

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE  
PLANTAS  
DEIZIMARY STELLA DE ARAÚJO

**Criopreservação de espécies de *Passiflora***

CÁCERES  
MATO GROSSO – BRASIL  
DEZEMBRO – 2014

DEIZIMARY STELLA DE ARAÚJO

**Criopreservação de espécies de *Passiflora***

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Petterson Baptista da Luz

CÁCERES  
MATO GROSSO – BRASIL  
DEZEMBRO – 2014

Araújo, Deizimary Stella de.

Criopreservação de espécies de Passiflora./Deizimary Stella de Araújo. – Cáceres/MT: UNEMAT, 2015.

75 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Mato Grosso. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, 2015.

Orientador: Petterson Baptista da Luz

1. Maracujá. 2. Maracujá - germinação. 3. Maracujá – sementes. 4. Passiflora – espécies. 5. Criopreservação – conservação de germoplasma. I. Título.

# CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Passiflora*

**Deizimary Stella de Araújo**

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

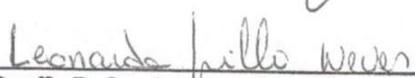
Aprovada em 16 de dezembro de 2014.

Comissão Examinadora:



---

Prof. D.Sc. Armando Reis Tavares – IBT



---

Prof<sup>a</sup>. D.Sc. Leonarda Grillo Neves – UNEMAT



---

Prof. D.Sc. Peterson Baptista da Luz – UNEMAT  
(Orientador)

*Dedico ao meu filho Eduardo Araújo Polanczyk, amor maior da minha vida, razão pra eu nunca desistir.*

## AGRADECIMENTO

- À Deus, pela vida, saúde, família e por abrir caminhos em minha vida para que eu possa realizar meus sonhos profissionais e pessoais.
- À Universidade do Estado de Mato Grosso pela oportunidade de ingressar em um curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu*.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas – PGMP, pela oportunidade de ingressar no curso e pela qualidade do ensino ofertado.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.
- Ao meu orientador, Dr. Petterson Baptista da Luz, a quem eu admiro pessoalmente e profissionalmente, obrigada pelos conhecimentos adquiridos, pela amizade, pela orientação e principalmente pela compreensão durante todo o decorrer do curso.
- A todos os professores do mestrado, pelos ensinamentos, pela amizade e dedicação ao ensino, que me proporcionou crescer profissionalmente e despertou-me um interesse ainda maior para o estudo.
- Ao professor Severino de Paiva Sobrinho, pela amizade, pelos ensinamentos e por todo o auxílio proporcionado durante esse período.
- Aos alunos bolsistas e voluntários do Laboratório de Sementes e Plantas Ornamentais, em especial aos alunos Raphael Egues Ranzani, Edileuson Galvão, Guilherme Koch, Sônia Regina e Aline Karem de Moraes, pela amizade e grande ajuda no desenvolvimento da minha pesquisa, muito obrigada.
- Aos meus colegas de mestrado, Álan, Taniele, Paulo, Laís, Mariana, Natan, Viviane, Greiciele, Tatiane e Angelita por todos os bons momentos e horas de estudos em que convivemos, pela amizade e por fazerem parte dessa fase da minha vida.
- À aluna da turma anterior desse mestrado Talita, obrigada pela amizade e por me auxiliar inicialmente nos trabalhos a campo e laboratorial.
- Aos meus pais e esposo, pelo amor e apoio, sem o qual não seria possível cursar esse mestrado, toda a minha gratidão.

## BIOGRAFIA

Deizimary Stella de Araújo, nascida em Rosário Oeste - MT ao primeiro dia do mês de Agosto de 1985, filha de Euclides Paiva de Araújo e Benedita Deizia Araújo, terminou o ensino médio na Escola Estadual 13 de Maio (2002) do município de Tangará da Serra.

Diplomou-se em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas em Agosto de 2008 pela Universidade do Estado de Mato Grosso, atuando na área de microbiologia e educação ambiental. Formou-se nos cursos de Técnico em Guia de Turismo Regional com ênfase em Ecoturismo (2008) e Técnico em Segurança do Trabalho (2012) pela Escola Técnica Estadual de Educação Profissional e Tecnológica de Tangará da Serra.

Atuou nas Redes Estadual e Municipal de Ensino em diferentes unidades escolares de Tangará da Serra, como professora de Ciências do Ensino Fundamental, durante os anos de 2009 a 2012. Em 2013 ingressou no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade do Estado de Mato Grosso, área de concentração em Biotecnologia, no qual desenvolveu sua pesquisa voltada para a criopreservação de sementes de *Passiflora*.

## ÍNDICE

RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. A família Passifloraceae .....	4
2.2. Caracterização do gênero Passiflora .....	5
2.3. Descrição morfológica de espécies de Passiflora .....	6
2.4. Importância agronômica do maracujazeiro .....	8
2.5. Conservação de germoplasma .....	9
2.6. Germinação de sementes .....	11
2.7. Tolerância à dessecação .....	13
2.8. Armazenamento de sementes .....	15
2.9. Criopreservação: histórico e metodologias .....	17
2.9.1. Método Clássico .....	18
2.9.2. Vitrificação .....	19
2.10. Fatores críticos: desidratação, congelamento e descongelamento.....	20
2.11. Crioprotetores .....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
3.1. Área de estudo.....	24
3.2. Detalhamento do experimento em campo .....	24
3.3. Armazenamento e quebra de dormência das sementes.....	25
3.4. Primeira fase: adequação do teor de umidade.....	26
3.4.1. Determinação do Teor de Água Inicial .....	26
3.4.2. Adequação do Teor de Água Final .....	26
3.5. Variáveis analisadas .....	27
3.5.1. Teste Padrão de Germinação (TPG) .....	27
3.5.2. Índice de Velocidade de Germinação (IVG).....	27
3.5.3. Porcentagem de germinação das sementes.....	28
3.5.4. Teste de Emergência de Plântulas .....	28
3.5.5. Índice de Velocidade de Emergência (IVE) .....	28
3.5.6. Porcentagem de Emergência de Plântulas .....	29

3.5.7. Massa de matéria seca.....	29
3.5.8. Comprimento da parte aérea da plântula.....	29
3.5.9. Comprimento da radícula da plântula .....	29
3.6. Análise dos dados: primeira fase .....	30
3.7. Segunda fase: criopreservação em NL2 .....	30
3.7.1. Considerações para a criopreservação das sementes .....	30
3.7.2. Crioprotetores .....	31
3.7.3. Imersão em Nitrogênio Líquido (NL2).....	31
3.7.4. Descongelamento.....	32
3.8. Análise dos dados: segunda fase .....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Efeito de diferentes teores de umidade.....	34
4.2. Criopreservação em Nitrogênio Líquido (NL2).....	45
5. CONCLUSÕES .....	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
7. ANEXO.....	70

## RESUMO

ARAÚJO, Deizimary Stella de; M. Sc. UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, Dezembro de 2014. **Criopreservação de espécies de *Passiflora***. Orientador: Petterson Baptista da Luz. Conselheiros: Armando Reis Tavares e Leonarda Grillo Neves.

Nas últimas décadas, a criopreservação tem se destacado como uma importante técnica de conservação de germoplasma, devido à possibilidade de manutenção da sua viabilidade por longo prazo. Diante da necessidade de estudos mais aprofundados sobre conservação de germoplasma que garantam maior eficiência para resguardar genótipos de interesse para o melhoramento vegetal e conservação das espécies, esta pesquisa teve por objetivo avaliar a eficiência da criopreservação de sementes em seis espécies de *Passiflora spp.* (*P. nitida*, *P. foetida*, *P. mucronata*, *P. micropetala*, *P. suberosa*, *P. edulis*), utilizando diferentes crioprotetores, e descrever o comportamento das sementes mediante os tratamentos. Foram realizados dois experimentos, no qual o primeiro descreve os efeitos de diferentes teores de umidade nas sementes, e o segundo aborda a criopreservação em nitrogênio líquido (-196 °C). Para o primeiro experimento, foi utilizado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com quatro tratamentos – 6, 8, 10 e 12% teor de umidade (b.u.) - e quatro repetições de 50 sementes. As sementes foram submetidas ao processo de hidratação ou secagem até alcançarem os teores de umidade desejados, sendo posteriormente utilizadas nos Testes Padrão de Germinação (TPG) e Vigor de Plântulas, que foram analisados pelas variáveis: Índice de Velocidade de Germinação (IVG), porcentagem de germinação (%), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), porcentagem de emergência (%), comprimento da radícula (CR) em cm/plântula, comprimento da parte aérea (CPA) em cm/plântula e massa de matéria seca (MS) em gramas. Os dados foram submetidos à análise de regressão polinomial, através do programa SISVAR. No experimento de criopreservação, sementes das espécies em estudo foram criopreservadas com o teor de umidade em que se verificaram os melhores resultados do primeiro experimento. Foi utilizado o DIC, com quatro tratamentos (T<sub>1</sub> – DMSO a 7%; T<sub>2</sub> – sacarose a 0,3 M; T<sub>3</sub> - armazenamento em NL<sub>2</sub> sem crioprotetor; T<sub>4</sub> – controle, sem armazenamento em NL<sub>2</sub> e sem crioprotetor) e cinco repetições de 50 sementes. As sementes foram armazenadas durante 120 horas em NL<sub>2</sub> (-196°C), realizou-se o descongelamento em

