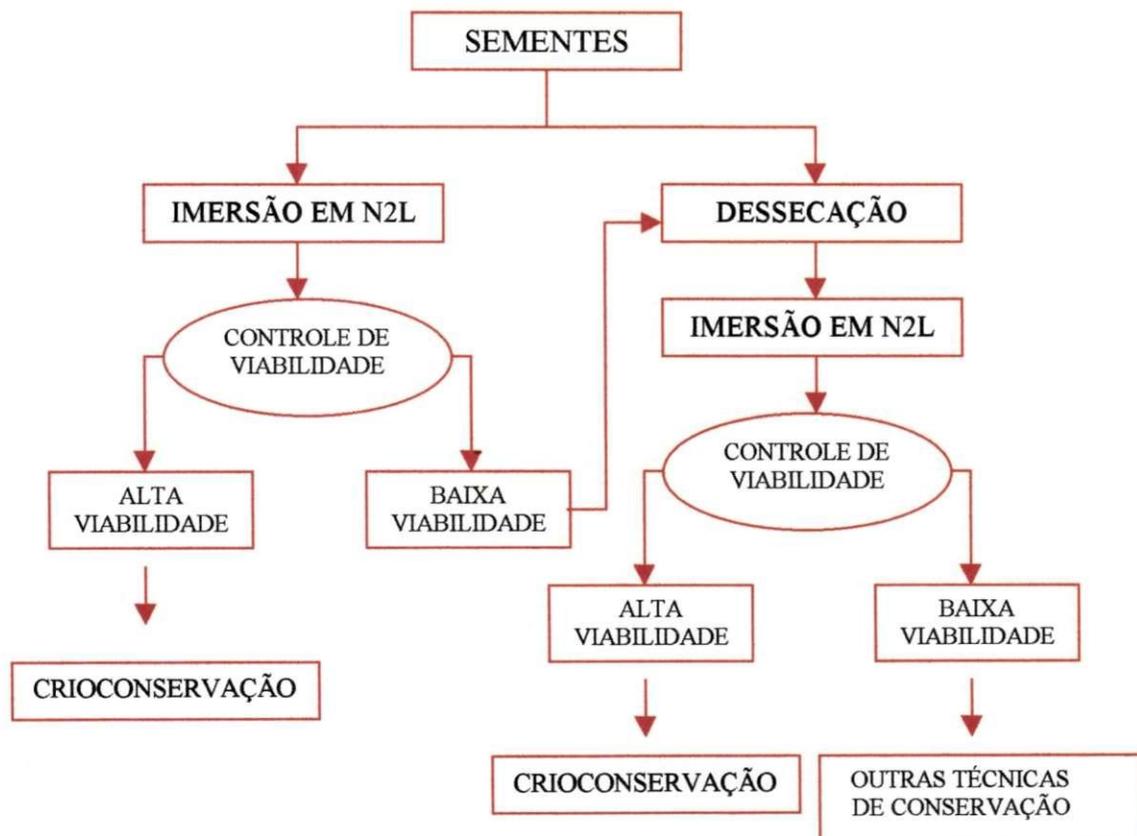


FIGURA 1. Procedimento para a avaliação da viabilidade da crioconservação de um lote de sementes.

WIESNER *et al.* (1993) crioconservaram sementes de alfafa (*Medicago sativa* L subsp. sativa) em nitrogênio líquido (-196°C) e no vapor do nitrogênio líquido (-160°C) por 24 horas e constataram que houve quebra de cotilédone quando expostas ao N₂L em forma de vapor. A quebra de cotilédones foi reduzida quando a semente foi escarificada antes da exposição ao N₂L.

Sementes de bambu (*Bambusa arundinacea*) foram armazenadas após serem colocadas em bolsas plásticas herméticas e transparentes a uma temperatura de -70°C, de forma gradativa (40°C , -20°C e -70°C). Os resultados indicaram que cerca de 65% das sementes germinaram após um período de 1 ano (BRAHAMACHARY, 1994).

A criopreservação em nitrogênio líquido também está sendo usada na conservação de cultura de tecido *in vitro*, TANNOURY *et al.* (1995) utilizaram esse método para a criopreservação, em nitrogênio líquido, do cravo (*Dianthus caryophyllus* L.). O tecido apical foi encapsulado com teor de umidade de 20%. Os autores não observaram mudanças significativas após o armazenamento a - 196°C.

O comportamento do pólen criopreservado de quatro cultivares de rosas foi analisado por RAJASEKHARAN e GANESHAN (1994). O pólen criopreservado *in vitro* após 48 horas e em um ano em nitrogênio líquido, manteve sua capacidade de fertilizar e produzir sementes, possibilitando ainda a polinização em qualquer época do ano e em qualquer localização como também, a conservação de genes haplóides em rosas através de criobanco de pólen.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

Este trabalho foi realizado no Setor de Criogenia do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal da Paraíba – Campus II em Campina Grande, PB.

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 4 variedades (Figura 1) de sementes de milho (*Zea mays* L.), BR-451, BR-201, BR-2121 e CMS-54, cedidas pelo Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, EMBRAPA – CNPMS - Sete Lagoas - MG.



FIGURA 1 – Variedades de milho estudadas

3.1. Determinação do Teor de Umidade Limite para Crioconservação (TULC)

Inicialmente foram determinados os teores de umidade inicial de cada variedade de milho através do método padrão da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, por 24 horas, de acordo com as “Regras de Análise de Sementes” (BRASIL,1992). Foram pesadas 2 amostras de 5g (P_i) para cada variedade de sementes de milho através de uma balança eletrônica marca Mettler, modelo PC 440, com precisão de 0,01g. Após o tempo de exposição na estufa, as amostras foram retiradas, resfriadas em dissecador por um período de 30 minutos e em seguidas pesadas, obtendo-se o peso final (P_f). A porcentagem de umidade foi calculada aplicando-se a seguinte expressão:

$$U = [(P_i - P_f) / P_i] \times 100$$

em que

P_i = peso inicial da amostra (g) ;

P_f = peso final da amostra (g) ;

U = teor de umidade em base úmida (% b.u.)

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

Após a determinação do teor de umidade inicial de cada variedade de sementes essas foram secas ou umidificadas até que atingissem os teores de umidade de 6, 9, 12, 15, 18 e 21% b.u.. Como as sementes de milho tinham um teor de umidade inicial de aproximadamente 10% b.u., foi feita uma secagem das sementes para a obtenção dos teores de umidade de 6 e 9% b.u. e um umedecimento das sementes para a obtenção dos teores de umidade de 12, 15, 18 e 21% b.u. A quantidade de água a ser evaporada ou adsorvida, em gramas, foi determinada com a seguinte expressão:

$$A_e = P_i \times [(100 - U_i) / (100 - U_f)]$$

em que

A_e = quantidade de água a ser evaporada ou adsorvida (g) ;

P_i = peso inicial das sementes (g) ;

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

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

3.1.1. Secagem das Sementes

Para a secagem das sementes as amostras de milho foram colocadas em um desidecador contendo como material dessecante sílica gel. As amostras foram pesadas a cada 24 horas, até atingirem os pesos referentes aos teores de umidade desejados. Para este fim foi utilizada uma balança eletrônica Mettler modelo PC 440, com precisão de 0,01g.

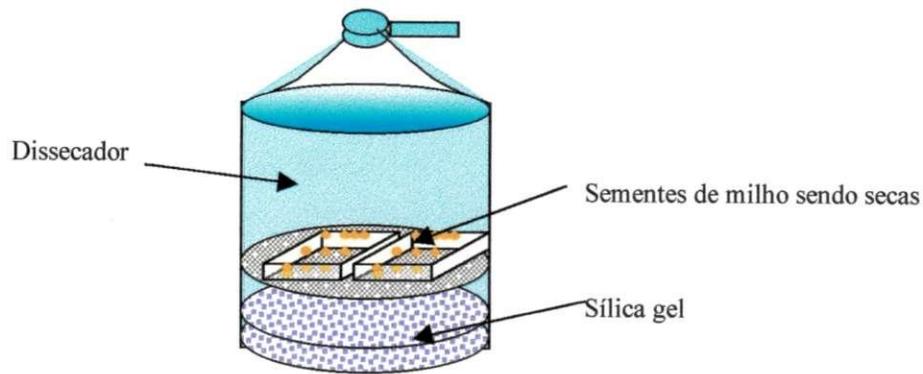


FIGURA 2 - Dissecador utilizado na secagem das sementes de milho

3.1.2. Umedecimento das Sementes

Para o umedecimento das sementes as amostras foram colocadas em pequenas cestas de arame, suspensas por um anel de PVC e colocadas no interior de recipientes de vidro hermeticamente fechados contendo água (Figura 3) e posteriormente colocadas em câmaras a 10°C. As cestas com as amostras foram pesadas a cada 24 horas, utilizado-se uma balança eletrônica Mettler modelo PC 440, com precisão de 0,01g, até que atingissem os pesos referentes aos teores de umidade desejados.

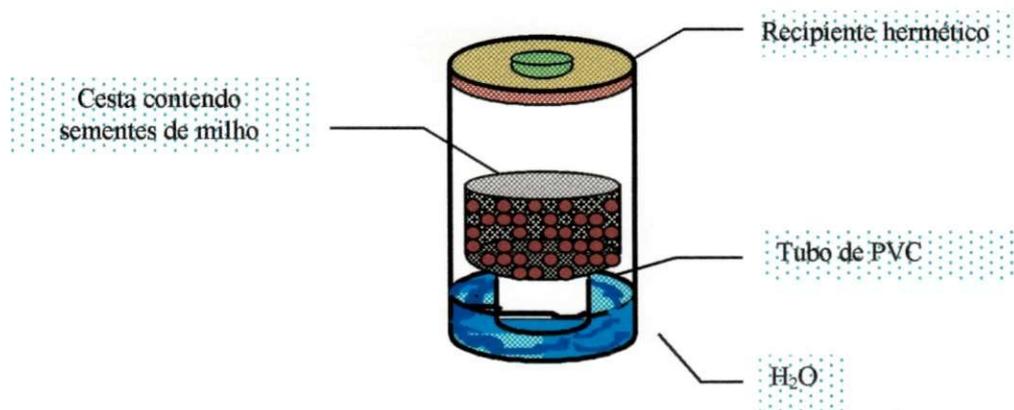


FIGURA 3 – Recipiente hermético contendo sementes de milho

As sementes ao atingirem os teores de umidade, referenciados no item 3.1. , foram colocadas dentro de tubos cilíndricos e criopreservadas em botijões criogênicos durante um período de 3 dias. As técnicas de criopreservação (Figura 4) foram :

- a) Imersão em nitrogênio líquido (N_2L), as sementes foram colocadas dentro de tubos cilíndricos e posteriormente introduzidas em recipientes criogênicos a uma temperatura de $-196^\circ C$, de forma que todas as sementes ficassem imersas em nitrogênio líquido;
- b) Vapor do nitrogênio líquido (N_2L), as sementes foram colocadas dentro de tubos cilíndricos e posteriormente introduzidas em recipientes criogênicos, de forma que as sementes ficassem acima no nível do nitrogênio líquido, sendo criopreservadas apenas com o vapor do mesmo a uma temperatura de $-170^\circ C$;
- c) Imersão em nitrogênio líquido (N_2L) durante 1 hora e posteriormente colocadas em câmaras a $-18^\circ C$. As sementes foram colocadas dentro de tubos cilíndricos e posteriormente introduzidas em tubos criogênicos durante um período de 1 hora e em seguida as sementes foram colocadas em câmaras a uma temperatura de $-18^\circ C$.