banho-maria (37 °C) durante 20 minutos, e prosseguiram-se os Testes de Germinação e Vigor anteriormente descritos. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey (5% de probabilidade) pelo programa SISVAR. Os resultados sobre os efeitos de diferentes teores de umidade nas sementes foram significativos ( $P < 0,05$ ) para as espécies *P. nitida*, *P. mucronata* e *P. edulis*. Em *P. nitida* os resultados de IVG e porcentagem de germinação (G%) ajustaram-se ao modelo de regressão cúbica, com melhores resultados obtidos no teor de umidade em torno de 10%. Em *P. mucronata*, obteve-se uma resposta quadrática para a regressão polinomial, com resultados superiores de IVG e porcentagem de germinação (G%) para sementes com 12% de teor de umidade. Em *P. edulis* para as variáveis IVG e CPA, a regressão de ordem quadrática também indicou melhores resultados no teor de 12% de umidade. Os resultados para *P. foetida*, *P. micropetala* e *P. suberosa* indicam que essas espécies toleram, sem alteração no potencial fisiológico, ajustes no teor de umidade das sementes no intervalo de 6 a 12%. No experimento de criopreservação, em sementes de *P. nitida* (10,4% umidade) foram obtidas melhores médias para o tratamento sem crioprotetor para a maioria das variáveis; em *P. foetida* (8,4% umidade) o controle se manteve superior aos demais tratamentos, seguido do sem crioprotetor e DMSO; em *P. mucronata* (12% umidade), a sacarose se revelou eficiente para a criopreservação de sementes dessa espécie; em *P. micropetala* (6,2% umidade) houve perda considerável do potencial fisiológico após armazenamento em NL<sub>2</sub>, revelando dificuldades para sua criopreservação; *P. suberosa* (9,5% umidade) suportou o armazenamento em NL<sub>2</sub> sem danos aparentes nas sementes, porém com algumas alterações significativas no desenvolvimento das plântulas; e por último *P. edulis* (12% umidade) que evidenciou resultados positivos para criopreservação, sem a necessidade da utilização de crioprotetores. Conclui-se que a maioria das espécies podem ser criopreservadas com sucesso, no entanto, novas pesquisas podem vir a corroborar com os resultados obtidos nesse estudo, indicando o tratamento mais adequado à criopreservação de sementes de espécies de *Passiflora*.

Palavras-chave: sementes, maracujá, germinação.

## ABSTRACT

ARAÚJO, Deizimary Stella de; M. Sc. UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, December, 2014. **Cryopreservation of *Passiflora* species.** Advisor: Petterson Baptista da Luz. Counselors: Armando Reis Tavares and Leonarda Grillo Neves.

During the last decades, the cryopreservation has been highlighted as an important technique of germoplasm conservation, due to the possibility of maintenance of its viability for long time. Toward the need of a deeper study on germoplasm conservation that guarantees greater efficiency to save genotypes of interest for plant breeding improvement and preservation of species, this research had the goal of evaluating the efficiency of seed cryopreservation in six species of *Passiflora* spp. (*P. nitida*, *P. foetida*, *P. mucronata*, *P. micropetala*, *P. suberosa*, *P. edulis*), using different cryoprotectants and describing the behavior of seeds meantime the treatment. Two experiments were conducted, in which the first describes the effects of different moisture contents in seeds, the second approach the cryopreservation in liquid nitrogen (-196 °C). For the first experiment, was used the Completely Randomized Design (CRD), with four treatments – 6, 8, 10 and 12% moisture content (w.b.), in four repetitions of 50 seeds. The seeds were submitted hydration and drying process to achieve the desired moisture content, been subsequently used in Standard Germination Test (SGT) and Vigor of Seedlings, which were analyzed by the variables: Germination Speed Index (GSI), germination percentage (%), Emergence Speed Index (ESI), emergence percentage (%); radicle length (RL) in cm/seedling, shoot length (SL) in cm/seedling and mass dry matter (DM) in grams. The data were submitted to a polynomial regression analysis using SISVAR program. By the cryopreservation experiment, seeds of the studied species were cryopreserved with a moisture content in which were verified the best results of the first experiment. DIC were used with four treatments (T<sub>1</sub> - DMSO in 7%; T<sub>2</sub> - sucrose in 0.3 M; T<sub>3</sub> - storage in NL<sub>2</sub> without cryoprotectant; T<sub>4</sub> - control, without storage in NL<sub>2</sub> and without cryoprotectant) in five repetitions of 50 seeds. The seeds were stored during 120 hours in NL<sub>2</sub> (-196 °C). Thawing was performed in a water bath (37 °C) during 20 minutes, followed by Germination and Vigor Test, previously described. The data was submitted to variance analysis and Tukey test (5% probability) by SISVAR program. The results on the effects of different moisture contents in seeds were significant

( $P < 0.05$ ) for the species *P. nitida*, *P. mucronata* and *P. edulis*. In *P. nitida* the results of GSI and germination percentage (G%) fitted to the model of cubic regression, the best results were obtained on the moisture content around 10%. In *P. mucronata*, was obtained a quadratic response to the polynomial regression, with higher results of GSI and germination percentage (G%) for seeds with 12% of moisture content. In *P. edulis* for the variables GSI and SL, the regression of quadratic order also displayed best results in the moisture content of 12%. The results for *P. foetida*, *P. micropetala* and *P. suberosa* indicated that those species tolerate, without changes in its physiological potential, adjustment the moisture content of the seeds in the range of 6 to 12%. In the cryopreservation experiment, of *P. nitida* seeds (10.4% moisture content) were obtained best averages for the treatment without the cryoprotectant for most part of the variables; for *P. foetida* (8.4% moisture content) the control remained higher than the others on treatment, followed by the treatment without cryoprotectant and DMSO; for *P. mucronata* (12% moisture content), the sucrose proved to be efficient for the cryopreservation of seeds from these specie; for *P. micropetala* (6.2% moisture content) after the storage in  $NL_2$  there was a considerable loss of its physiological potential, revealing difficulties for its cryopreservation; *P. suberosa* (9.5% moisture content) tolerated the storage in  $NL_2$  without apparent damage to the seeds however with some significant changes in the seedlings development; the last, *P. edulis* (12% moisture content) showed positive results for cryopreservation without need of cryoprotectants. Concludes that most species can be cryopreserved successfully, however, new researches may come to corroborate the results obtained in this study, indicating the most appropriate treatment in the cryopreservation of seeds in the species *Passiflora*.

Keywords: seeds, passion fruit, germination.

## 1. INTRODUÇÃO

A família Passifloraceae está representada na América do Sul por quatro gêneros, no qual o *Passiflora*, composto por mais de 500 espécies, sendo mais de 150 originárias do Brasil, é o mais importante numericamente e economicamente (Feuillet e MacDougal, 2003; Ulmer e MacDougal, 2004; Vasconcellos et al., 2005; Hansen et al., 2006).

Diante da diversidade genética que o Brasil apresenta, é expressiva a variabilidade genética interespecífica e intraespecífica que ocorre naturalmente (Ferreira, 2005).

Por isso, muitas espécies silvestres de *Passiflora* têm apresentado grande potencial para uso em programas de melhoramento genético, com características, que incluem a qualidade de seus frutos, a sua adaptabilidade para o cultivo, além de propriedades alimentícias, ornamentais, medicinais e ainda como porta-enxertos (Killip, 1938; Bernacci et al., 2005; Faleiro et al., 2005; Junqueira et al., 2005; Peixoto, 2005; Vasconcellos et al., 2005; Faleiro et al., 2011).

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de maracujá, com uma produção estimada em 776.097 toneladas (Meletti, 2011; IBGE, 2012). No entanto, os plantios comerciais têm-se limitado ao emprego de sementes das espécies comerciais de maracujá-azedo, roxo e doce (Faleiro et al., 2005).

No Brasil, a erosão genética em espécies de *Passiflora* vem ocorrendo de forma significativa, por fatores como a crescente utilização de novas áreas do Centro-Norte para fins agrícolas e industriais. Por isso, a conservação de germoplasma de raças locais, cultivares domésticas e parentes silvestres de espécies agronômicas tem sido considerada uma importante área de pesquisa (Santos, 2000; Faleiro et al., 2005, Ferreira et al., 2005; Carvalho e Otoni, 2010; Nick et al., 2010; Faleiro et al., 2011).

Segundo Ferreira (2005) os bancos de germoplasma de espécies de *Passiflora* são bastante modestos, apesar de as fontes de recursos genéticos disponíveis na natureza serem muito amplas.

Tradicionalmente, recursos genéticos de grande parte das espécies vêm sendo conservadas de forma *ex situ* em coleções de campo (Engelmann, 2004; Nick et al., 2010). Sabe-se, porém, que a conservação em campo apresenta

desvantagens que limitam sua eficácia e ameaçam a segurança dos recursos genéticos vegetais conservados desta forma (Engelmann, 2004). Além disso, algumas espécies de Passifloraceae apresentam exigências muito particulares para se desenvolver, sendo extremamente difícil seu cultivo em campo (Bernacci et al., 2005).

Mais recentemente, a conservação *ex situ* através da técnica de criopreservação tem sido utilizada para conservação de diferentes formas de germoplasma, como pólen, meristemas, embriões, tecidos e sementes (Maruyama e Ishii, 2000; Matsumoto, 2000; Santos, 2000; Yamaguchi e Ishikawa, 2000; Shimonishi et al., 2000; Meletti et al., 2007).

Em síntese, trata-se de uma técnica de conservação de material biológico em temperaturas extremamente baixas, até  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido ( $\text{NL}_2$ ) que permite o armazenamento e manutenção das características do material por longo período (Engelmann, 2004; Carvalho e Otoni, 2010).

A criopreservação de germoplasma é relativamente importante à medida que proporciona a conservação do material genético, mantendo sua integridade fisiológica e funcional durante um longo prazo, levando-se em consideração as especificidades de cada espécie, além de ser uma ferramenta para o melhoramento genético de plantas.

No caso da criopreservação de sementes, fatores como a tolerância à dessecação e sensibilidade à baixa temperatura do Nitrogênio Líquido ( $\text{NL}_2$ ) são os pontos mais importantes durante o processo criogênico (Ospina et al., 2000; Sakai, 2000; Santos, 2000). Além disso, sementes recalcitrantes, ortodoxas e intermediárias apresentam comportamento diferenciado quanto ao processo de criopreservação, o que exige diferenciação no protocolo a ser utilizado (Santos, 2000; Carvalho e Otoni, 2010).

Para reduzir a injúria sofrida pela célula, durante seu congelamento ou descongelamento, são utilizadas substâncias químicas denominadas crioprotetores (Carvalho e Otoni, 2010). Os crioprotetores mais utilizados na criopreservação de plantas são glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e os glicóis de menor peso molecular (Benson, 2008).

Dessa forma, esse trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência da criopreservação em espécies de *Passiflora*, analisando diferentes teores de

umidade das sementes e crioprotetores, e descrever o comportamento das sementes mediante os tratamentos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A família Passifloraceae

A família Passifloraceae está dividida em duas tribos, *Paropsieae* e *Passiflorieae*. Essa última está representada na América do Sul, por cinco gêneros, sendo: *Ancistrotrysus* com 2 espécies; *Mitostemma*, com 3 espécies; *Dilkea*, com 6 espécies; *Passiflora* com cerca de 530 espécies, sendo numérica e economicamente o mais importante da família; e *Tetrastylis*, gênero monotípico (Ulmer e MacDougal 2004; Cervi, 2006). No entanto, estudos moleculares (Muschner et al., 2003) e morfológicos (Feuillet e MacDougal, 2003), o gênero *Tetrastylis* foi reposicionado em *Passiflora*.

Estudos demonstram que a ampla variação morfológica do gênero *Passiflora* parece resultar da diversidade de seus habitats, assim como de suas relações coevolutivas com muitos organismos, incluindo formigas protetoras (Apple e Feener 2001), herbívoros, (particularmente *Heliconius* spp. borboletas; Gilbert, 1982), polinizadores, e as comunidades de plantas que fornecem lhes apoio físico e acesso à luz solar (Pérez et al., 2007).

A polinização é realizada principalmente por insetos, especialmente as abelhas, com destaque para mamangavas do gênero *Xylocopa* (Janzen, 1968; Freitas e Oliveira Filho, 2003; Benevides et al., 2009); espécies polinizadas por beija-flores constituem o segundo maior registro dentro do grupo (Janzen, 1968; May e Spears, 1988; Koschnitzke e Sazima, 1997; Varassin et al., 2001) tendo também a ocorrência de várias espécies polinizadas por morcegos (Buzato e Franco, 1992; Kay, 2001; Varassin et al., 2001).

A taxonomia do gênero *Passiflora*, baseado em várias estruturas florais e vegetativas, levou a uma primeira subdivisão taxonômica complexa, descrita por Killip (1938), composta de vinte e dois subgêneros e estes, por sua vez, subdivididos em seções e/ou séries. No entanto, estudos posteriores, baseados em caracteres morfológicos, ecológicos e de sistemática filogenética, utilizando marcadores moleculares, corroboraram total ou parcialmente para a nova classificação infragenérica do gênero (Freitas, 2011).

## 2.2. Caracterização do gênero *Passiflora*

Espécies do gênero *Passiflora* distribuem-se amplamente pela América, com aproximadamente 500 espécies, das quais mais de 150 espécies nativas são encontradas no Brasil, sendo por isso, considerado o maior centro de diversidade genética (Ulmer e MacDougal, 2004; Faleiro et al., 2005; Vasconcellos et al., 2005; Hansen et al., 2006).

Com base em caracteres morfológicos, Feuillet e MacDougal (2003), reconheceram dentro do gênero *Passiflora* quatro subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast. e *Deidamioides* (Harms) Killip, a partir América Central e América do Sul; *Decaloba* (DC.) Rchb., da América, Leste-Sul da Ásia e na Austrália; e *Passiflora* L., exclusivamente da América.

Hansen et al. (2006), através de análises moleculares, também considerou como válido o subgênero *Deidamioides*, embora o mesmo tenha se apresentado polifilético em todas as análises, inclusive nas de outros autores (Muschner et al., 2003; Yockteng e Nadot, 2004; Muschner, 2005; Zamberlan, 2007), que propuseram a redução para três subgêneros: *Decaloba*, *Astrophea* e *Passiflora*, este último, ainda com a classificação de monofiletismo não esclarecida, o que sugere a necessidade de mais estudos antes da reavaliação de um grupo em evolução rápida e complexa como é a do *Passiflora* (Muschner et al., 2003; Pérez et al., 2007).

No que se refere às características morfológicas, o gênero *Passiflora* compreende plantas trepadeiras herbáceas ou arbustivas, podendo apresentar hastes cilíndricas ou quadrangulares, angulosas, suberizadas, glabras ou pilosas. A flor apresenta características marcantes do gênero com presença de cinco estames, cinco pétalas e cinco sépalas e pelo androginóforo ereto com estames de extremidades livres e três estigmas (Cervi, 1997; Vanderplank, 2000; Faleiro et al., 2005; Soares et al., 2011).

Os frutos são caracterizados como bagas, geralmente indeiscentes, globosos ou ovóides, raramente fusiformes, geralmente de coloração amarela, podendo existir frutos de coloração vermelha e roxa (Vanderplank, 2000; Ulmer e Macdougal, 2004). Em geral, o fruto destas espécies leva em seu interior uma polpa ácida, mucilaginosa ou aquosa, em forma de arilo que recobre as sementes (Cervi, 1997).

As sementes são em sua maioria, comprimidas, reticuladas, pontuadas ou transversalmente alveoladas, envolvidas por um arilo mucilaginoso (Vanderplank,

2000). Sugere-se que as sementes podem ser classificadas como ortodoxas ou ortodoxas intermediárias, tolerantes à perda de umidade (Nakagawa et al., 1981; Catunda et al., 2003; Meletti et al., 2007).

Quanto ao sistema reprodutivo, o maracujazeiro é uma planta alógama, sendo que na maioria das espécies, as flores apresentam autoincompatibilidade do tipo homomórfico-esporofítico, provavelmente controlado por um gene. Esse fator deve ser considerado no melhoramento genético do maracujazeiro, necessitando-se cultivares com diversidade genética suficiente em relação à autoincompatibilidade para que haja maior eficiência na polinização (Bruckner et al., 2005).

As espécies estudadas de *Passiflora* possuem uma amplitude significativa quanto ao tamanho e número de cromossomos, podendo ser agrupadas segundo o número básico de cromossomos ( $x$ ) em três grupos:  $x=6$ ,  $x=9$  e  $x=9$  ou  $10$  que estão em maior frequência. No entanto, há outros registros diferentes para as espécies do gênero (Soares-Scott et al., 2005).

### **2.3. Descrição morfológica de espécies de *Passiflora***

***Passiflora nitida* HBK.:** Conhecida popularmente como maracujá-de-cheiro (Amazonas), pode ser encontrada no Brasil nos estados do Acre, Amazonas, Bahia, Brasília, Goiás, Mato Grosso, Pará, Rondônia; bem como em outros países como Bolívia, Colômbia, Guiana Francesa, Panamá, Perú, Suriname e Venezuela. É uma planta escandente, totalmente glabra que possui folhas ovado-oblongas, ovado-elípticas ou ovadas, e suas sementes obcordadas, de  $5 \times 3$  mm, tridentadas no ápice, reticuladas. Trata-se de uma espécie heliófita que se desenvolve no cerrado bem como na floresta densa. Neste último caso, seus ramos atingem as copas das árvores mais altas. O florescimento ocorre de dezembro a março e frutifica de abril a julho (Cervi, 1997).