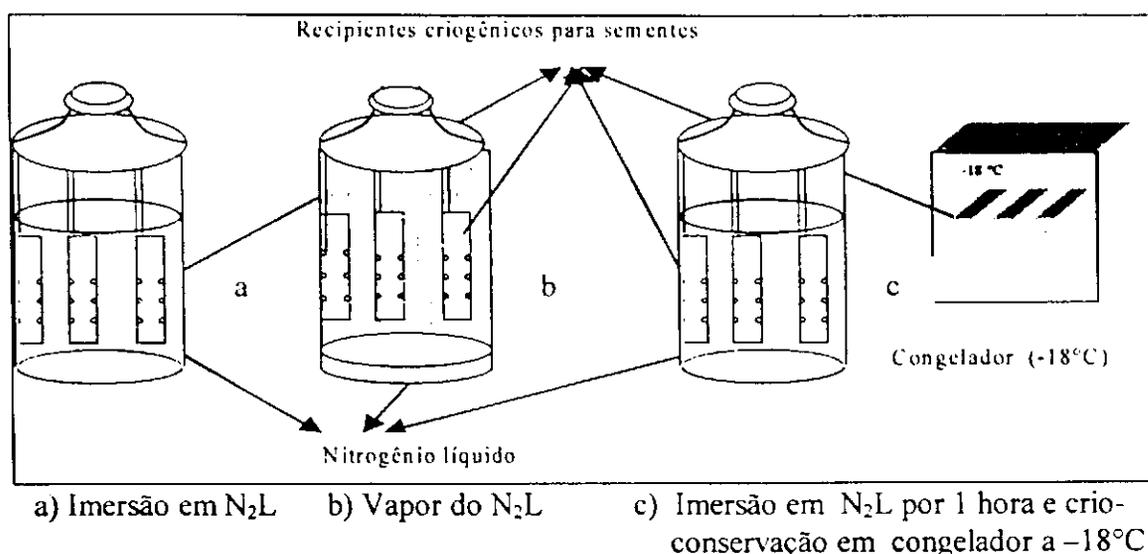


FIGURA 4. Técnicas de criopreservação em nitrogênio líquido

Após 3 dias de criopreservadas, as sementes foram submetidas ao descongelamento em banho-maria por 2 horas a uma temperatura de $40^\circ C$, e em seguida foram feitos os testes de germinação e vigor seguindo-se as “Regras de Análise de Sementes” (BRASIL, 1992).

Feitas as avaliações desses testes, determinou-se o melhor teor de umidade que as sementes poderiam ser crioconservadas, isto é, o teor de umidade limite para a crioconservação (TULC).

3.2. Crioconservação das Sementes

As variedades de sementes de milho, após estabelecido o melhor teor de umidade que as sementes poderiam ser crioconservadas estas foram submetidas as mesmas técnicas de crioconservação, acima citadas, ou seja: 1) Imersão em nitrogênio líquido (N_2L a $-196\text{ }^\circ\text{C}$); 2) Vapor do nitrogênio (N_2L a $-170\text{ }^\circ\text{C}$) e 3) Imersão em nitrogênio líquido (N_2L a $-196\text{ }^\circ\text{C}$) durante uma hora e posteriormente acondicionada em câmara a $-18\text{ }^\circ\text{C}$; sendo estas submetidas as referidas crioconservações pelo período de armazenamento de 3, 30 e 90 dias.

3.2.1. Descongelamento das sementes

Após decorrido cada período pré determinado para avaliação das sementes, estas foram submetidas a 3 métodos de descongelamento:

- a) descongelamento lento; que consiste no descongelamento a temperatura ambiente de $25\text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 horas, tempo suficiente para que as sementes fossem totalmente descongeladas;
- b) descongelamento em banho-maria; que consiste no descongelamento das sementes a uma temperatura de $40\text{ }^\circ\text{C}$ em placa aquecedora Fanem modelo 176;
- c) descongelamento em microondas; que consiste no descongelamento das sementes em microondas a uma potência mínima de 70W durante 1 minuto e 30 segundos.

Antes e após a crioconservação foram feitas análises da qualidade fisiológica que se constituiu do teste de germinação e vigor das sementes de milho para cada variedade.

3.2.2. Análise da qualidade fisiológica

3.2.2.1. Teste de Germinação

Para a determinação do percentual de germinação das sementes de milho foram utilizadas bandejas de plástico de 45 cm de comprimento por 30 cm de largura e 7cm de altura, contendo substrato de areia previamente passada em uma peneira de malha fina (No 16-ABNT), e esterelizada em estufa a 135°C por 12 horas. A areia foi umedecida com água destilada, sendo reposta a medida que o substrato era ressecado pelo ar ambiente. Para cada determinação foram utilizadas 2 bandejas (repetições) contendo cada uma 100 sementes (Figura 5). A percentagem de germinação foi obtida pela contagem das plântulas saudáveis emersas até o sétimo dia. Este teste foi efetuado seguindo-se a orientação prescrita pelas “Regras de Análise de Sementes” (BRASIL, 1992).



FIGURA 5 – Germinação das sementes de milho

3.2.2.2. Teste de Vigor

O teste de vigor foi realizado utilizando o teste indireto de primeira contagem, peso da matéria seca e comprimento do coleóptilo das plântulas no sétimo dia.

- **Teste de Primeira Contagem de Germinação**

Este teste foi realizado através do número de plântulas normais obtidas na primeira contagem (4^o dia). Foi obedecido o mesmo critério do teste padrão de germinação descrito anteriormente. Os resultados foram obtidos em porcentagem, seguindo as “Regras de Análise de Sementes” (BRASIL, 1992).

- **Peso da Matéria Seca**

Para a determinação do peso da matéria seca as plântulas + radículas foram retiradas do substrato de areia no vigésimo primeiro dia de semeadura e colocadas em estufa a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas. Após este período as amostras foram retiradas da estufa e colocadas para resfriar em um dessecador e em seguida pesadas em balança eletrônica Mettler modelo PC 440, com precisão de 0,01g (ISELY, 1957).

- **Comprimento do Coleóptilo das Plântulas**

A determinação do comprimento do coleóptilo das plântulas (Figura 6) foi feita no sétimo dia de semeadura, simultaneamente com o teste de germinação. Foi determinado o comprimento do coleóptilo das plântulas em centímetros. O comprimento médio do coleóptilo das plântulas foi obtido por média aritmética.



FIGURA 6 – Comprimento do coleóptilo da plântula de milho

3.3. Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado neste trabalho foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial $4 \times 3 \times 3 \times 3 + 4$ (4 variedades x 3 métodos de congelamento x 3 métodos de descongelamento x 3 períodos de armazenagem + 4 testemunhas), com duas repetições.

As análises de variância foram procedidas pelo programa computacional SAS (Statistical Analysis System), versão 5, através do Proc GLM (SAS INSTITUTE, 1985).

As médias dos fatores foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (GOMES, 1982).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Teor de umidade limite para crioconservação -TULC

Na Tabela 2, são mostrados os resultados dos testes de germinação e vigor (1ª contagem) para as 4 variedades de milho (BR-451, BR-201, BR-2121 e CMS-54), e os teores de umidade de 6, 9, 12, 15, 18 e 21% b.u. quando submetidas a 3 técnicas de crioconservação, com a finalidade de determinar-se o teor de umidade limite para sua crioconservação (TULC). De acordo com os resultados obtidos pode-se observar que houveram diferenças significativas entre as variedades e para os diferentes teores de umidade estudados.

Observa-se também, na Tabela 2, que o poder germinativo das sementes foi menos afetado quando estas foram crioconservadas com um teor de umidade em torno de 9% b.u. para as 4 variedades de sementes de milho, e que sementes com teores de umidade inferiores ou superiores a este diminuem a sua viabilidade, exceção se faz para a variedade CMS-54, onde verificou-se que as sementes com teor de umidade de 6% b.u., submetidas a imersão em nitrogênio líquido, apresentam um poder germinativo superior (83%) quando comparada com as sementes com teor de umidade de 9% (71%). Verificou-se ainda neste trabalho que sementes com teor de umidade em torno de 12 % b.u ou acima deste valor, ao entrarem em contato com o nitrogênio líquido (N₂L) sofrem um dano devido ao choque térmico ocorrendo como consequência deste fato trinca nas sementes, diminuindo desta forma a sua viabilidade. Isso indica que para determinados tipos de sementes existe um teor de umidade limite na qual elas toleram a crioconservação. Esse fato também foi comprovado por CHANDEL *et al.* (1995) quando crioconservaram sementes recalcitrantes de chá (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), e jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.) e constataram que o melhor teor de umidade para a crioconservação foi de 14%b.u. e que acima desse valor as sementes perdem sua capacidade germinativa.

Na Tabela 3, observa-se o comportamento da germinação e do vigor (1ª contagem) das sementes de milho para os fatores variedades, método de crioconservação e teores de umidade. Quanto ao fator teor de umidade, verifica-se que para todas as varie-

dades estudadas de sementes de milho o teor de umidade em torno de 9% b.u. foi o que melhor crioconservou as sementes.

TABELA 2 – Alterações dos valores médios de germinação e vigor (1ª contagem) de 4 variedades de milho em função do seu teor de umidade e de técnicas de crioconservação depois de 3 dias de crioconservadas¹

	Imersão N ₂ L		Vapor do N ₂ L		Imersão N ₂ L/-18°C		Testemunha	
BR-451								
Teor de umidade (% b.u.)	Germinação	Vigor	Germinação	Vigor	Germinação	Vigor	Germinação	Vigor
6	61 b B	21 bC	64 bB	21 cC	62 bB	28 bB	82 aA	60 aA
9	80 aA	66 aA	79 aA	70 aA	70 aB	61aB	81 aA	61 aB
12	23 cC	23 bC	22 dC	22 cC	50 cB	28 bB	82 aA	60 aA
15	22 cC	14 cC	44 eB	36 bB	17 dD	1cD	81 aA	61 aA
18	11 dC	1 dB	14 eB	1 dB	10 eC	1cB	80 aA	59 aA
21	9 dC	1 dB	12 eB	1 dB	9 eC	1cB	79 aA	60 aA
BR-201								
Teor de umidade (% b.u.)	Germinação	Vigor	Germinação	Vigor	Germinação	Vigor	Germinação	Vigor
6	89 bA	81 aB	91 aA	85 aB	70 bB	58 bC	92 aA	91 aA
9	94 aA	82 aB	90 aA	84 aB	73 bB	69 aC	92 aA	92 aA
12	69 cD	7 cdB	84 bB	51 cD	77 aC	62 cC	92 aA	91 aA
15	70 cC	55 bC	73 cB	63 bB	63 cD	46 dD	91 aA	89 aA
18	38 dC	4 dC	65 dB	46 dB	9 eD	3 eC	90 aA	89 aA
21	25 eC	8 cC	45 eB	33 eB	19 dD	5 eD	91 aA	90 aA
BR-2121								
Teor de umidade (% b.u.)	Germinação	Vigor	Germinação	Vigor	Germinação	Vigor	Germinação	Vigor
6	83 cC	45 bC	88 aB	48bBC	86 aB	52 bB	95 aA	84 aA
9	97 aA	80 aB	88 aB	71 aC	83 aC	70 aC	96 aA	84 aA
12	89 bB	32 cB	74 bC	1 dC	65 bD	04 dC	96 aA	83 aA
15	65 dC	34 cB	89 aB	35 cB	42 cD	9 cC	97 aA	82 aA
18	25 eC	2 dB	29 cB	3 dB	13 dD	1 dB	95 aA	84 aA
21	20 fB	1 dB	22 dB	1 dB	14 dC	1 dB	97 aA	84 aA
CMS-54								
Teor de umidade (% b.u.)	Germinação	Vigor	Germinação	Vigor	Germinação	Vigor	Germinação	Vigor
6	83 aA	50 aB	77 bC	45 bC	77 bC	47 bC	80 aB	70 aA
9	71 bB	51 aC	81 aA	65 aB	81 aA	70 aA	81 aA	68 aAB
12	70 bB	32 bB	67 cC	1 eC	67 cC	1 cC	80 aA	71 aA
15	33 cC	5 cC	56 dB	24 cB	15 dD	4 cC	82 aA	69 aA
18	26 dB	7 cB	28 eB	8 dB	9 eC	1 cC	79 aA	68 aA
21	23 dB	1 dB	25 eB	1 eB	8 eC	1 cB	80 aA	70 aA

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

TABELA 3 - Análise comparativa da germinação e vigor (1ª contagem) das sementes de milho para os fatores variedades, métodos de crioconservação e teores de umidade¹

Germinação					
Variedades		Métodos de crioconservação		Teor de umidade % b.u.	
BR-451	36,1 d	Imersão em N ₂ L	47,5 b	6	62,4 b
BR-201	53,8 a	Vapor do N ₂ L	50,6 a	9	65,9 a
BR-2121	51,5 b	Imersão em N ₂ L/-18°C	41,4 c	12	53,0 c
CMS-54	44,6 c			15	44,4 d
				18	27,7 e
				21	25,6 f
Vigor					
Variedades		Métodos de crioconservação		Teor de umidade % b.u.	
BR-451	24,7 c	Imersão em N ₂ L	30,9 b	6	44,1 b
BR-201	43,5 a	Vapor do N ₂ L	32,6 a	9	56,9 a
BR-2121	27,1 b	Imersão em N ₂ L/-18°C	26,5 c	12	27,6 d
CMS-54	24,5 c			15	29,9 c
				18	11,6 e
				21	9,6 e

1. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Ainda na Tabela 3, nota-se que dentre as variedades estudadas, a variedade de milho BR-201 foi a que melhor se comportou em relação a sua crioconservação, diferindo, sua germinação e vigor estatisticamente das demais variedades, no entanto a variedade BR-451 foi a mais afetada com a crioconservação, tendo sua germinação e vigor diminuído significativamente quando comparada com as demais variedades, embora se observe que o vigor das sementes das variedades BR-451 e CMS-54 não diferiram estatisticamente entre si.

Constata-se ainda nesta tabela, que o método de crioconservação que menos afetou a germinação e o vigor das sementes, foi o vapor do nitrogênio líquido (N₂L), diferindo estatisticamente, este método, dos demais.

4.2 – Germinação

As análises dos resultados das alterações da germinação e vigor das sementes de milho a um teor de umidade de 9%b.u., quando submetidas a 3 técnicas de crioconservação, 3 técnicas de descongelamento e 3 períodos de armazenagem, são mostradas e discutidas nos itens 4.2 a 4.3.

Os resultados estatísticos da interação entre os 3 fatores (3 técnicas de crioconservação, 3 técnicas de descongelamento e 3 períodos de armazenagem), tanto para a germinação como para o vigor das sementes crioconservadas estão no Apêndice A, nas tabelas 1A a 17A, uma vez que esses resultados, pouco acrescentam ao verificado com as interações entre 2 fatores.

Na Tabela 4, apresenta-se os valores médios de germinação das 4 variedades de sementes de milho estudadas para os diferentes métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem. Embora o banco de germoplasma tenha como principal objetivo a manutenção dos recursos fitogenéticos das sementes armazenadas e/ou crioconservadas, observa-se nesta tabela, que as sementes das variedades BR-201 e CMS-54 quando crioconservadas pelo método de imersão em nitrogênio líquido por 1 hora e posterior colocação em câmaras a -18°C (MC_3) e descongeladas pelos métodos de temperatura ambiente (MD_1) e banho-maria (MD_2), depois de 90 dias, diminuí seu poder germinativo a valores acima de 75%, os quais são aceitáveis no nosso país para a comercialização de sementes. Estes valores de germinação de sementes acima de 75%, também são observados para a variedade BR-201, quando as sementes foram crioconservadas na imersão do nitrogênio líquido (MC_1), e para a variedade BR-2121 quando crioconservadas no vapor do nitrogênio líquido (MC_2) submetidas ao descongelamento pelos métodos de temperatura ambiente (MD_1) e banho-maria (MD_2).

Na tabela 4, constata-se ainda, que as sementes de milho da variedade BR-201 quando crioconservadas no vapor do nitrogênio líquido (MC_2), tem valores dos seus percentuais germinativos depois de 90 dias, superiores a 75% para todos os métodos de descongelamentos estudados, observando-se ainda, que sob esta condição as sementes

TABELA 4 – Valores médios da germinação das 4 variedades de sementes de milho para os diferentes métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem

Período de armazenagem	Testemunha	MC ₁			MC ₂			MC ₃		
		MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃
	80,5	BR - 451								
3 dias		75,5	74,5	75,5	87,0	82,5	85,0	76,5	69,0	75,0
30 dias		65,5	60,0	60,5	61,0	51,0	57,5	51,5	48,5	55,5
90 dias		58,5	50,0	50,5	60,5	49,5	58,5	47,5	49,5	52,5
	92,5	BR - 201								
3 dias		88,0	87,5	92,0	96,0	94,0	97,0	89,0	90,0	87,0
30 dias		78,0	79,0	73,0	84,0	89,0	85,5	83,5	87,5	86,5
90 dias		76,0	76,0	72,0	86,0	82,0	84,0	79,5	80,0	70,5
	95,5	BR - 2121								
3 dias		75,5	77,0	70,5	81,5	85,5	83,5	77,0	78,0	74,5
30 dias		73,0	66,5	76,5	85,0	74,0	74,0	65,5	68,5	73,5
90 dias		71,5	65,5	80,5	81,5	75,0	71,5	66,0	66,0	68,5
	80,5	CMS - 54								
3 dias		70,0	61,0	66,0	73,5	73,5	72,5	78,5	81,5	77,5
30 dias		66,5	60,0	64,0	72,0	71,0	68,0	76,5	79,5	75,0
90 dias		67,5	60,5	64,5	67,5	61,5	68,0	75,0	79,5	74,0

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente

MD₂ - banho maria

MD₃ - microondas

TABELA 5 - Análise de variância da germinação das sementes de milho para diferentes variedades, métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO
Variedade (V)	3	4269,92 **
Método de congelamento (MC)	2	674,68 **
Método de descongelamento (MD)	2	88,14 **
Período de Armazenagem (PA)	2	2711,56 **
V x MC	6	340,01 **
V x MD	6	24,56 **
V x PA	6	514,27 **
MC x PA	4	68,84 **
MC x MD	4	31,51 **
MD x PA	4	18,41 **
V x MC x MD	12	25,28 **
V x MC x PA	12	43,10 **
V x MD x PA	12	23,37 **
MC x MD x PA	8	21,69 **
V x MC x MD x PA	24	16,64 **
Fatorial x testemunha	1	1567,50 **
Entre testemunhas	3	124,50 **
Resíduo	112	5,24
TOTAL	223	

(**) significativo ao nível de 1% de probabilidade

CV% = 3,1

de milho BR-201 foram as que tiveram melhor resultados de todo o experimento realizado.

Na Tabela 5 encontra-se a análise de variância da germinação das sementes de milho para os diferentes métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem. Os resultados desta análise indicam efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para todos os fatores estudados e suas interações.

Na Tabela 6 estão as análises estatísticas isoladas para os fatores variedades, métodos de congelamento, métodos de descongelamento e período de armazenagem.

Contata-se na Tabela 6, que das 4 variedades de sementes de milho, a que melhor se comportou em relação a sua crioconservação, quanto aos seus percentuais germinativos, foi a BR – 201, diferindo estatisticamente das demais ao nível de 5% de probabilidade.

TABELA 6 - Valores médios da germinação das sementes de milho para os fatores: variedades, método de congelamento, método de descongelamento e período de armazenagem ¹

Variedade	Germinação
BR – 451	62,52 d
BR – 201	84,05 a
BR – 2121	74,28 b
CMS – 54	71,13 c

Método de congelamento	Germinação
MC ₁	70,15 c
MC ₂	76,24 a
MC ₃	72,60 b

Método de descongelamento	Germinação
MD ₁	74,24 a
MD ₂	72,64 b
MD ₃	72,11 b

Período de armazenagem	Germinação
03 dias	79,94 a
30 dias	70,72 b
90 dias	68,32 c

1. Nas colunas, médias seguidas da mesma letra, dentro de cada fator, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

MC₁ - imersão em N₂L
 MC₂ - vapor do N₂L
 MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente
 MD₂ - banho-maria
 MD₃ - microondas

Em relação ao fator, método de congelamento, observa-se que as sementes quando crioconservadas em vapor do nitrogênio (N_2L), se conservam melhor que quando submetidas aos métodos de imersão em nitrogênio líquido (N_2L), ou de imersão em nitrogênio líquido (N_2L) por 1 hora e posterior armazenagem em câmaras a $-18\text{ }^\circ\text{C}$, sendo esta conservação em vapor do nitrogênio líquido (N_2L), significativamente diferente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Este fato também foi observado por CHAUDHURY e CHANDEL (1995) quando crioconservaram, com sucesso sementes de cardamon (*Elettaria cardamomun* Maton) apresentando índices de germinação superior a 80%, após um ano de crioconservadas em vapor do nitrogênio líquido ($-150\text{ }^\circ\text{C}$).

Quanto ao fator método de descongelamento, na Tabela 6, observa-se que o descongelamento em temperatura ambiente (MD_1) obteve melhor resultado, contrastando com suposições feitas por PITA VILLAMIL (1997), quando diz que métodos mais rápidos de descongelamento se adaptam melhor a crioconservação, pois métodos lentos, segundo o autor, possibilita o recongelamento das sementes. Pode-se notar ainda, nesta tabela, que os métodos de banho-maria (MD_2) e microondas (MD_3) não diferiram significativamente entre si.

Quanto ao fator período de armazenagem, verifica-se na Tabela 6, que o valor médio da germinação das sementes de milho, tende a decrescer significativamente ao longo do período de armazenagem, o que caracteriza a injúria das sementes, demonstrando desta forma sua sensibilidade ao frio, perdendo assim, sua capacidade germinativa inicial. A perda da germinação devido a sensibilidade das sementes ao frio foi observada por CHANDEL *et al.* (1995), e depende da espécie e do período de crioconservação.

Os valores médios da germinação das sementes de milho antes e após a crioconservação encontram-se na Tabela 7. Nesta tabela, os valores médios da germinação das sementes de milho após a crioconservação, são constituídos pela média geral da germinação das sementes levando-se em consideração os efeitos dos períodos de armazenagem das sementes, método de congelamento e método de descongelamento.

Pode-se notar nesta tabela, que houve um decréscimo significativo da capacidade de germinação, para todas as variedades de milho, quando submetidas a crioconservação. As variedades BR-451 e CMS-54 que inicialmente tinha um índice de germinação de 80,50%, passaram a ter após a crioconservação 62,52 e 71,13% respectivamente, perdendo sua viabilidade em 28,7 e 13,2%, ficando assim estas variedades fora dos padrões técnicos de conservação de sementes. Já a variedade BR-201, que inicialmente tinha um índice de germinação de 92,50%, passou a ter após a crioconservação 84,05%, perdendo sua viabilidade em 10%, fato este também observado por STONAYOVA (1994), quando crioconservou sementes de milho por um período de 10 anos, com redução de sua viabilidade em torno de 10%.

TABELA 7 - Valores médios da germinação das sementes de milho antes e após a crioconservação¹

Variedade	Valores médios antes da crioconservação	Valores médios após a crioconservação	% de Perda
BR - 451	80,50 A	62,52 B	28,7
BR - 201	92,50 A	84,05 B	10,0
BR - 2121	95,50 A	74,28 B	28,6
CMS - 54	80,50 A	71,13 B	13,2

1. Nas linhas, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Os valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x período de armazenagem encontram-se na Tabela 8.

TABELA 8 - Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x período de armazenagem¹

Variedade	Período de armazenagem		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃
BR - 451	77,83 bA	56,78 dB	52,94 cC
BR - 201	91,17 aA	82,89 aB	78,11 aC
BR - 2121	78,11 bA	72,94 bB	71,78 bB
CMS - 54	72,67 cA	70,28 cB	70,44 bB

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

PA₁ - 03 dias

PA₂ - 30 dias

PA₃ - 90 dias

Na Tabela 8, podemos observar que a variedade BR-201 foi a que melhor se comportou durante o período de armazenagem das sementes crioconservadas, mas tanto esta variedade quanto a variedade BR-451 apresentaram uma perda do poder germinativo ao longo do período de armazenagem, enquanto que as variedades BR-2121 e CMS-54 tendem a se estabilizar a partir do trigésimo dia de armazenagem por crioconservação.

Os valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento, encontram-se na Tabela 9. Consta-se nesta tabela, que para os três métodos de congelamento estudados, a variedade BR - 201 foi a que teve o percentual de germinação mais elevado, indicando que das 4 variedades esta se comporta melhor ao armazenamento à baixas temperaturas. Analisando-se os métodos de congelamento, ainda nesta tabela, nota-se que o melhor método para conservar a viabilidade das variedades de milho BR-201, BR-451, BR-2121 foi o vapor do nitrogênio líquido (N₂L), enquanto que para a variedade CMS-54 a imersão em N₂L /-18°C, apresentou melhor resultado.

TABELA 9 - Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento ¹

Variedade	Método de congelamento		
	MC ₁	MC ₂	MC ₃
BR - 451	63,39 cB	65,78 dA	58,39 dC
BR - 201	79,83 aC	88,61 aA	83,72 aB
BR - 2121	72,94 bB	79,05 bA	70,83 cC
CMS - 54	64,44 cC	71,50 cB	77,44 bA

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

Os valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x método de descongelamento encontram-se na Tabela 10. Analisando esta tabela, nas colunas, podemos observar que entre as variedades de milho estudadas, a BR-201 foi a menos afetada no seu percentual de germinação pelos três métodos de desconge-

lamento, quer seja pelo método lento (temperatura ambiente) quer pelos métodos rápidos (banho-maria e microondas).