***Passiflora foetida* L.:** pertencente à seção *Dysosmia* é possivelmente a mais variável espécie do gênero, particularmente a respeito de folhas, flores e frutos (Ulmer e MacDougal, 2004). Apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo na América tropical e frequentemente introduzida em outras regiões tropicais (Bernacci et al., 2003). No Brasil é encontrada praticamente em todos os estados e tipos vegetacionais, comportando-se como planta invasora em áreas degradadas (Nunes

e Queiroz, 2001). É caracterizada por possuir folhas 3-5-lobadas com o lobo central mais desenvolvido; brácteas e estípulas 1-3 pinatissectas com segmentos filiformes; frequentemente pilosas com tricomas glandulares capitados nas folhas, brácteas e estípulas e flores com forte odor desagradável (Killip, 1938).

***Passiflora mucronata* Lam.:** Conhecida popularmente como sururú, maracujá-de-restinga (Bahia, Rio de Janeiro), trata-se de planta escandente, totalmente glabra que no Brasil pode ser encontrada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Paraíba, Pernambuco e Rio de Janeiro. A espécie é heliófita, vive exclusivamente na restinga sobre arbustos, mas floresce e frutifica durante todo o ano, porém a floração máxima se dá nos meses de fevereiro a maio. Difere-se da normalidade de outras espécies do gênero, apresentando antese noturna com polinização por quirópteros (*Glossophaga soricina* e *Carollia perspicillata*). Além disso, após a abertura das flores, tanto as anteras como os estigmas agrupam-se em semi-círculo, tornando a flor zigomorfa em relação ao androceu e gineceu, atributo incomum em *Passiflora*. As flores permanecem abertas até as primeiras horas da manhã (Cervi, 1997).

***Passiflora micropetala* Mast.:** No Brasil, a espécie pode ser encontrada no estado do Amazonas. Possui haste comprimida, flexuosa, glabra, pecíolos longos, de 4 a 6 mm, poucas glândulas, folhas semi-orbiculares, com cerca de 6,5 cm de comprimento e 9,0 cm de largura, truncada no ápice; 3 lóbulos rudimentares, mucronadas, cordadas na base; 2 glândulas ocelar perto da base da lâmina, membranosa; pedúnculos solitários ou aos pares; flores brancas, sépalas triangulares, largas, eretas; pétalas ovadas, pequenas, brancas; filamentos da corona em duas séries; ovário globoso; e frutos globosos com cerca de 1,5 cm de diâmetro (Killip, 1938).

***Passiflora suberosa* L.:** Espécie polimórfica e encontra-se amplamente distribuída na região Neotropical (Killip, 1938, Sacco, 1980). No Rio Grande do Sul, ocorrem na Serra do Sudeste, Depressão Central e Planície Costeira, desenvolvendo-se principalmente em bordas de matas e florestas alteradas (Sacco, 1980). A espécie possui um padrão de floração contínuo, com pelo menos três

épocas de picos florais (Newstrom et al., 1994). Apresenta flores pequenas, perfeitas, solitárias ou aos pares, desprovida de pétalas com três brácteas e cinco sépalas oval – lanceoladas, com coloração inconspícua, predominando o tom amarelo-esverdeado; os frutos são globosos ou ovoides, verde-escuro, 1,5-2 x 2 cm, glabro. Sementes achatadas, acuminadas no ápice, 3-5 mm, reticuladas. (Killip, 1938; Sacco, 1980; Nunes e Queiroz, 2001; Acioli, 2003).

***Passiflora edulis Sims.***: Nativa do Brasil, encontrada praticamente em todo o território; bem como em muitos outros países. Os nomes populares também são bastante variados, maracujá (Paraná), maracujá-peroba (Pará), maracujá-redondo (Rio de Janeiro), etc. Planta escandente, glabra ou laxamente pilosa com folhas trilobadas, trinervadas, possuem gavinhas axilares, solitárias, bem desenvolvidas e robustas. As sementes ovais, de 5-6 x 3-4 mm, muito duras, cor cremes, foveoladas. A espécie é heliófita e seletiva higrófito, vive na orla de floresta, capoeiras e capoeirões, em solos úmidos e bem drenados. Dado o grande cultivo da espécie, vários autores descreveram muitas variedades, baseando-se em caracteres como: cor do caule, tamanho e forma do fruto, forma do bordo das brácteas e o comprimento dos filamentos da corona floral (Cervi, 1997).

#### **2.4. Importância agrônômica do maracujazeiro**

Diante da diversidade genética que o Brasil apresenta, é expressiva a variabilidade genética interespecífica e intraespecífica que ocorre naturalmente nas espécies de *Passiflora* (Ferreira, 2005).

Essas espécies têm apresentado características de interesse para o uso em programas de melhoramento genético, por causa das suas propriedades alimentícias, ornamentais, medicinais, como fonte de resistência a doenças, e ainda como porta-enxertos (Killip, 1938; Dhawan et al., 2004; Bernacci et al., 2005; Faleiro et al., 2005; Junqueira et al., 2005; Meletti et al., 2005; Peixoto, 2005; Vasconcellos et al., 2005; Faleiro et al., 2011;).

Características como longevidade, maiores adaptação às condições adversas, período de florescimento ampliado, e outras potencialidades ainda não exploradas podem ser observadas em muitas espécies, entre elas *P.*

*quadrangularis*, *P. nitida*, *P. foetida*, *P. setacea*, *P. cincinatta*, *P. caerulea*, *P. incarnata* e *P. maliformis* (Meletti et al., 2005).

A produção de maracujá no Brasil vem crescendo nos últimos trinta anos, ganhando destaque no cenário mundial, sendo a espécie *P. edulis* Sims a mais cultivada (Ferreira, 2005; Meletti, 2011). Em geral, o maracujazeiro é cultivado em pequenas propriedades, com pomares de 3 a 5 hectares, e, embora seja uma cultura de alto risco, tem atraído muitos produtores, pelo alto valor agregado da produção (Meletti, 2011).

Historicamente, até a década de 70, a produção de maracujá no Brasil era bastante limitada, por diferentes motivos tais como a falta de demanda constante do produto e ciclos de retração e expansão da área cultivada. No entanto, nos anos de 1990 a 1996 observou-se o aumento significativo da área cultivada, que correspondeu ao acréscimo em torno de 75% em apenas seis anos (Meletti, 2011).

A produção continuou aumentando, de tal forma que o Brasil conforme Meletti (2011) se tornou o maior produtor e consumidor mundial de maracujá. Segundo o IBGE, em 2012 o Brasil apresentou área colhida de 57.848 ha com produção estimada em 776.097 toneladas. O Estado com maior produção é a Bahia (320.945 t), enquanto o Mato Grosso ocupa a décima posição com produção estimada em 12.659 toneladas.

Apesar do potencial descrito para o maracujá e a importância econômica para o Brasil, é incipiente número de cultivares lançados no mercado com características definidas e garantia de origem, sendo que os plantios comerciais com maior expressão têm-se limitado ao emprego de sementes das espécies comerciais *Passiflora edulis* Sims (maracujá amarelo) e *Passiflora alata* (maracujá-doce) (Souza e Melletti, 1997; Faleiro et al., 2005).

Portanto, pesquisas envolvendo a prospecção, conservação, caracterização e uso de germoplasma do maracujazeiro, são imprescindíveis para subsidiar a incorporação de características agronômicas de interesse nas espécies comerciais em programas de melhoramento genético (Faleiro et al., 2005).

## **2.5. Conservação de germoplasma**

O termo germoplasma, de acordo com Allard (1971), é a soma de todo material hereditário de uma espécie, podendo ser na forma de pólen, anteras,

plantas, sementes, tecidos (meristemas, calo), células ou estruturas simples. Outras informações ampliam a denotação do termo, considerando como germoplasma todo indivíduo ou clone que representa um tipo, espécie ou cultura que pode ser conservado por razões agronômicas, históricas, ou ecológicas, como também pode ser considerado o material genético que controla a hereditariedade, constituindo a base física da herança transmitida entre gerações por células reprodutivas (IBPGR, 1991; Pereira et al., 2010).

Desde a década de 70, a conservação de germoplasma vegetal como uma atividade científica vem sendo proposta como uma forma de prevenção da erosão genética, visando o desenvolvimento de técnicas para a conservação por longo prazo da variabilidade genética e para o melhoramento da produtividade agrícola (FAO, 1997). Os recursos genéticos vegetais podem ser conservados em diferentes formas, como: pólen, sementes, ramo, bulbo, em cultura de tecidos ou banco de genes (Kami, 2012).

No Brasil, a erosão genética em espécies de *Passiflora* vem ocorrendo de forma significativa. Fatores como a crescente utilização de novas áreas do Centro-Norte para fins agrícolas e o crescimento industrial têm implicado na eliminação de espécies selvagens e desaparecimento de muitos genótipos que poderiam ser utilizados no melhoramento genético do maracujazeiro. Portanto, é fundamental a criação, ampliação e manutenção de um maior número de bancos de germoplasma (Faleiro et al., 2005; Ferreira, 2005; Faleiro et al., 2011).

As formas de conservação de germoplasma são: conservação *in situ* e conservação *ex situ* (Nick et al., 2010). A conservação *in situ* é a manutenção e recuperação de populações viáveis de espécies em seus meios naturais, como em parques, reservas biológicas ou reservas ecológicas; e para espécies domesticadas ou cultivadas, nos meios onde tenham desenvolvido suas propriedades características (CDB, 1992).