TABELA 10 - Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedades x métodos de descongelamento¹

Variedades	Método de descongelamento		
	MD ₁	MD ₂	MD ₃
BR - 451	64,83 dA	61,61 cB	61,11 dB
BR - 201	84,44 aA	85,17 aA	82,55 aB
BR - 2121	75,17 bA	72,89 bB	74,78 bA
CMS - 54	72,50 cA	70,89 bAB	70,00 cB

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MD₁ - temperatura ambiente

MD₂ - banho-maria

MD₃ - microondas

Nota-se também na Tabela 10, que para a variedade BR-451, o método de descongelamento à temperatura ambiente (MD₁) obteve um resultado germinativo melhor, enquanto que para a variedade BR-201 não houve diferença significativa entre os métodos de descongelamento à temperatura ambiente (MD₁) e o banho-maria (MD₂). Quanto a variedade BR - 2121, as sementes de milho ao serem descongeladas à temperatura ambiente (MD₁) e com o microondas (MD₃) não diferiram estatisticamente entre si. No entanto, para a variedade CMS-54, a germinação dessas sementes foi mais afetada pelo método de descongelamento por microondas, indicando que os métodos de descongelamento rápido, necessitam ser melhor estudados para poderem ser adotados como métodos eficientes de descongelamento de sementes crioconservadas.

Os valores médios da germinação das sementes de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento estão na Tabela 11. Analisando-se esta tabela nas colunas, podemos constatar que o método de congelamento utilizando o vapor do nitrogênio líquido (N₂L), foi o método de crioconservação que permitiu que as sementes de milho fossem menos afetada no seu poder germinativo. No entanto, quando se analisa a interação dos métodos de congelamento com os métodos de descongelamento, nas linhas, verifica-se que quando imersas em nitrogênio líquido, todos os méto-

dos de descongelamento apresentam diferenças significativas entre si no percentual germinativo das sementes de milho, denotando que o descongelamento é um ponto importante de estudo quando se quer crioconservar sementes em nitrogênio líquido. Alguns fatos importante são encontrados ainda na Tabela 11, pois observa-se que o método de congelamento utilizando o vapor do nitrogênio líquido e o método de imersão das sementes em nitrogênio líquido, por 1 hora e posterior armazenagem a -18°C , em câmaras frigoríficas, indicam que os métodos de descongelamento podem não afetar a germinação das sementes significativamente. Este fato é verificado quando se compara o percentual de germinação de sementes descongeladas em banho-maria e microondas, quando as sementes são congeladas em vapor do nitrogênio líquido. Da mesma forma, este fato também ocorre, quando se compara o descongelamento à temperatura ambiente com o microondas quando se utiliza o congelamento MC_3 (imersão em $\text{N}_2\text{L} / -18^{\circ}\text{C}$).

TABELA 11 - Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação métodos de congelamento x métodos de descongelamento¹

Método de congelamento	Método de descongelamento		
	MD_1	MD_2	MD_3
MC_1	72,12 bA	68,29 bC	70,04 bB
MC_2	78,42 aA	75,42 aB	74,87 aB
MC_3	72,17 bB	74,21 aA	71,42 bB

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC_1 - imersão em N_2L
 MC_2 - vapor do N_2L
 MC_3 - imersão em $\text{N}_2\text{L} / -18^{\circ}\text{C}$

MD_1 - temperatura ambiente
 MD_2 - banho-maria
 MD_3 - microondas

Os valores médios da germinação das sementes de milho para a interação método de congelamento x período de armazenagem, são mostrados na Tabela 12. Nesta tabela, observa-se que o poder germinativo das sementes de milho é menos afetado quando as sementes são crioconservadas no vapor do nitrogênio líquido (N_2L), por conseguinte, entre os métodos de congelamento estudados este é o que deve ser o indicado para a crioconservação das sementes de milho.

TABELA 12 – Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação método de congelamento x período de armazenagem ¹

Método de congelamento	Período de armazenagem		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃
MC ₁	76,08 cA	68,54 cB	65,83 bC
MC ₂	84,29 aA	72,67 aB	71,50 aB
MC ₃	79,46 bA	70,96 bB	67,37 bC

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L

PA₁ - 03 dias

MC₂ - vapor do N₂L

PA₂ - 30 dias

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

PA₃ - 90 dias

Na Tabela 12, analisando-se os três métodos de congelamento, nas linhas, observa-se que existem perdas significativas do poder germinativo ao longo do período de armazenagem, para todos os métodos de congelamento, exceto para as sementes de milho crioconservadas no vapor do nitrogênio líquido (N₂L), que tende a manter a sua germinação a partir do trigésimo dia de crioconservação. Estes fatos caracterizam a injúria das sementes de milho causadas pela crioconservação, no entanto demonstra que estas sementes podem ser crioconservadas, com relativa eficiência, se estudados alguns parâmetros como; teor de umidade mais adequado; métodos de congelamento e métodos de descongelamento.

Na Tabela 13, são apresentados os valores médios da germinação das sementes de milho para a interação método de descongelamento x período de armazenagem. Analisando-se esta tabela, nas colunas, pode-se notar que a germinação das sementes de milho não diferem estatisticamente entre si, quando se comparam os dois métodos de descongelamento considerados rápidos (banho-maria e microondas) para todos os períodos de armazenagem estudados. Consta-se ainda, que as sementes de milho quando são descongeladas à temperatura ambiente, o seu percentual de germinação é menos afetado, embora, em alguns casos, essas diferenças do percentual de germinação não sejam significativas quando comparados com o descongelamento das sementes feito em “banho-maria”.

TABELA 13 – Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação método de descongelamento x período de armazenagem¹

Método de descongelamento	Período de armazenagem		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃
MD ₁	80,67 aA	71,83 aB	70,21 aC
MD ₂	80,37 abA	70,71 abB	66,83 bC
MD ₃	78,79 bA	69,62 bB	67,92 bC

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MD₁ - temperatura ambiente

MD₂ - banho-maria

MD₃ - microondas

PA₁ - 03 dias

PA₂ - 30 dias

PA₃ - 90 dias

Na Tabela 13, pode-se ainda observar, que a germinação das sementes de milho diminuem durante o período de armazenagem, para todos os métodos de descongelamento.

4.3 Vigor

Nas Tabelas 14, 15 e 16 encontram-se, respectivamente, os valores médios do vigor – 1^a contagem; vigor – comprimento do coleóptilo da plântula e vigor – matéria seca das plântulas de milho para os diferentes métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem. Analisando-se estas tabelas durante o período de armazenagem por 90 dias e considerando-se os três métodos de descongelamento, é possível observar que os melhores índices de vigor, durante os 3 testes estudados, foram obtidos quando as sementes foram congeladas no vapor do nitrogênio líquido (MC₂), para as variedades de milho BR-451, BR-201 e BR-2121, enquanto que para a variedade CMS-54 os melhores resultados foram observados quando as sementes foram congeladas pelo método de imersão de nitrogênio líquido por 1 hora e posterior colocação em câmaras a -18°C (MC₃).

A análise de variância do vigor – 1^a contagem; vigor – comprimento do coleóptilo da plântula e vigor – matéria seca das plântulas, são mostrados nas tabelas 17, 18 e 19, respectivamente.

TABELA 14 – Valores médios do vigor – 1ª contagem das 4 variedades de sementes de milho para os diferentes métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem

Período de armazenagem	Testemunha	MC ₁			MC ₂			MC ₃		
		MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃
	64,5	BR - 451								
3 dias		37,0	38,0	33,5	52,5	54,5	54,0	47,0	44,5	42,5
30 dias		36,5	35,5	33,0	41,0	36,0	43,5	37,5	31,5	38,5
90 dias		37,0	35,0	33,0	40,0	36,0	43,0	35,0	31,5	37,5
	86,0	BR - 201								
3 dias		56,0	50,0	53,5	84,0	73,5	72,5	56,5	41,5	50,0
30 dias		62,5	59,0	57,0	75,5	73,5	68,0	60,0	62,5	67,0
90 dias		61,0	56,0	57,5	72,5	70,5	68,5	61,0	62,0	66,5
	84,5	BR - 2121								
3 dias		60,5	62,5	49,0	77,0	71,0	76,0	63,0	59,0	66,5
30 dias		59,5	65,0	46,5	75,0	69,5	69,5	48,0	58,5	50,5
90 dias		60,5	65,0	46,0	73,5	70,0	69,0	50,0	55,0	49,0
	71,0	CMS - 54								
3 dias		67,5	53,0	56,5	70,0	69,0	69,0	73,5	77,5	73,0
30 dias		66,0	54,0	54,5	69,5	62,5	68,0	71,0	74,0	72,5
90 dias		64,0	58,0	56,0	47,8	42,3	42,0	70,0	73,0	72,5

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente

MD₂ - banho maria

MD₃ - microondas

TABELA 15 - Valores médios do vigor - comprimento do coleóptilo da plântula das 4 variedades de milho para os diferentes métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem

Período de armazenagem	Testemunha	MC ₁			MC ₂			MC ₃		
		MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃
	4,1	BR - 451								
3 dias		2,9	3,2	2,7	4,8	4,5	4,5	3,1	3,2	3,5
30 dias		2,8	2,8	3,0	3,0	3,1	3,2	2,1	2,0	2,4
90 dias		2,2	2,4	2,1	3,0	3,1	3,0	2,0	2,1	2,2
	5,2	BR - 201								
3 dias		4,8	4,5	4,5	5,4	4,8	5,2	3,8	3,5	3,2
30 dias		2,6	2,6	2,8	3,1	3,4	3,2	3,0	2,7	2,9
90 dias		2,8	2,3	2,7	3,1	3,5	3,3	2,9	2,5	2,9
	3,9	BR - 2121								
3 dias		3,0	3,3	3,2	4,0	3,7	3,9	3,0	3,0	3,2
30 dias		2,1	2,1	2,2	2,6	2,4	2,5	2,0	2,0	2,1
90 dias		2,2	2,0	2,3	2,4	2,5	2,5	2,1	2,2	2,1
	3,7	CMS - 54								
3 dias		3,0	3,2	3,1	3,3	3,2	3,4	3,4	3,6	3,6
30 dias		3,1	3,0	3,0	3,2	3,0	3,3	3,0	3,4	3,6
90 dias		3,2	3,1	3,4	3,5	3,4	3,6	3,4	3,6	3,5

MC₁ - imersão em N₂L
 MC₂ - vapor do N₂L
 MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente
 MD₂ - banho maria
 MD₃ - microondas

TABELA 16 – Valores médios do vigor – matéria seca das 4 variedades de sementes de milho para os diferentes métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem

Período de armazenagem	Testemunha	MC ₁			MC ₂			MC ₃		
		MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃
	64,5	BR - 451								
3 dias		41,80	59,50	50,70	79,45	71,45	76,25	57,75	53,35	65,80
30 dias		40,10	46,55	42,55	41,00	44,90	44,10	29,20	25,90	28,55
90 dias		47,50	45,75	39,50	42,85	40,95	42,95	27,70	26,75	25,35
	85,6	BR - 201								
3 dias		60,35	61,05	60,50	101,30	67,30	86,00	65,10	53,25	46,17
30 dias		31,80	32,70	34,30	32,75	38,30	39,00	46,20	40,40	56,30
90 dias		34,20	32,30	34,20	30,15	38,90	36,45	40,85	40,60	57,35
	67,7	BR - 2121								
3 dias		37,80	57,35	43,70	65,55	52,20	53,00	39,50	53,60	39,55
30 dias		25,80	29,50	32,75	43,00	28,50	28,35	20,10	24,85	25,40
90 dias		28,30	29,90	33,70	36,25	27,25	30,30	20,55	23,85	25,10
	62,0	CMS - 54								
3 dias		43,70	43,55	49,15	57,50	44,25	57,35	65,15	82,55	74,15
30 dias		48,35	43,65	37,35	48,80	40,75	59,25	42,60	72,80	61,15
90 dias		43,70	43,55	49,15	57,50	44,25	57,35	43,10	69,30	61,70

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente

MD₂ - banho maria

MD₃ - microondas

TABELA 17 – Análise e variância do vigor – 1ª contagem das sementes de milho para diferentes variedades, métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO
Variedade (V)	3	8122,50 **
Método de congelamento (MC)	2	2762,84 **
Método de descongelamento (MD)	2	184,17 **
Período de armazenagem (PA)	2	164,00 **
V x MC	6	504,72 **
V x MD	6	68,33 **
V x PA	6	181,18 **
MC x PA	4	145,94 **
MC x MD	4	112,65 **
MD x PA	4	14,30 ns
V x MC x MD	12	66,49 **
V x MC x PA	12	74,02 **
V x MD x PA	12	30,06 **
MC x MD x PA	8	11,77 ns
V x MC x MD x PA	24	7,19 ns
Fatorial x testemunha	1	2761,83 **
Entre testemunhas	3	219,00 **
Resíduo	112	10,96
TOTAL	223	

(**) significativo ao nível de 1% de probabilidade

CV% = 5,68

ns = não significativo

TABELA 18 – Análise de variância do vigor – comprimento do coleóptilo das plântulas de milho para diferentes variedades, métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO
Variedade (V)	3	14,82 **
Método de congelamento (MC)	2	11,12 **
Método de descongelamento (MD)	2	0,78 **
Período de armazenagem (PA)	2	17,28 **
V x MC	6	2,87 **
V x MD	6	0,41 **
V x PA	6	12,98 **
MC x PA	4	1,00 **
MC x MD	4	1,07 **
MD x PA	4	0,09 **
V x MC x MD	12	1,09 **
V x MC x PA	12	2,25 **
V x MD x PA	12	0,40 **
MC x MD x PA	8	0,68 **
V x MC x MD x PA	24	0,52 **
Fatorial x testemunha	1	26,63 **
Entre testemunhas	3	1,99 **
Resíduo	432	0,02
TOTAL	543	

(**) significativo ao nível de 1% de probabilidade

CV% = 4,82

ns = não significativo

TABELA 19 – Análise de variância do vigor – matéria seca das plântulas de milho para diferentes variedades, métodos de congelamento, métodos de descongelamento e períodos de armazenagem

FONTE DE VARIAÇÃO	GL	QUADRADO MÉDIO
Variedade (V)	3	2929,65 **
Método de congelamento (MC)	2	933,13 **
Método de descongelamento (MD)	2	74,33 ns
Período de armazenagem (PA)	2	9362,08 **
V x MC	6	955,23 **
V x MD	6	82,87 **
V x PA	6	486,62 **
MC x PA	4	292,60 **
MC x MD	4	397,38 **
MD x PA	4	31,88 ns
V x MC x MD	12	196,42 **
V x MC x PA	12	321,58 **
V x MD x PA	12	80,06 **
MC x MD x PA	8	112,04 **
V x MC x MD x PA	24	37,20 ns
Fatorial x testemunha	1	4617,56 **
Entre testemunhas	3	228,28 **
Resíduo	112	34,07
TOTAL	223	

(**) significativo ao nível de 1% de probabilidade

CV% = 12,59

ns = não significativo

Analisando-se as análises de variância, nas tabelas 17,18 e 19, verifica-se que houveram efeitos significativos para todos os fatores e suas interações, exceto para as interações método de descongelamento x período de armazenagem, método de congelamento x método de descongelamento x período de armazenagem e variedade x método de congelamento x método de descongelamento x período de armazenagem, na tabela 17; e na tabela 19, para os método de descongelamento e as interações entres os fatores método de descongelamento x período de armazenagem e variedade x método de congelamento x método de descongelamento x período de armazenagem.

Os valores médios do vigor das sementes de milho para os fatores: variedades, métodos de congelamento, métodos de descongelamento e período de armazenagem, encontram-se na Tabela 20.

TABELA 20 – Valores médios do vigor das sementes de milho para os fatores: variedade, método de congelamento, método de descongelamento e período de armazenagem

FATORES	VIGOR		
	1ª contagem	Comp. do coleóptilo	Matéria seca
Variedade			
BR – 451	39,46 c	3,02 b	45,87 b
BR – 201	62,89 b	3,34 a	47,87 b
BR – 2121	61,65 b	2,66 c	35,37 c
CMS – 54	66,35 a	3,31 a	52,87 a
Método de congelamento			
MC ₁	52,08 c	2,95 b	41,99 c
MC ₂	64,29 a	3,36 a	49,18 a
MC ₃	56,36 b	2,91 c	45,31 b
Método de descongelamento			
MD ₁	59,40 a	3,03 b	44,63 a
MD ₂	56,92 b	3,04 b	45,25 a
MD ₃	56,42 b	3,15 a	46,61 a
Período de armazenagem			
3 dias	59,29 a	2,98 b	58,66 a
30 dias	57,00 b	2,82 c	39,07 b
90 dias	56,44 b	3,42 a	38,75 b

Nas colunas, médias seguidas da mesma letra dentro de cada fator não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente

MD₂ - banho-maria

MD₃ - microondas

Para o fator variedade, na Tabela 20, observa-se que a variedade CMS-54 comportou-se melhor quanto a sua crioconservação, pois os testes de vigor 1ª contagem, comprimento do coleóptilo da plântula e matéria seca das plântulas são significativamente superiores aos encontrados para as outras variedades, exceção se faz quando se comparam as variedades BR-201 e CMS-54, para o teste de vigor feito com o comprimento do coleóptilo da plântula.

Quanto ao método de congelamento, confirma-se o que ocorreu no teste de germinação, isto é, o vigor das sementes de milho se crioconservam melhor no vapor do nitrogênio líquido (N_2L). Ainda na Tabela 20, observa-se, quanto as técnicas de descongelamento, que os vários testes de vigor feitos para as sementes de milho não permite muitas afirmações, pois o vigor das sementes usando o método da 1ª contagem demonstra ser melhor quando as sementes são descongeladas à temperatura ambiente (MD_1), no entanto, quando o vigor das sementes é testado pelo método do comprimento do coleóptilo da plântula, o descongelamento das sementes feito por microondas (MD_3) é significativamente superior aos outros dois métodos, e por fim, quando o vigor da sementes é testado pelo peso da matéria seca, as sementes podem ser descongeladas por qualquer um dos três métodos pois, não existem diferenças significativas entre eles. Isto vem confirmar as afirmações feitas por TOLEDO e MARCOS FILHO (1977) que dizem que os métodos de determinação do vigor, ainda hoje, são questionáveis quanto ao sucesso de poder expressar o real vigor das sementes.

Quanto ao fator período de armazenagem, ainda nesta tabela, observa-se que para os testes de vigor, feitos pela 1ª contagem e matéria seca, houve uma manutenção do vigor das sementes a partir do trigésimo dia de crioconservação, no entanto, quando as sementes foram submetidas ao teste de vigor, feito pelo comprimento do coleóptilo das plântulas, constatou-se um aumento significativo em seu vigor, após 90 dias de crioconservadas.

Os valores médios do vigor das sementes de milho antes e após a crioconservação, encontram-se na Tabela 21. Pode-se notar, nesta tabela, que houve um decréscimo significativo do vigor (1ª contagem, matéria seca e comprimento do coleóptilo da plântula) para todas as variedades de milho estudadas, quando submetidas a crioconserva-

ção. Este resultado também acompanha os obtidos no teste de germinação. Verifica-se também, que os percentuais de diminuição do vigor, após a criopreservação, são bem mais acentuados quando comparados com os obtidos na germinação.

TABELA 21 – Valores médios do vigor das sementes de milho antes e após a criopreservação¹

1ª contagem			
Variedade	Valores médios antes da criopreservação	Valores médios após a criopreservação	% de Perdas
BR – 451	64,50 A	39,42 B	63,6
BR – 201	86,00 A	62,89 B	36,8
BR – 2121	84,50 A	61,65 B	37,1
CMS – 54	71,00 A	66,35 B	7,0
Matéria Seca			
Variedade	Valores médios antes da criopreservação	Valores médios após a criopreservação	% de Perdas
BR – 451	64,45 A	45,87 B	40,5
BR – 201	85,60 A	47,87 B	78,8
BR – 2121	67,75 A	35,37 B	91,5
CMS – 54	62,05 A	52,87 B	17,4
Comprimento do coleóptilo			
Variedade	Valores médios antes da criopreservação	Valores médios após a criopreservação	% de Perdas
BR – 451	4,14 A	3,02 B	37,1
BR – 201	5,16 A	3,34 B	54,5
BR – 2121	3,98 A	2,62 B	52,0
CMS – 54	3,72 A	3,31 B	12,4

1. Nas linhas, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Na Tabela 22, encontram-se os valores médios do vigor das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento. Nesta tabela verifica-se, nas linhas, que para todos os testes de vigor estudados, as variedades BR-451, BR-201 e BR-2121, se criocomportam melhor quando armazenadas em vapor do nitrogênio líquido (N₂L), enquanto que para a variedade CMS-54 a imersão em N₂L/ - 18°C foi o método de congelamento que obteve melhor resultado.

Analisando a Tabela 22, nas colunas, observa-se que as sementes de milho BR-201 tem um vigor superior as demais variedades estudadas, quando analisadas pelos três métodos de determinação de vigor, para os dois primeiros métodos de congelamento das sementes que são: a) imersão no nitrogênio líquido (N₂L) e b) sementes submetidas ao

vapor do nitrogênio líquido (N_2L), embora, em alguns casos, estas diferenças não sejam significativas. No entanto, quando a variedade de milho CMS-54 é criopreservada em imersão no nitrogênio líquido por 1 (uma) hora e posterior conservação em câmaras a $-18^\circ C$, esta variedade, apresenta um vigor superior as demais variedades estudadas, para todos os testes de vigor determinado.

TABELA 22 – Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento¹

1ª contagem			
Variedade	MC ₁	MC ₂	MC ₃
BR - 451	35,39 bC	44,50 cA	38,39 dB
BR - 201	56,94 aB	73,17 aA	58,55 bB
BR - 2121	57,17 aB	72,28 aA	55,50 cB
CMS - 54	58,83 aC	67,22 bB	73,00 aA
Matéria Seca			
Variedade	MC ₁	MC ₂	MC ₃
BR - 451	46,02 aB	53,77 aA	37,82 cC
BR - 201	42,36 aB	51,68 aA	49,58 bA
BR - 2121	35,37 bB	40,49 bA	30,25 dC
CMS - 54	44,21 aC	50,80 aB	63,61 aA
Comprimento do coleóptilo			
Variedade	MC ₁	MC ₂	MC ₃
BR - 451	2,68 cC	3,58 aA	2,81 cB
BR - 201	3,36 aB	3,70 aA	2,95 bC
BR - 2121	2,61 cB	2,83 cA	2,43 dC
CMS - 54	3,15 bC	3,33 bB	3,45 aA

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N_2L

MC₂ - vapor do N_2L

MC₃ - imersão em $N_2L / -18^\circ C$

Na Tabela 23, estão os valores médios do vigor das sementes de milho para a interação variedade x método de descongelamento. Analisando-se esta tabela nas linhas, constata-se que, para a variedade BR-451, os testes de vigor – 1ª contagem e matéria seca, há ausência de efeitos significativos entre as técnicas de descongelamento estudadas. Contudo, ao analisar-se o vigor das sementes de milho, pelo método de medição do comprimento do coleóptilo das plântulas, para as variedades BR-201, BR-2121 e CMS-54, verifica-se que o vigor não difere estatisticamente ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey, para todos os métodos estudados de descongelamento das semen-

tes. Desta tabela é possível ainda extrair que, de uma maneira geral, todas as variedades de sementes de milho estudadas, quando são submetidas ao teste de vigor de 1ª contagem, apresentam um valor superior (vigor) aos demais métodos estudados, quando se utiliza o método de descongelamento lento, embora em alguns casos, estas diferenças não sejam significativamente diferentes. Este fato também ocorre para os teste de vigor-comprimento do coleóptilo da plântula e vigor - matéria seca, quando se utiliza o método de descongelamento com microondas. Mais uma vez estes dados vêm confirmar que, dependendo do método utilizado para se obter o vigor, os indicativos de qual método de descongelamento deve-se usar, é conflitante, necessitando-se desta forma, definir bem que método o pesquisador entende que é o mais adequado para expressar o vigor das sementes, o que segundo POPINIGIS (1985) é um conceito ainda questionável e palco de muitas polêmicas.

TABELA 23 – Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação variedade x método de descongelamento¹

1ª contagem			
Variedade	MD ₁	MD ₂	MD ₃
BR - 451	40,39 cA	38,05 cA	39,83 dA
BR - 201	65,44 bA	60,94 bB	62,28 bB
BR - 2121	63,00 bA	63,94 aA	58,00 cB
CMS - 54	68,78 aA	64,72 aB	65,55 aB
Matéria Seca			
Variedade	MD ₁	MD ₂	MD ₃
BR - 451	45,26 aA	46,12 bA	46,22 bA
BR - 201	48,63 abA	44,96 bB	50,03 bA
BR - 2121	35,23 aB	36,28 cA	34,60 cA
CMS - 54	49,39 aB	53,63 aAB	55,60 aA
Comprimento do coleóptilo			
Variedade	MD ₁	MD ₂	MD ₃
BR - 451	2,87 bB	2,94 bB	3,25 aA
BR - 201	3,36 aA	3,32 aA	3,33 aA
BR - 2121	2,62 cA	2,62 cA	2,64 bA
CMS - 54	3,27 aA	3,30 aA	3,37 aA

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MD₁ - temperatura ambiente
 MD₂ - banho-maria
 MD₃ - microondas

Na Tabela 23 analisando-se as colunas, verifica-se que as sementes da variedade CMS-54 tem um vigor maior para todos os três métodos estabelecidos, independentemente dos métodos de descongelamento estudados, exceção se faz para a variedade BR-201 quando determinado o vigor pelo comprimento do coleóptilo da plântula para os métodos de descongelamento a temperatura ambiente e banho-maria, embora estes valores superiores da variedade BR-201 não difiram estatisticamente da variedade CMS-54 ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Os valores médios do vigor das sementes de milho para a interação variedade x período de armazenagem, encontram-se na Tabela 24.