A conservação *ex situ* é realizada fora dos seus habitats naturais em coleções, sendo os principais tipos classificados como: Coleção Base, Coleção Ativa, Coleção de Trabalho, Coleção a Campo; Coleção *in vitro*, Coleção em criopreservação, Coleção nuclear e Banco genômico (Santos, 2000; Neto, 2004).

Tradicionalmente os recursos genéticos de grande parte das espécies vêm sendo conservados de forma *ex situ* em coleções de campo. Sabe-se, porém, que a

conservação em campo apresenta desvantagens que limitam sua eficácia e ameaçam a segurança dos recursos genéticos vegetais conservados desta forma (Engelmann, 2004).

As coleções permanecem expostas a desastres naturais, ataques de pragas e patógenos, os custos do trabalho e os requisitos para o pessoal técnico são elevados, e, ainda, a distribuição e troca de bancos de germoplasma de campo é bastante difícil (Engelmann, 2004). Além disto, a manutenção de genótipos diferentes em um único local pode causar a redução no vigor e mesmo morte das plantas, ao expor algumas linhagens a severo estresse fisiológico (Santos, 2000).

Existem cerca de 50 coleções de germoplasma de *Passiflora* espalhadas pelo mundo, nas quais contêm mais 1.200 acessos, incluindo as possíveis duplicatas. No Brasil, esse acervo consta de apenas de 67 espécies e 599 acessos, distribuídos em oito coleções, na forma de BAGs (Banco Ativos de Germoplasma), instalados mantidos em sua maioria por instituições públicas de pesquisa (Ferreira, 2005; Meletti et al., 2005).

As coleções são geralmente conservadas em campo, em casa de vegetação/telado, no entanto, algumas espécies de Passifloraceae apresentam exigências muito particulares para se desenvolver, sendo extremamente difícil seu cultivo em campo (Ferreira, 2005; Bernacci et al., 2005).

Muitas espécies têm sido perdidas, devido às condições adversas em algumas regiões e à incidência de patógenos limitantes em outros. Alguns são mantidos sob a forma de sementes em câmaras frias ou geladeiras, o qual necessita periodicamente da reinstalação dos campos, quando há necessidade de rejuvenescimento dos estoques (Ferreira, 2005; Meletti et al., 2005).

Algumas espécies têm sido mantidas *in vitro*, mediante técnicas de cultura de tecidos. E mais recentemente, trabalhos sobre a criopreservação de sementes vêm sendo desenvolvidos, de modo a reduzir os custos e perdas comuns aos BAGs, bem como manter a viabilidade das espécies por tempo maior (Meletti et al., 2005).

## **2.6. Germinação de sementes**

A germinação das sementes é o processo que incorpora os eventos de retomada do crescimento do embrião, que estava anteriormente em estado quiescente ou dormente e termina com o alongamento do eixo embrionário. Para a

maioria das sementes, o processo se inicia com a embebição de água. Normalmente o sinal visível de que a germinação foi completa é a emergência da radícula do embrião através do tegumento da semente (Bradford, 1990; Bewley, 1997).

O teste germinação objetiva determinar o potencial máximo de germinação de um lote de sementes, o qual pode ser usado para comparar a qualidade de diferentes lotes e também estimar o valor para semeadura em campo (Brasil, 2009).

Os fatores substrato e temperatura são componentes básicos para a condução do teste de germinação, uma vez que a resposta fisiológica das sementes é variável em substratos e temperaturas diferentes (Barbosa e Barbosa, 1985; Bewley e Black, 1994; Carvalho e Nakagawa, 2000; Stockman et al., 2007).

Os eventos subsequentes à germinação, incluindo a mobilização das reservas de armazenamento estão associados com o crescimento da plântula. No entanto, muitas espécies ainda que apresentem sementes viáveis e intactas não conseguem germinar em condições favoráveis, sendo atribuído a esse fenômeno o nome de dormência de sementes (Bewley, 1997; Smith et al., 2003).

A dormência de sementes pode ser causada por substâncias inibidoras, resistência mecânica dos tecidos externos ao embrião, imaturidade do embrião ou dormência do próprio embrião (Bewley, 1997; Baskin e Baskin, 2001; Smith et al., 2003).

No que se refere à germinação de sementes de espécies do gênero *Passiflora*, Kuhne (1968) afirma que é bastante irregular, podendo se estender de dez dias a três meses. Não se conhece o período de viabilidade da maioria das espécies do gênero e para aquelas em que ele é conhecido, observa-se longo período de dormência, natural ou induzida que impede a obtenção de material de propagação em quantidade suficiente para a maioria dos estudos necessários (Meletti et al., 2005).

Segundo Morley-Bunker (1974), muitas espécies de *Passiflora* apresentam dormência em suas sementes relacionada a mecanismos de controle de água para o interior da semente. O tegumento espesso das sementes é citado como o fator limitante à permeabilidade. Em estudos para diferentes espécies foram observados que tecidos que cercam o embrião, como o endosperma e perisperma podem restringir o crescimento radicular (Watkins e Cantliffe, 1983; Bradford, 1990; Welbaum e Bradford, 1990).

A germinação de sementes de maracujá é influenciada por muitas substâncias inibidoras (esteroides e triterpenoides) e redutoras (açúcares redutores) que estão presentes no arilo, capa de constituição gelatinosa, rica em pectina, que envolve completamente as sementes. O arilo também pode conter substâncias reguladoras de crescimento que contribuem para a desuniformidade na germinação (Pereira e Dias, 2000; Martins et al., 2010).

## **2.7. Tolerância à dessecação**

A tolerância à dessecação é definida como a capacidade que o organismo possui em restabelecer suas funções metabólicas ao ser reidratado, após passar por período de secagem em equilíbrio higroscópico do ar (Alpert, 2000). Essa característica pode ser observada em sementes, pólen, esporos, entre outros, atuando como mecanismo de adaptação para a sobrevivência, conferindo considerável longevidade em organismos, pois permite que as atividades metabólicas sejam suspensas durante períodos de stress (Hong e Ellis, 1996).

As sementes são a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores, sendo por isso, a forma mais comum de conservação *ex situ* (Santos, 2000). A longevidade varia entre as espécies, podendo também variar entre acessos dentro de uma espécie devido a diferenças no genótipo e procedência (Hong e Ellis, 1996).

As sementes durante o seu desenvolvimento e maturação, desenvolvem a capacidade para sobreviver à dessecação, embora o máximo grau de tolerância à dessecação atingida e a taxa à qual ele se desenvolve variam consideravelmente entre as espécies. Nem todas as sementes respondem ao ambiente antes e depois de armazenados sob as mesmas condições. Diante disso, foram definidas três principais categorias de comportamento das sementes ao armazenamento (Hong e Ellis, 1996).

São classificadas como sementes ortodoxas aquelas que podem ser secas, sem danos, a baixos níveis de umidade, aproximadamente 5%, e mantidas em temperaturas baixas no armazenamento. A longevidade aumenta com a diminuição do teor de umidade e temperatura das sementes, de forma quantificável e previsível, sendo, por isso, adotadas como forma de armazenamento pela maioria dos bancos

de sementes (Roberts, 1973; Engelmann, 2000; Santos, 2000; Berjak e Pammenter, 2003).

Barbedo e Filho (1998) afirmam que as sementes ortodoxas, geralmente, não só toleram a dessecação, mas, provavelmente, dependem dela para redirecionar os processos metabólicos do desenvolvimento em direção à germinação. No entanto, estudos demonstram que parece haver limites de desidratação, abaixo do qual não há mais vantagens adquiridas, podendo ser prejudiciais às sementes (Ellis et al., 1990; Berjak e Pammenter, 2008).

No entanto, existem plantas que produzem sementes recalcitrantes, que incluem grande número de frutas tropicais, espécies arbóreas e arbustivas. Estas passam por pouca ou nenhuma secagem na maturação e permanecem sensíveis a dessecação, tanto durante quanto após o seu desenvolvimento, sendo que a maioria ou todas as sementes são mortas por dessecação a 15 - 20% de umidade, o que dificulta o armazenamento em baixas temperaturas (Roberts, 1973; Hong e Ellis, 1996; Engelmann, 2000; Santos, 2000; Berjak e Pammenter, 2003; Berjak e Pammenter, 2008).

Hong e Ellis (1996), afirmam que as sementes recalcitrantes ao serem submetidas à secagem, têm a viabilidade reduzida, podendo alcançar teor de água crítico caso o processo continue, reduzindo a viabilidade à zero. Além disso, a maioria dessas sementes tem sido também caracterizada pelo tempo curto de vida após colheita, estimado em dias ou meses, ou para algumas espécies de clima temperado, talvez um ano ou dois (Berjak e Pammenter, 2008).

Atualmente, pesquisadores estão propondo nova classificação para a classe, para distinguir as espécies com comportamento de armazenamento de sementes recalcitrantes, mas que diferem consideravelmente no grau de sensibilidade a dessecação, na longevidade em armazenamento hidratado e a sensibilidade ao frio (Hong e Ellis, 1996; Berjak e Pammenter, 1994; Barbedo e Bilia, 1998; Berjak e Pammenter, 2003;).

As sementes recalcitrantes possuem algumas características importantes como a capacidade de germinar imediatamente após a separação da planta-mãe e a presença de açúcares solúveis em sua constituição (Barbedo e Filho, 1998).

Finalmente, estudos recentes identificaram espécies exibindo uma forma intermediária de comportamento no armazenamento das sementes. Estas sementes

podem tolerar parcialmente a dessecação até níveis relativamente baixos de teor de umidade (cerca de 7% de umidade), permanecem viáveis por um período superior ao das recalcitrantes, mas inferior ao das ortodoxas, e são prejudicadas quando submetidas ao armazenamento a baixas temperaturas, o que dificulta o processo criogênico (Ellis et al., 1990; Hong e Ellis, 1996; Engelmann, 2000; Santos, 2000).

Os efeitos da tolerância à dessecação em plantas ocorrem em níveis celulares para subcelulares. Por isso, devem-se incluir diferentes mecanismos para prevenir dois tipos de danos bioquímicos que estão associados com a dessecação: a degradação oxidativa, devido ao acúmulo de agentes, tais como radicais livres; e modificações estruturais e no metabolismo, causadas principalmente por alterações na configuração de macromoléculas e rompimento de membranas (Alpert, 2000).

## **2.8. Armazenamento de sementes**

Há dois aspectos práticos nos contrastantes padrões de comportamento de armazenamento de sementes: primeiro, o efeito da dessecação sobre a viabilidade das sementes; e segundo, a resposta de longevidade para o ambiente de armazenamento (Hong e Ellis, 1996).

A longevidade é definida como o período de tempo em que a semente permanece viável (Popinigis, 1977). O armazenamento de sementes é uma prática normalmente utilizada com o objetivo de manter a viabilidade das sementes por um período superior à sua longevidade natural (Nodari et al., 1998).

A longevidade das sementes varia de acordo com o genótipo, sendo que o período de conservação do seu potencial fisiológico depende, em grande parte, do grau de umidade e das condições do ambiente de armazenamento (Carvalho e Nakagawa, 2000). Outros fatores importantes incluem as características das sementes, como fisiologia, morfologia, composição química e maturidade (Bonner, 2008).

A umidade das sementes irá alcançar um equilíbrio com a umidade do ambiente de armazenamento com base nas diferenças entre as pressões de vapor e a natureza química das sementes (Bonner, 2008).

O ambiente de armazenamento é muito importante para o prolongamento da vida útil das sementes, e seu objetivo é reduzir o metabolismo das sementes tanto quanto o possível, sem danificá-las, e ainda impedir o ataque por microrganismos. A

taxa metabólica ideal em armazenagem deve conservar o máximo possível das reservas alimentares armazenados nas sementes, e atuar em um nível que mantenha a integridade dos embriões (Bonner, 2008).

Sementes que possuem tegumentos impermeáveis que inibem a absorção de umidade e oxigênio para a atmosfera circundante podem ser armazenadas durante muitos anos em temperatura ambiente, como ocorre com muitas espécies de leguminosas (Bonner, 2008).

Geralmente, as sementes ortodoxas são armazenadas com conteúdo de umidade entre 5 a 10%, utilizando-se embalagens à prova de umidade, de forma a manter esses níveis. Como o teor de umidade determina a temperatura em que as sementes podem ser armazenadas, as sementes ortodoxas podem ser mantidas em praticamente qualquer temperatura, sendo comum o armazenamento seco com baixa temperatura, cerca de -18 a -20 °C (Bonner, 2008). Em armazenamento aberto (quando as sementes são expostas diretamente ou indiretamente a umidade relativa do ambiente) em temperatura ambiente, a longevidade de sementes ortodoxas varia consideravelmente (Hong e Ellis, 2003).

Para a manutenção da viabilidade em médio prazo – 2 a 10 anos – o armazenamento em embalagens herméticas acondicionadas em diferentes ambientes, pode ser bem sucedido. Já a criopreservação é uma técnica utilizada para a manutenção da viabilidade de sementes ortodoxas a longo prazo (Hong e Ellis, 2003).

Sementes recalcitrantes de clima temperado requerem diferentes condições de armazenamento, sendo em geral mantidas a temperaturas entre 0 a 5 °C, pois a exposição a temperaturas mais baixas (menores que -3 °C) pode causar a morte, aparentemente devido a formação de gelo intracelular. Para as recalcitrantes tropicais, os limites são geralmente entre 12 a 20 °C (Bonner, 2008).

Não existe um método satisfatório de manter a viabilidade de sementes recalcitrantes a médio e longo prazo, uma vez que não toleram a dessecação, dificultando o armazenamento em baixas temperaturas. Por isso a longevidade dessas sementes é curta, a partir de algumas semanas ou meses para espécies tropicais ou até três anos para várias espécies de clima temperado (Hong e Ellis, 2003).

Nas sementes intermediárias, o teor de umidade crítico durante armazenamento hermético, varia consideravelmente com a espécie, grau de maturidade e método de extração de sementes e/ou manuseio. Em geral, sementes extraídas na maturidade, toleram a dessecação para teores de umidade em equilíbrio entre 40 e 50% de umidade relativa (Hong e Ellis, 1996; Black et al., 2002; Hong e Ellis, 2003).

Sementes intermediárias de clima tropical, armazenadas com teor de umidade baixo (7 a 10%), tem sua longevidade reduzida quando mantidas em ambiente com temperaturas abaixo de 10 °C. O mesmo não ocorre para as de clima temperado. Portanto, existe um teor de umidade em equilíbrio considerado como ideal, que deve ser avaliado para cada espécie (Hong e Ellis, 2003).

Sob a condição ideal, sementes intermediárias podem ser armazenadas a médio prazo com sucesso. O armazenamento a longo prazo também foi relatado através da criopresevação de embriões (Hong e Ellis, 2003).

## **2.9. Criopresevação: histórico e metodologias**

A criopresevação ou crioconservação é um método de conservação de material biológico em temperaturas ultrabaixas (até -196 °C) em Nitrogênio Líquido (NL<sub>2</sub>) ou em sua fase de vapor (-150 °C), que permite levar o material ao estado de não divisão celular e metabolismo reduzido drasticamente, mantendo ainda assim, as estruturas celulares intactas, o que permite sua viabilidade após descongelamento (Engelmann, 2004; Carvalho e Otoni, 2010).

A criopresevação é um método de conservação *ex situ* que vem sendo desenvolvido desde a década de sessenta com os estudos de Sakai sobre o congelamento de brotos de amoreira em NL<sub>2</sub> após o processo de desidratação (Carvalho e Otoni, 2010).

Nas últimas décadas, inúmeros trabalhos de criopresevação de plantas de propagação vegetativa, cereais, gramíneas, plantas ornamentais, frutíferas tropicais e temperadas, leguminosas e oleaginosas, estimulantes, medicinais e aromáticas, entre outras, vêm sendo publicados na literatura (Santos, 2000).

Para tanto, diferentes metodologias e tipos de germoplasma são utilizados nesses estudos, tais como: criopresevação de abacaxi (González-Arno et al., 2000), pólen do milho (Yamaguchi e Ishikawa, 2000), tecidos de árvores de florestas

tropicais (Maruyama e Ishii, 2000), embriões somáticos (Shimonishi et al., 2000), meristemas *in vitro* (Matsumoto, 2000), entre outros.

A principal vantagem da criopreservação é que uma vez que o material tenha sido preservado com êxito em  $NL_2$ , teoricamente o mesmo pode ser conservado em princípio indefinidamente, por causa da cessação dos processos metabólicos, resultando na prevenção de reações químicas dependentes do processo de difusão (Koster, 1991; Engelmann, 2004).

Especificamente para a célula, os efeitos do estado vítreo são muitos, podendo-se citar a limitação da perda de água e da cristalização de sais e proteínas no citoplasma, prevenção de colapso celular e proteção contra mudanças no pH à medida que a água é removida (Koster, 1991).

Outras vantagens incluem: baixos custos e espaço mínimo de armazenamento e reduzida manutenção do trabalho em comparação com coleções vivas e mesmo quando em comparação com a manutenção de culturas de tecidos. Além disso, uma vez armazenado, não há risco de nova contaminação por fungos ou bactérias (Engelmann, 2004).

Cerca de 80 espécies já foram congeladas com algum sucesso em Nitrogênio Líquido ( $-196^{\circ}C$ ) ou vapor (entre  $-154^{\circ}C$  a  $-196^{\circ}C$ ), embora ainda não exista um protocolo comum a todas as espécies, pois poucos são os materiais que suportam as baixas temperaturas em seu estado natural, sendo necessária a ação de crioprotetores, acondicionamento prévio e estudos mais aprofundados para cada espécie em particular (Valois et al., 2001).

### **2.9.1. Método Clássico**

O método clássico utiliza o congelamento em duas fases: congelamento lento, onde a temperatura é reduzida a uma velocidade definida ( $1$  a  $10^{\circ}C\ min^{-1}$ ) para valores próximos de  $-40^{\circ}C$ ; seguida do congelamento rápido, através da imersão direta do material em  $NL_2$  (Santos, 2000; Engelmann, 2004; Carvalho e Otoni, 2010).