TABELA 24 – Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação variedade x período de armazenagem ¹

1ª contagem			
Variedade	PA ₁	PA ₂	PA ₃
BR - 451	44,83 cA	37,00 cB	36,44 cB
BR - 201	59,72 bB	65,00 aA	63,94 aA
BR - 2121	64,94 aA	60,22 bA	59,78 bA
CMS - 54	67,67 aA	65,78 aA	65,61 aA
Matéria Seca			
Variedade	PA ₁	PA ₂	PA ₃
BR - 451	61,78 abA	38,12 bB	37,70 bB
BR - 201	66,22 aA	39,07 bB	38,33 bB
BR - 2121	49,16 cA	28,59 cB	28,35 cB
CMS - 54	57,48 bA	50,52 aB	50,62 aB
Comprimento do coleóptilo			
Variedade	PA ₁	PA ₂	PA ₃
BR - 451	3,60 aA	2,71 cB	2,75 cB
BR - 201	2,92 cB	2,89 bB	4,20 aA
BR - 2121	2,24 dB	2,27 dB	3,37 bA
CMS - 54	3,17 bB	3,41 aA	3,35 bA

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

PA₁ - 03 dias
 PA₂ - 30 dias
 PA₃ - 90 dias

Na Tabela 24, observa-se, nas linhas, que para a 1ª contagem do teste de germinação, feitos para avaliar o vigor das sementes, as variedades BR-201, BR-2121 e CMS-54 preservam o seu vigor durante o período de armazenagem de 90 dias, confir-

mando o que foi dito por PITA VILLAMIL (1997), ao afirmar que após um período de 3 dias, se as sementes se mostram crioconserváveis estas podem ter um período de armazenagem considerado indefinido. No entanto, há um decréscimo do vigor da variedade de BR-451 o qual se mantém após 30 dias de crioconservadas. Este fato também se verifica, para todas as variedades, quando se utiliza a determinação do vigor das sementes pelo método de determinação do peso de matéria seca das plântulas. Em contraposição, exceto para a variedade BR-451, ocorre o processo inverso, quando se utiliza a leitura do comprimento do coleóptilo das plântulas como método de determinação do vigor da sementes de milho. Este comportamento indica que um teste como este também é importante na avaliação do vigor das sementes crioconservadas, concordando com VIEIRA e CARVALHO (1994) quando diz que plântulas, com grandes valores de altura, são consideradas vigorosas.

Na Tabela 25, encontram-se os valores médios do vigor das sementes de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento.

TABELA 25 – Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento¹

1ª contagem			
Método de congelamento	MD ₁	MD ₂	MD ₃
MC ₁	55,67 bA	52,58 cB	48,00 cC
MC ₂	66,50 aA	62,29 aB	64,08 aB
MC ₃	56,04 bA	55,87 bA	57,17 bA
Matéria Seca			
Método de congelamento	MD ₁	MD ₂	MD ₃
MC ₁	40,62 bA	43,62 aA	41,72 bA
MC ₂	51,75 aA	44,85 aB	50,94 aA
MC ₃	41,50 bB	47,27 aA	47,17 aA
Comprimento do coleóptilo			
Método de congelamento	MD ₁	MD ₂	MD ₃
MC ₁	2,91 bB	2,86 bB	3,08 bA
MC ₂	3,36 aAB	3,45 aA	3,27 aB
MC ₃	2,82 bB	2,82 bB	3,10 bA

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L
 MC₂ - vapor do N₂L
 MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente
 MD₂ - banho-maria
 MD₃ - microondas

Analisando-se a Tabela 25 nas colunas, constata-se que o vigor das sementes foi mantido quando as sementes foram crioconservadas no vapor do nitrogênio líquido (N_2L), para as 3 técnicas de descongelamento. Observa-se ainda nas linhas desta tabela, que para o teste de vigor feito pela 1ª contagem, o método de descongelamento lento (temperatura ambiente) se mostra mais eficiente para todos os tipos de congelamentos estudados, exceção se faz para o método de imersão em nitrogênio líquido por 1 hora e posteriormente em câmaras a $-18^\circ C$ (MC_3), onde não se observaram diferenças significativas entre os 3 métodos de descongelamento estudados. Para o teste de vigor das sementes realizado pela determinação do peso da matéria seca, o método de descongelamento por microondas é o que se apresenta como o mais eficiente para os três métodos de congelamento, embora, em alguns casos, não existam diferenças significativas entre os métodos de descongelamento.

Os valores médios do vigor das sementes de milho para a interação método de congelamento x período de armazenagem encontram-se na Tabela 26.

Analisando nas colunas, na Tabela 26, pode-se notar que, de um modo geral, o vapor do nitrogênio líquido (N_2L) crioconservou melhor as sementes, pois para todos os teste de vigor das sementes estudados, este método de crioconervação, é o que mantém o vigor das sementes mais elevado.

Ao se fazer a análise da Tabela 26, nas linhas, constata-se que o vigor das sementes obtidos pelos testes de 1ª contagem e matéria seca, tendem a diminuir significativamente após o período de 3 dias de crioconservadas, mantendo o seu vigor a partir deste período, embora se observe uma exceção no método de congelamento por imersão em nitrogênio líquido, onde não se verificaram diferenças significativas durante o período de 90 dias de armazenamento. Observa-se ainda nesta tabela, que o vigor das sementes de milho, quando é expresso pela determinação do comprimento do coleóptilo das plântulas, tende a crescer quando esta atinge os 90 dias de crioconservadas.

TABELA 26 – Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação método de congelamento x período de armazenagem ¹

1ª contagem			
Método de congelamento	PA ₁	PA ₂	PA ₃
MC ₁	51,42 cA	52,42 cA	52,42 cA
MC ₂	68,58 aA	62,62 aB	61,67 aB
MC ₃	57,87 bA	55,96 bAB	55,25 bB
Matéria Seca			
Método de congelamento	PA ₁	PA ₂	PA ₃
MC ₁	50,76 cA	37,08 aB	38,12 aB
MC ₂	67,22 aA	40,72 aB	39,61 aB
MC ₃	58,00 bA	39,42 aB	38,52 aB
Comprimento do coleóptilo			
Método de congelamento	PA ₁	PA ₂	PA ₃
MC ₁	2,69 cB	2,72 bB	3,44 bA
MC ₂	3,37 aB	3,09 aC	3,62 aA
MC ₃	2,88 bB	2,65 bC	3,20 cA

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L

PA₁ - 03 dias

MC₂ - vapor do N₂L

PA₂ - 30 dias

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

PA₃ - 90 dias

Na Tabela 27, encontram-se os valores médios do vigor das sementes de milho para a interação método de descongelamento x período de armazenagem. Nesta tabela, apenas os valores do vigor do milho, estabelecido pela média do comprimento do coleóptilo das plântulas é apresentado, pois os outros dois métodos de determinação do vigor do milho não foram significativos, como pode ser verificado nas Tabela 17 e 19 das análises de variância.

Observa-se nas colunas da Tabela 27, que para o primeiro período de armazenagem (PA₁), não houve diferença significativa entre os métodos de descongelamento, enquanto que para os demais períodos de armazenagem, o método de descongelamento rápido (microondas), se mostrou mais eficiente, embora não exista diferença significativa entre os métodos de descongelamento rápidos, banho-maria e microondas, aos 90 dias das sementes crioconservadas (PA₃). Analisando-se esta tabela nas linhas, nota-se, também, que o teste de vigor feito a partir do comprimento do coleóptilo da plântula,

indica uma tendência de crescimento aos 90 dias de crioconservadas. Este fato, nos leva novamente a indagar qual método realmente expressa o vigor das plântulas.

TABELA 27 – Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação método de descongelamento x período de armazenagem ¹

Comprimento do coleóptilo			
Método de descongelamento	PA ₁	PA ₂	PA ₃
MD ₁	2,96 aB	2,79 bC	3,33 bA
MD ₂	2,97 aB	2,75 bC	3,41 abA
MD ₃	3,02 aB	2,91 aC	3,51 aA

1. Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MD₁ - temperatura ambiente
 MD₂ - banho-maria
 MD₃ - microondas

PA₁ - 03 dias
 PA₂ - 30 dias
 PA₃ - 90 dias

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que:

1. Ao se estudar a determinação do teor de umidade limite para a criopreservação - TULC, durante 3 dias, podemos afirmar que:
 - a) Para as variedades de sementes de milho BR-451, BR-201, BR-2121, CMS-54, o teor de umidade limite para a criopreservação está em torno de 9% b.u.;
 - b) A germinação e o vigor das sementes de milho foi menos afetada quando submetidas ao vapor do nitrogênio líquido (N₂L);
 - c) Dentre as variedades estudadas a BR-201 foi a que teve uma menor perda de sua qualidade fisiológica quando criopreservada;
2. As variedades de sementes de milho BR-451, BR-201, BR-2121 e CMS-54 quando são comparadas aos valores médios antes da criopreservação e após a criopreservação, levando-se em consideração os efeitos dos períodos de armazenagem, métodos de congelamento e métodos de descongelamento, diminuem sua viabilidade em 28,7%; 10,0%; 28,6% e 13,2% respectivamente;
3. As variedades de sementes de milho BR-451, BR-201, BR-2121 e CMS-54 quando são comparadas aos valores médios antes da criopreservação e após a criopreservação, levando-se em consideração os efeitos dos períodos de armazenagem, métodos de congelamento e métodos de descongelamento, diminuem seu vigor (1ª contagem) em 63,6%, 36,8%, 37,1% e 7,0% respectivamente;
4. Isolando-se o fator variedade, a semente de milho BR-201 foi a que teve a menor perda de germinação e a variedade CMS-54 a menor perda de vigor quando criopreservada;
5. De uma maneira genérica, as sementes de milho perdem um percentual significativo de sua germinação e vigor até 30 dias de criopreservadas, e estas tendem a manter sua qualidade fisiológica depois deste período;

6. O método de congelamento que menos efeito teve sobre a germinação e o vigor das variedades de sementes de milho estudadas, foi quando estas foram crioconservadas no vapor do nitrogênio líquido (N_2L);
7. As sementes de milho, variedades BR-451 e CMS-54, crioconservadas na imersão do nitrogênio líquido, por 90 dias, apresentam um percentual de germinação maior ao serem descongeladas a temperatura ambiente quando comparados com os outros métodos de descongelamento (banho-maria e microondas). Este fato também ocorre quando a variedade BR-451 é crioconservada no vapor do nitrogênio líquido;
8. As sementes de milho, variedades BR-201, BR-2121 e CMS-54, crioconservadas no vapor do nitrogênio líquido, por 90 dias, têm percentuais de vigor (1^{a} contagem) superiores, ao serem descongeladas à temperatura ambiente, quando comparado com os outros métodos de descongelamento (banho-maria e microondas). Este fato, também ocorre quando as variedades BR-201 e CMS-54 foram crioconservadas por imersão em nitrogênio líquido;
9. As sementes de milho, variedade CMS-54, crioconservadas sob imersão em nitrogênio líquido por 1 hora e posterior armazenagem em câmaras a $-18^{\circ}C$, por 90 dias, têm valores de vigor (comprimento do coleótilo das plântulas) superiores, ao serem descongeladas pelos métodos rápidos (banho-maria e microondas), quando comparados com o descongelamento à temperatura ambiente;
10. As sementes de milho, variedades BR-2121 e CMS-54, crioconservadas sob imersão em nitrogênio líquido por 1 hora e posterior armazenagem em câmaras a $-18^{\circ}C$, por 90 dias, têm valores de vigor (matéria seca) superiores, ao serem descongeladas pelos métodos rápidos (banho-maria e microondas), quando comparados com o descongelamento à temperatura ambiente. Este fato, também ocorre quando as sementes da variedade BR-2121 foram crioconservadas sob imersão em nitrogênio líquido. No entanto, quando esta variedade (BR-2121) foi crioconservada no vapor do nitrogênio líquido, têm valores superiores ao serem descongeladas à temperatura ambiente, quando comparado com os outros métodos de descongelamento (banho-maria e microondas).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F.A.C.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M. **Conservação dos recursos fitogenéticos da região semi-árida através da crioconservação**. Projeto de Pesquisa. Campina Grande, PB: Universidade Federal da Paraíba, 1997, 37p.