O método foi baseado nos eventos físico-químicos que ocorrem durante o processo de congelamento em condições naturais nas plantas de clima temperado. À medida que a temperatura decresce lentamente e aproxima-se de  $-10^{\circ}C$ , parte crescente da solução extracelular posteriormente se transforma em gelo, enquanto o meio intercelular permanece descongelado. Se o evento ocorrer lentamente, isso

levará a uma diferença de pressão de vapor da água na célula, fazendo com que a água difunda do interior das células para a solução extracelular e seja congelada (Santos, 2000; Carvalho e Otoni, 2010). O fenômeno leva à desidratação progressiva do meio intercelular, evitando assim a formação de cristais de gelo em seu interior. O processo ocorre até o momento em que o potencial hídrico da célula desidratada iguala-se ao do meio extracelular, um equilíbrio é estabelecido e a desidratação adicional não ocorrerá contanto que a temperatura permaneça constante. O fenômeno é chamado de desidratação induzida por congelamento (Santos, 2000; Carvalho e Otoni, 2010).

Em resumo, trata-se de um método de congelamento lento complexo no quais fatores como a velocidade de congelamento e a temperatura de pré-congelamento têm papéis cruciais na preservação da viabilidade do material (Santos, 2000). Foi bastante utilizado para criopreservação de recursos vegetais até a década de 1980 (Kami, 2012).

### **2.9.2. Vitrificação**

O método contemporâneo baseado na vitrificação, compreende a transição de um estado líquido para o estado vítreo, metaestável e amorfo, que em sistemas biológicos é dependente de aumento da viscosidade da célula, até alcançar a temperatura de transição vítrea, evitando a cristalização do gelo (Sakai, 2000; Benson, 2008; Carvalho e Otoni, 2010). Essa transição não envolve mudanças químicas, mas apenas mudanças físicas na viscosidade do líquido (Santos, 2000).

Segundo Kartha (1985) os únicos estados físicos existentes abaixo de  $-130^{\circ}\text{C}$  são o estado cristalino ou o estado vítreo, onde em ambos a difusão, dependendo da escala de tempo da armazenagem é considerada insignificante, a viscosidade é muito elevada, a energia cinética molecular é muito baixa e reações metabólicas impulsionadas por energia térmica ocorrerão muito lentamente ou serão paralisadas completamente.

Para a criopreservação ser bem sucedida, é essencial evitar o congelamento intracelular que ocorre durante o resfriamento rápido em nitrogênio líquido (Sakai, 2000; Santos, 2000; Kami, 2012). Assim, a vitrificação do citoplasma é obtida através da desidratação para um baixo teor de umidade na qual não existe água livre para a cristalização antes mergulhar as amostras em nitrogênio líquido. Com

isto, a solução celular se torna altamente concentrada, sendo possível sua vitrificação (Sakai, 2000; Santos, 2000).

A desidratação das células pode ser obtida por evaporação da água ou por tratamentos com solução de crioprotetores químicos ou açúcares, sendo muitas vezes utilizada a combinação dos dois (Santos, 2000).

A vitrificação tem como resultado final o aumento de concentração de soluto até uma viscosidade crítica, que inibe a aproximação de moléculas de água para formar o gelo. Porém, o reaquecimento pode também afetar a estabilidade de gelo e é dependente do tipo de tecido, das taxas de resfriamento e os crioprotetores utilizados. Em geral, sobrevivência mais elevada é obtida quando arrefecimento lento é seguido por um rápido reaquecimento (Benson, 2008).

Outros métodos foram criados a partir de modificações no método de vitrificação, sendo os principais: encapsulamento-desidratação, encapsulamento-vitrificação, vitrificação em gotas e congelamento rápido (Carvalho e Otoni, 2010).

## **2.10. Fatores críticos: desidratação, congelamento e descongelamento**

Para o desenvolvimento da criopreservação de plantas tropicais, estudos sobre o pré-condicionamento para a indução de tolerância a desidratação e à temperatura do  $NL_2$  parece ser um dos pontos mais importantes (Sakai, 2000; Santos, 2000).

Para a criopreservação de sementes, o teor de umidade é provavelmente o fator mais crítico para a definição de protocolo de criopreservação. A forma de armazenamento das sementes, seu comportamento e sensibilidade à dessecação também são fatores intrínsecos que implicam níveis precisos de dessecação e tolerância ao nitrogênio líquido pelas espécies (Ospina et al., 2000).

O teor de água em sementes é um dos fatores intrínsecos para o processo criogênico, já que os vários tecidos de uma planta apresentam diferentes níveis de tolerância à desidratação, resultando em sensibilidade diferente à exposição ao nitrogênio líquido (Santos, 2000). No caso das sementes, ao atingirem a maturidade fisiológica, as ortodoxas se encontram em média com o teor de água entre 30 a 50%, enquanto nas recalcitrantes esses percentuais são ainda maiores, entre 50 a 70% (Carvalho e Nakagawa, 2000).

Durante o processo de desidratação as sementes podem apresentar comportamentos diferenciados em resposta a diminuição do teor de água. A desidratação pode provocar alterações na integridade estrutural e na funcionalidade da membrana, bem como alterações em suas propriedades físico-químicas (Santos, 2000).

A água tem muitas funções biológicas nas células de organismos vivos, atuando como um importante solvente, via de transporte e um constituinte essencial e estabilizador da estrutura das macromoléculas e organelas. Além disso, ao se remover a água das células, os solutos se tornam mais concentrados, aumentando possivelmente a taxa de reações químicas destrutivas, e em alguns casos os solutos podem cristalizar-se, mudando o potencial iônico e pH da solução intracelular, muitas proteínas começam a desnaturar-se irreversivelmente, levando a perda de compartimentalização celular (Koster, 1991; Kramer e Boyer, 1995; Barbedo e Bilia, 1998).

As alterações na integridade estrutural e funcional na membrana têm sido observadas pelo vazamento de várias soluções citoplasmáticas que ocorre após sua reidratação, indicando que a velocidade e extensão do vazamento citoplasmático estão positivamente correlacionadas ao grau de sensibilidade à desidratação, causando mudanças no comportamento e na composição relativa da membrana, com perda parcial da semi-permeabilidade (Santos, 2000). Willians e Leopold (1989) demonstraram que a temperatura para a formação desse estado vítreo também depende do conteúdo de água do embrião.

Na fase de congelamento, a injúria ocorre devido a inúmeros fatores como a espécie de planta, o estado de tolerância ao congelamento e as condições de congelamento. No caso do congelamento lento, a injúria é causada principalmente pela desidratação excessiva ou formação de gelo dentro das células. De modo geral, parece ser um consenso, de que o dano mais significativo causado pelo congelamento às células vivas está relacionado a déficit hídrico (Santos, 2000). Nesse aspecto, a membrana plasmática tem um papel central no comportamento celular durante os ciclos de congelamento/descongelamento, sendo que a sobrevivência da célula é essencialmente consequência da estabilidade da membrana plasmática (Santos, 2000).

O descongelamento é outra etapa crítica no desenvolvimento de um protocolo de criopreservação. Entre os problemas, pode-se citar a formação de cristais de gelo durante essa fase, que pode ocorrer de duas maneiras: com o aumento da temperatura ocorre a desvitrificação, liberando água na forma líquida (que estava presente nas células) que pode se congelar antes que a temperatura ambiente seja atingida; na segunda, cristais de gelo diminutos que possam ter se formado durante o congelamento têm a oportunidade de crescer, devido ao aumento da temperatura, formando cristais grandes, os quais então causam rompimento e morte das células (Santos, 2000).

### **2.11. Crioprotetores**

Os crioprotetores podem ser definidos como substâncias químicas que reduzem a injúria sofrida pela célula, durante seu congelamento ou descongelamento (Carvalho e Otoni, 2010). Eles devem ser capazes de penetrar na célula e não ser tóxicos para a célula, sendo usadas somente as concentrações necessárias para a sua eficácia (Benson, 2008).

O efeito protetor foi primeiramente descrito para o glicerol, e mais tarde, para o DMSO. No entanto, muitos crioprotetores causam toxidez ou estresse osmótico nas células (Carvalho e Otoni, 2010).

Estudos revelaram que diversos açúcares poderiam ser utilizados como crioprotetores, como a sacarose e a trealose, devido à capacidade de manter a estabilidade das membranas biológicas tanto no processo de desidratação quanto no congelamento, e ainda por não apresentarem toxicidade para as células vegetais mesmo quando se acumulam em grande quantidade no citoplasma (Santos, 2000; Carvalho e Otoni, 2010).

A presença de grande quantidade de açúcares solúveis dentro de uma célula pode prevenir os efeitos danosos da dessecação, formando ligações de hidrogênio e, assim, substituindo a água na manutenção das estruturas hidrofílicas em sua orientação quando hidratada (Crowe et al., 1988; Koster, 1991).