BHAT, S.R.; BHAT, K.H.; CHANDEL, K.P.S. Studies on germination and cryopreservation of *Musa balbisiana* seed. National Facility for Plant Tissue Culture Repository, National Bureau of Plant Genetic Resources, New Delhi, India. **Seed Science and Technology**. v.22, p.637-640, 1994.

BRAHAMACHARY, A.K. Cryogenic preservation of bamboo (*Bambusa arundinacea*). Embryology Unit, Indian Statistical Institute, Calcuta. **Indian Forester**. p.541-543, 1994.

BRASIL, Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p.

CAMARGO, C.P.; VECHI, C. Pesquisa em tecnologia de sementes. In: Encontro Nacional de Técnicos de Análises de Sementes, 1971, **Anais...** Porto Alegre. v.1, p.151-186, 1971.

CARVALHO, N.M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.

CENÁRIO FUTURO DO NEGÓCIO AGRÍCOLA DE MINAS GERAIS. **Cenário futuro para a cadeia produtiva de milho em Minas Gerais**. Belo Horizonte, MG, v.11, 1995. 34p.

- CHANDEL, K.P.S.; CHAUDHURY,R.; RADHAMANI, J.; MALIK, S.K. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seed of tea, cocoa and jackfruit. **National Plant Tissue Culture Repository**, New Delhi, India : NBPGR, v.76, p.443-450, 1995.
- CHAUDHURY, R.; CHANDEL, K.P.S. Studies on germination and cryopreservation of Cardamom (*Elettaria cardamomum* maton) seeds. **National Plant Tissue Culture Repository**, , New Delhi, India: NBPGR, Pusa Campus. **Seed Science and Technology**. v.23, p.235-240, 1995.
- DELOUCHE, J.C. Physiology of seed storage. **Research Conference American Seed Trade Association**. v.23, p.83-90, 1968.
- DELOUCHE, J.C.; CALDWELL, W.P. Seed vigor and vigor test. **Proc. Assoc. off Seed Anal**. v. 50, n.1, p.124-129, 1960.
- DIAS, M.C.L. de; CROCHEMORE, M.L. Avaliação da qualidade de sementes. Londrina, PR : IAPAR, 1993. (IAPAR, Circular,77).
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba : 10 ed. NOBEL, 1982. 430p.
- GONZALEZ-BENITO, M.E.; IRIONDO, J.M.; PITA, J.M.; PEREZ-GARCIA, Effects of seed cryopreservation and priming on germination in several cultivars of *Apium graveolens*. **F. Hort Science**. v.75, p.1-4, 1995.
- IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Carta IBGE**. a.3,n.1, dez. 1997.
- IPBGR, INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES. **The desing of seed storage facilites for genetic conservation**, Rome, 1982, 95p.

- IRIONDO, J. M.; PÉREZ, C.; PÉREZ-GARCIA, F. Effect of seed storage in liquid nitrogen on germination of several crop and wild species. *Seed Science and Technology*, v.20, p.165-171, 1992.
- ISELY, D. Vigor test. *Proceedings of the Association of Official Seed Analysts*, North Bruswich, n.47, p.177-182, 1957.
- KARUNUKI, Y.; YOSHIDA, S. Cryopreservation of tea seeds and the excised embryonic axes in liquid nitrogen. In: *Proceedings of the International Symposium on Tea Science*, Shizouka, Japan. *Annals...ISTS*, 1991.
- LIN, S.S. Efeito do vigor da semente no desempenho da planta de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) no campo. *Agronomia Sulriograndense*, Porto Alegre, v.18, n.1, p.37-46, 1982.
- MARCOS FILHO, J.; CÍCERO, S.M.; SILVA, W.R. da. *Avaliação da qualidade das sementes*. Piracicaba : ESALQ. 1987. 230p.
- MARTINS NETO, D.A. Germinação de sementes de pau-de-balsa (*Cochroma pyramidale* (Cav.) Urb.) – *Bombacaceae*. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina . ABRATES v.16, n.2, p.159-162, 1994.
- MEDEIROS, A.C. de S.; CAVALLAR, D.A.N. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.) *Revista Brasileira de Sementes*. v.14, n.1, p.73-75, 1992.
- MOORE, R.P. Effects of mechanical injuries on viability. In: ROBERTS, E. H. *Viability of seeds*. Syracuse: University Press, 1972, p.94-113.

- ^ NORMAH, M.N.; VENGADASALAM, M. Effects of moisture content on cryopreservation of coffea and vigna seeds and embryos. **Cryoletters**. Selangor, Malaysia, v.13, n.3, p.199-208, 1992.
- ^ PENCE, V.C. Cryopreservation of immature embryos of *Theobroma cocoa*. **Plant Cell Rep.** v.10, p.144-147, 1990.
- ^ PENCE, V.C. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species. **Seed Science and Technol** , v.19, p. 235-251, 1991.
- ^ PENCE, V.C. Germination, desiccation and cryopreservation of seeds of *Populus deltoides* Bartr. **Seed Science and Technology**, v.24, p.151-157, 1996.
- PERRY, D.A . Report of the vigour test committe. In: Congresso da International Seed Testing Association, 18, Annals... ISTA, 1977.
- PITA VILLAMIL, J. Crioconservación de semillas. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Agricola, 26, . Campina Grande, PB. **Minicurso**. UFPB/SBEA. 1997, 55p.
- POPINIGIS, F. Vigor das sementes In: **Produção e tecnologia de sementes**. Pelotas : Universidade Federal de Pelotas, 1979. p.98-117.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da Semente**. Brasília : Ministério da Agricultura, AGIPLAN, 1985. 289p.
- ^ PUZZI, D. **Abastecimento e armazenamento de grãos**. Campinas : Instituto Campineiro de Ensino Agricola, 1996, 603p.
- RAJASEKHARAN, P.E.; GANESHAN, S. Freeze preservation of rose pollen in nitrogen: Feasibility, viability and fertility status after long-term storage. **Journal of Horticultural Science**, v.69, n.3, p.565-569, 1994.

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

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide statistics**. Cary, North Caroline, 1985. 584p.

SASSERON, J.L. **Características dos grãos armazenados**. Viçosa, CENTREINAR/UFV, 1980. 59p.

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

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

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: **Plant cryopreservation**. CRC Press, 1985. p.199-225.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: **Cryopreservation of Plant Cell an Organs**. Boca Raton, Flórida. CRC Press, 1985. p.199-236.

STANWOOD, P.C. Survival of sesama (*Sesamum indicum* L.) seed at the temperature of liquid nitrogen (-196°C). **Crop Science**. v.27, p.327-331, 1987.

STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Ultracold preservation of seed germplasm. In: **Plant Cold Hardiness and Freezing Stress**. Academic Press, 1978. p.361-371.

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

- STANWOOD, P.C.; ROSS, E.E. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). **Hort Science**, v.14, p.628-630, 1979.
- STANWOOD, P. C.; SOWA, S. Evaluation of onion (*Allium cepa* L.) seed after 10 years of storage at 5, -18 and -196°C. **Crop Science**, v.35, p.852-856, 1995.
- STONAYOVA, S.D. Seed storage for genetic conservation in the Bulgarian Genebank. In: **Proceedings of a joint FAO/IPGRI workshop on ex situ germplasm conservation**, E.A. Frison and M. Bolton, (eds.). Rome, out. 1994.
- TANNOURY, M.; VINTÉJOUX, C.; DEREUDDRE, J., Cryoconservation par encapsulation et éshydratation d'apex d'ceillet (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivés in vitro. **Acta Bot. Gallica**, v.5, p.415-424, 1995.
- TOLEDO, F.F. de; MARCOS FILHO, J. **Manual das sementes: tecnologia da produção**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1977, 217p
- 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.
- VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. de. **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 1994.
- WIESNER, L.E.; LAUFMANN, J.E.; STANWOOD, P.C.; WHEELER, L.J. The effect of liquid nitrogen on alfafa seed viability, emergence and broken cotyledons. **Journal of Seed Technology**, v.18, n.1, 1993.
- ZINK, E.; MENDONÇA, N.T. de. Estudos sobre a conservação de sementes. XII - Melancia. **Bragantia**, Campinas, v.23, n.28, p.343-350, 1964.

APÉNDICE A

TABELA 1A - Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento x método de descongelamento¹

Variedade	MC ₁			MC ₂			MC ₃		
	MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃
BR-451	66,50 cA	61,67 cB	62,00 bB	69,50 cA	63,17 dB	64,67 dB	58,50 dAB	60,00 dA	56,67 cB
BR-201	80,67 aA	81,33 aA	77,50 aB	88,67 aA	88,33 aA	88,33 aA	84,00 aAB	85,83 aA	81,33 aB
BR-2121	73,33 bA	69,67 bB	75,83 aA	82,67 bA	78,17 bB	76,33 bB	69,50 cA	70,83 cA	72,17 bA
CMS-54	68,00 cA	60,50 cC	64,83 bB	72,83 cA	72,00 cA	69,67 cA	76,67 bB	80,17 bA	75,50 bB

1 - Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente

MD₂ - banho maria

MD₃ - microondas

TABELA 2A – Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento x período de armazenagem¹

Variedade	MC ₁			MC ₂			MC ₃		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃
BR-451	75,17 bA	62,00 cB	53,00 cC	84,83 bA	56,50 dB	56,00 dB	73,50 cA	51,83 dB	49,83 cB
BR-201	89,17 aA	76,67 aB	73,67 aB	95,67 aA	86,17 aB	84,00 aB	88,67 aA	85,83 aA	76,67 aB
BR-2121	74,33 bA	72,00 bA	72,50 aA	83,50 bA	77,67 bB	76,00 bB	76,50 bA	69,17 cB	66,83 bB
CMS-54	65,67 cA	63,50 cA	64,17 bA	73,17 cA	70,33 cA	71,00 cA	79,17 bA	77,00 bA	76,17 aA

I – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L
 MC₂ - vapor do N₂L
 MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

PA₁ - 03 dias
 PA₂ - 30 dias
 PA₃ - 90 dias

65

TABELA 3A – Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação variedade x método de descongelamento x período de armazenagem¹

Variedade	MD ₁			MD ₂			MD ₃		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃
BR-451	79,67 bA	59,33 cB	55,50 cC	77,33 bA	57,83 cB	49,67 cC	76,50 bA	53,17 dB	53,66 cB
BR-201	91,00 aA	81,83 aB	80,50 aB	92,00 aA	85,17 aB	78,33 aC	90,50 aA	81,67 aB	75,50 aC
BR-2121	78,00 bA	74,50 bB	73,00 bB	80,17 bA	69,67 bB	68,83 bB	76,17 bA	74,67 bB	73,50 aB
CMS-54	74,00 cA	71,67 bA	71,83 bA	72,00 cA	70,17 bA	70,50 bA	72,00 cA	69,00 cA	69,00 bA

⁶⁹
¹ – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MD₁ - temperatura ambiente
 MD₂ - banho maria
 MD₃ - microondas

PA₁ - 03 dias
 PA₂ - 30 dias
 PA₃ - 90 dias

TABELA 4A – Valores médios da germinação das sementes de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento x período de armazenagem¹

Método de Congelamento	MD ₁			MD ₂			MD ₃		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃
MC ₁	77,25 bA	70,75 bB	68,37 bB	76,12 bA	66,50 bB	62,25 bC	74,87 bA	68,37 aB	66,87 bB
MC ₂	84,50 aA	75,50 aB	75,25 aB	83,87 aA	72,87 aB	69,50 aC	84,50 aA	69,62 aB	70,50 aB
MC ₃	80,25 bA	69,25 bB	67,00 bB	81,12 aA	72,75 aB	68,75 aC	77,00 bA	70,87 aB	66,37 bC

¹ – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente

MD₂ - banho maria

MD₃ - microondas

PA₁ - 03 dias

PA₂ - 30 dias

PA₃ - 90 dias

TABELA 5A – Valores médios do vigor – 1ª contagem das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento x método de descongelamento¹

Variedade	MC ₁			MC ₂			MC ₃		
	MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃
BR-451	36,83 cA	36,17 cA	33,17 cA	44,50 cAB	42,17 cB	46,83 bA	39,83 dA	35,83 cA	39,50 dA
BR-201	59,83 bA	55,00 bB	56,00 aAB	77,33 aA	72,50 aB	69,67 aB	59,17 bAB	55,33 bB	61,17 bA
BR-2121	60,17 bA	64,17 aA	47,17 bB	75,17 aA	70,17 aB	71,50 aAB	53,67 cA	57,50 bA	55,33 cA
CMS-54	65,83 aA	55,00 bB	55,67 aB	69,00 bA	64,33 bB	68,33 aAB	71,50 aA	74,83 aA	72,67 aA

1 – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L
 MC₂ - vapor do N₂L
 MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente
 MD₂ - banho maria
 MD₃ - microondas

TABELA 6A – Valores médios do vigor – 1ª contagem das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento x período de armazenagem¹

Variedade	MC ₁			MC ₂			MC ₃		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃
BR-451	36,17 cA	35,00 bA	35,00 bA	53,67 cA	40,17cB	39,67 cB	44,67 cA	35,83 dA	34,66 bB
BR-201	53,17 bB	59,50 aA	58,17 aA	76,67 aA	72,33 aAB	70,50 abB	49,33 cB	63,17 bA	63,17 bA
BR-2121	57,33 abA	57,00 aA	57,17 aA	74,67 aA	71,33 abA	70,83 aA	62,83 bA	52,33 cB	51,33 cB
CMS-54	59,00 aA	58,17 aA	59,33 aA	69,33 bA	66,67 bA	65,67 bA	74,67 aA	72,50 aA	71,83 aA

1 – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

PA₁ - 03 dias

PA₂ - 30 dias

PA₃ - 90 dias

TABELA 7A – Valores médios do vigor – 1ª contagem das sementes de milho para a interação variedade x método de descongelamento x período de armazenagem¹

Variedade	MD ₁			MD ₂			MD ₃		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃
BR-451	45,50 bA	38,33 cB	37,33 cB	45,67 cA	34,33 bB	34,17 bB	43,33 cA	38,33 cB	37,83 cB
BR-201	65,50 aA	66,00 aA	64,83 abA	55,00 bB	65,00 aA	62,83 aA	58,67 bB	64,00 aA	64,17 aA
BR-2121	66,83 aA	60,83 bB	61,33 bB	64,17 aA	64,33 aA	63,33 aA	63,83 aA	55,50 bB	54,67 bB
CMS-54	70,33 aA	68,83 aA	67,17 aA	66,50 aA	63,50 aA	64,17 aA	66,17 aA	65,00 aA	65,50 aA

¹ – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MD₁ - temperatura ambiente
 MD₂ - banho maria
 MD₃ - microondas

PA₁ - 03 dias
 PA₂ - 30 dias
 PA₃ - 90 dias

70

TABELA 8A – Valores médios do vigor – 1ª contagem das sementes de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento x período de armazenagem¹

Método de Congelamento	MD ₁			MD ₂			MD ₃		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃
MC ₁	55,25 cA	56,12 bA	55,62 bA	50,87 cA	53,37 bA	53,50 bA	48,12 cA	47,75 cA	48,12 cA
MC ₂	70,87 aA	65,25 aB	63,37 aB	67,00 aA	60,37 aB	59,50 aB	67,87 aA	62,25 aB	62,12 aB
MC ₃	60,00 bA	54,12 bB	54,00 bB	55,62 bA	56,62 abA	55,37 abA	58,00 bA	57,12 bA	56,37 bA

1 – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

71

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente

MD₂ - banho maria

MD₃ - microondas

PA₁ - 03 dias

PA₂ - 30 dias

PA₃ - 90 dias

TABELA 9A - Valores médios do vigor - comprimento do coleóptilo da plântula de milho para a interação variedade x método de congelamento x método de descongelamento¹

Variedade	MC ₁			MC ₂			MC ₃		
	MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃
BR-451	2,61 bB	2,80 bA	2,63 dB	3,58 aA	3,57 bA	3,58 aA	2,43 cB	2,46 cB	3,56 aA
BR-201	3,30 aB	3,13 aC	3,65 aA	3,66 aB	4,02 aA	3,43 bC	3,11 bA	2,81 bB	2,93 bB
BR-2121	2,55 bB	2,45 cB	2,84 cA	2,91 cA	2,93 dA	2,66 cB	2,40 cA	2,48 cA	2,42 cA
CMS-54	3,17 aAB	3,08 aB	3,21 bA	3,30 bB	3,27 cB	3,43 bA	3,33 aB	3,55 aA	3,47 aA

I - Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente

MD₂ - banho maria

MD₃ - microondas

TABELA 10A - Valores médios do vigor - comprimento do coleóptilo da plântula de milho para a interação variedade x método de congelamento x período de armazenagem¹

Variedade	MC ₁			MC ₂			MC ₃		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃
BR-451	2,94 aA	2,85 bA	2,25 dB	4,61 aA	3,09 cB	3,03 dB	3,27 aA	2,19 cC	2,99 cB
BR-201	2,67 bB	2,61 cB	4,80 aA	3,22 bB	3,29 bB	4,59 aA	2,87 bB	2,76 bB	3,22 bA
BR-2121	2,15 cB	2,18 dB	3,51 bA	2,50 cB	2,46 dB	3,54 bA	2,07 cB	2,16 cB	3,07 cA
CMS-54	3,04 aB	3,23 aA	3,19 cA	3,16 bC	3,50 aA	3,33 cB	3,33 aB	3,51 aA	3,52 aA

1 - Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

PA₁ - 03 dias

PA₂ - 30 dias

PA₃ - 90 dias

TABELA 11A – Valores médios do vigor – comprimento do coleóptilo da plântula de milho para a interação variedade x método de descongelamento x período de armazenagem¹

Variedade	MD ₁			MD ₂			MD ₃		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃
BR-451	3,59 aA	2,63 cB	2,41 cC	3,64 aA	2,65 bB	2,55 cB	3,59 aA	2,87 bC	3,31 bB
BR-201	2,89 cB	2,93 bB	4,25 aA	2,90 cB	2,76 bC	4,29 aA	2,96 cB	2,98 bB	4,07 aA
BR-2121	2,26 dB	2,25 dB	3,35 bA	2,18 dB	2,24 cB	3,44 bA	2,28 dB	2,31 cB	3,33 bA
CMS-54	3,11 bB	3,37 aA	3,33 bA	3,15 bB	3,37 aA	3,37 bA	3,27 bB	3,50 aA	3,34 bB

¹ – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MD₁ - temperatura ambiente
 MD₂ - banho maria
 MD₃ - microondas

PA₁ - 03 dias
 PA₂ - 30 dias
 PA₃ - 90 dias

Tabela 12A – Valores médios do vigor – comprimento do coleóptilo da plântula de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento x período de armazenagem¹

Método de Congelamento	MD ₁			MD ₂			MD ₃		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃
MC ₁	2,68 bB	2,74 bB	3,30 bA	2,73 bB	2,56 bC	3,29 bA	2,67 cC	2,86 bB	3,71 aA
MC ₂	3,42 aB	2,99 aC	3,67 aA	3,32 aB	3,12 aC	3,90 aA	3,37 aA	3,14 aB	3,30 cA
MC ₃	2,78 bB	2,64 bC	3,03 cA	2,84 bB	2,58 bC	3,04 cA	3,02 bB	2,74 bC	3,52 bA

¹ – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

75

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente

MD₂ - banho maria

MD₃ - microondas

PA₁ - 03 dias

PA₂ - 30 dias

PA₃ - 90 dias

TABELA 13A – Valores médios do vigor - matéria seca das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento x método de descongelamento¹

Variedade	MC ₁			MC ₂			MC ₃		
	MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃	MD ₁	MD ₂	MD ₃
BR-451	43,13 aA	50,60 aA	44,33 aA	54,43 aA	52,43 aA	54,43 aA	38,22 bA	35,33 cA	39,90 cA
BR-201	42,12 aA	41,97 abA	43,00 aA	53,07 aA	48,17 baA	53,82 aA	50,72 aAB	44,75 bB	53,27 bA
BR-2121	30,63 bB	38,77 bA	36,72 bAB	48,27 aA	35,98 cB	37,22 bB	26,78 cA	34,10 cA	29,87 dA
CMS-54	46,62 aA	43,18 abA	42,83 aA	51,27 aA	42,82 cbB	58,32 aA	50,28 aC	74,88 aA	65,67 aB

1 – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L
 MC₂ - vapor do N₂L
 MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente
 MD₂ - banho maria
 MD₃ - microondas

TABELA 14A – Valores médios do vigor - matéria seca das sementes de milho para a interação variedade x método de congelamento x período de armazenagem¹

Variedade	MC ₁			MC ₂			MC ₃		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃
BR-451	50,67 bA	43,15 aA	44,25 aA	75,72 aA	43,33 baB	42,25 baB	58,97 bA	27,88 cB	26,60 cB
BR-201	60,63 aA	32,88 bB	33,57 bB	83,20 aA	36,68 cbB	35,17 cbB	54,83 bA	47,63 bAB	46,27 bB
BR-2121	46,28 bA	29,20 bB	30,63 bB	56,92 bA	33,28 cB	31,27 cB	44,28 cA	23,30 cB	23,17 cB
CMS-54	45,47 bA	43,12 aA	44,05 aA	53,03 bA	49,60 aA	49,77 aA	73,95 aA	58,85 aB	58,03 aB

1 – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

PA₁ - 03 dias

PA₂ - 30 dias

PA₃ - 90 dias

TABELA 15A – Valores médios do vigor - matéria seca das sementes de milho para a interação variedade x método de descongelamento x período de armazenagem¹.

Variedade	MD ₁			MD ₂			MD ₃		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃
BR-451	59,67 bA	36,77 bB	39,35 baB	61,43 aA	39,12 bB	37,82 bB	64,25 aA	38,48 bB	35,93 cbB
BR-201	73,92 aA	36,92 bB	35,07 cbB	60,53 aA	37,08 bB	37,27 bB	64,22 aA	43,20 bB	42,67 bB
BR-2121	47,68 cA	29,63 bB	28,37 cB	54,38 aA	27,47 cB	27,00 cB	45,42 bA	28,68 cB	29,70 cB
CMS-54	55,45 cbA	46,58 aB	46,13 aB	56,78 aA	52,40 aA	51,70 aA	60,22 aA	52,58 aA	54,02 aA

1 – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MD₁ - temperatura ambiente
 MD₂ - banho maria
 MD₃ - microondas

PA₁ - 03 dias
 PA₂ - 30 dias
 PA₃ - 90 dias

TABELA 16A - Valores médios do vigor - matéria seca das sementes de milho para a interação método de congelamento x método de descongelamento x período de armazenagem¹

Método de Congelamento	MD ₁			MD ₂			MD ₃		
	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃	PA ₁	PA ₂	PA ₃
MC ₁	45,91 cA	36,51 aB	39,45 aAB	55,36 aA	37,95 aB	37,57 aB	51,01 bA	36,80 aB	37,35 aB
MC ₂	74,70 aA	41,39 aB	39,19 aB	58,80 aA	38,11 aB	37,64 aB	68,15 aA	42,67 aB	42,01 aB
MC ₃	56,92 bA	34,52 aB	33,05 aB	60,69 aA	40,99 aB	40,12 aB	56,41 bA	42,74 aB	42,37 aB

1 - Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MC₁ - imersão em N₂L

MC₂ - vapor do N₂L

MC₃ - imersão em N₂L / - 18°C

MD₁ - temperatura ambiente

MD₂ - banho maria

MD₃ - microondas

PA₁ - 03 dias

PA₂ - 30 dias

PA₃ - 90 dias

TABELA 17A – Valores médios do vigor das sementes de milho para a interação método de descongelamento x período de armazenagem¹

1ª contagem			
Método de descongelamento	PA ₁	PA ₂	PA ₃
MD ₁	62,04 aA	58,50 aB	57,67 aB
MD ₂	57,83 bA	56,79 abA	56,12 aA
MD ₃	58,00 bA	55,71 bAB	55,54 aB
Matéria Seca			
Método de descongelamento	PA ₁	PA ₂	PA ₃
MD ₁	59,18 aA	37,47 aB	37,23 aB
MD ₂	59,28 aA	39,02 aB	38,44 aB
MD ₃	58,52 aA	40,74 aB	40,58 aB

1 – Para cada característica avaliada, as médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

MD₁ - temperatura ambiente
 MD₂ - banho-maria
 MD₃ - microondas

PA₁ - 03 dias
 PA₂ - 30 dias
 PA₃ - 90 dias