A escolha do crioprotetor depende do tipo de célula a ser preservada. Para explantes pequenos ou células isoladas, o glicerol é melhor por conferir proteção adequada e ser menos tóxico. Entretanto, no caso de explantes maiores ou

estruturas mais complexas, o DMSO é o mais indicado porque tem maior poder de penetração, sendo geralmente mais eficiente (Santos e Salomão, 2010).

O glicerol penetra na célula, reduzindo a quantidade de gelo formado em qualquer temperatura, ou seja, reduzindo a concentração de sal extracelular e água perdida devido à osmose, com o benefício adicional de reduzir a temperatura a que ocorre, na verdade o congelamento (Benson, 2008).

Os crioprotetores mais utilizados na criopreservação de plantas são glicerol, sacarose, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e os glicóis de menor peso molecular. (Benson, 2008; Santos e Salomão, 2010).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudo

A pesquisa foi realizada no laboratório de Sementes e Plantas Ornamentais do *Campus* Universitário de Cáceres – MT da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT. As sementes foram obtidas do campo experimental localizado na área adjacente ao *campus*, localizado a 16°11'42" de latitude Sul e 57°40'51" de longitude Oeste, temperatura média anual de 26,24°C, precipitação total anual de 1.333 mm e altitude de 118m (Neves et al., 2011).

#### 3.2. Detalhamento do experimento em campo

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos ao acaso, com quatro repetições, quatro plantas por parcela, espaçadas 2,00 x 3,00 m, no sistema de espaldeira, com dois fios de arame situados a 1,50 e 2,00 m do nível do solo.

A adubação inicial foi realizada conforme recomendação técnica para a região e de acordo com análise de solos, utilizando-se 88 g de ureia/cova e 17 g de KCl/cova. Já a adubação pós-plantio foi realizada com 25 g de ureia/cova, 20 g de KCl/cova, uma vez por mês, sendo que após o sexto mês realizou-se adubação única com 60 g de super fosfato simples/cova. Outras medidas básicas de manejo incluíram o controle de plantas espontâneas e de pragas. A irrigação foi feita quando necessário por gotejadores previamente instalados.

A área experimental foi composta de doze espécies de maracujás, sendo 2 espécies comerciais de *Passiflora* (*P. alata* e *P. edulis*) e 10 silvestres do BAG (Banco Ativo de Germoplasma) da UNEMAT. Sobre a origem das espécies, os mesmos foram cedidos pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), numa parceria feita com a Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT).

Quanto à classificação das espécies do BAG, sete pertencem ao subgênero *Passiflora*, sendo as seguintes: *P. quadrangulares*, *P. nitida*, *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. mucronata*, *P. tenuifila* e *P. edulis* (UNEMAT/UFV/UENF 50). As demais pertencem ao subgênero *Decaloba*: *P. foetida*, *P. eichleriana*, *P. micropelata*, *P. suberosa* e *P. morifolia*. Neste estudo, foram avaliadas seis espécies, conforme é mostrado na Figura 1.

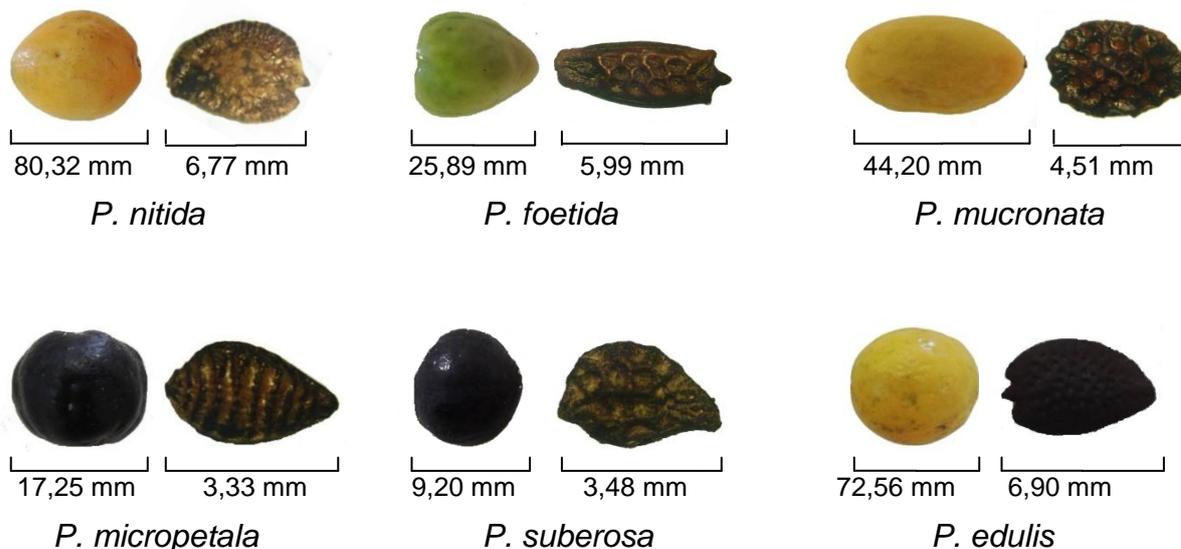


Figura 1. Frutos e sementes de seis espécies de maracujás coletados no Banco Ativo de Germoplasma (BAG). Universidade do Estado de Mato Grosso, Cáceres, 2014.

### 3.3. Armazenamento e quebra de dormência das sementes

Os frutos foram colhidos maduros e destinados ao Laboratório de Sementes e Plantas Ornamentais, onde foram seccionados transversalmente, e a polpa contendo as sementes retiradas. O método para remoção do arilo foi manual com fricção das sementes sobre peneira de malha inferior ao seu tamanho, com auxílio de cal e água corrente até a limpeza total da mucilagem. Após isso, foram distribuídas em bandejas por dois dias em temperatura ambiente de laboratório ( $27,7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,9$ ) para secagem, sendo depois armazenadas em recipientes de vidros mantidos em geladeira com temperatura aproximada de  $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Algumas espécies foram submetidas a tratamentos para quebra de dormência, na qual o método escolhido baseou-se nos resultados de Marostega (2014), sendo as seguintes:

- a) *Passiflora nitida*: ácido giberélico ( $\text{GA}_3$ ) na concentração de 2000 mg/L, durante seis horas, com ausência de luz.
- b) *Passiflora mucronata*: nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) na concentração de 1%, durante vinte e quatro horas.
- c) *Passiflora micropetala*: escarificação mecânica na região distal em relação ao eixo embrionário da semente, friccionando-as por 3 segundos na lixa nº 120.

Em todos os tratamentos químicos, as sementes foram distribuídas em caixas de acrílico (“Gerbox”) contendo papel mata-borrão previamente umedecidos com a solução, na proporção de duas vezes e meios o peso do papel, mantidas em temperatura de 25° C.

### **3.4. Primeira fase: adequação do teor de umidade**

#### **3.4.1. Determinação do Teor de Água Inicial**

Foi realizado através do método de estufa a 105°C (± 3°C), conforme as recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), utilizando-se duas subamostras de 50 sementes mantidas por 24 horas em estufa de circulação forçada.

A fórmula utilizada foi:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(Pi - Pf)}{(Pi - T)} \times 100$$

*Pi* = peso inicial (g)

*Pf* = peso final (g)

*T* = peso da tara do recipiente (g)

#### **3.4.2. Adequação do Teor de Água Final**

Para obtenção de amostras com diferentes teores de água, as sementes foram submetidas ao processo de hidratação ou secagem. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (6%, 8%, 10% e 12% b.u) e quatro repetições de 50 sementes cada. A perda ou ganho de água pelas sementes foram definidas por meio da seguinte fórmula (Cromarty et al.;1985):

$$Mf = Mi \times \frac{(100 - TAi)}{(100 - TAd)}$$

*Mf* = peso final de sementes (g)

*Mi* = peso inicial de sementes (g)

$TAi$  = teor de água inicial (%)

$TAd$  = teor de água desejado (%)

Através dos resultados referentes a essa fórmula, foi definido o peso para qual cada amostra de sementes deveria ser ajustado, a fim de se alcançar os teores de água desejados (6, 8, 10 ou 12%). Assim, as amostras foram submetidas ao processo de secagem ou umedecimento, utilizando-se os seguintes procedimentos:

- **Secagem de sementes:** as sementes amostradas foram colocadas em um dessecador contendo sílica gel, e pesadas a cada duas horas, até atingirem os pesos referentes aos teores de água estabelecidos.

- **Umedecimento de sementes:** as sementes amostradas foram colocadas em câmara úmida, contendo água e mantidas na temperatura de 25 °C, sendo pesadas a cada hora, até atingirem os pesos referentes aos teores de água estabelecidos.

### 3.5. Variáveis analisadas

#### 3.5.1. Teste Padrão de Germinação (TPG)

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, distribuídas em caixas de acrílico (“Gerbox”) sobre uma folha de papel mata-borrão e umedecidas com água destilada, na proporção de duas vezes e meia o peso do papel. As caixas foram colocadas em sacos de polietileno transparentes e acondicionadas em incubadora refrigerada (tipo B.O.D.), mantidos à temperatura constante de 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, por um período de 30 dias.

#### 3.5.2. Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

A partir do teste padrão de germinação, foi realizado diariamente, durante os 30 dias a contagem do número de sementes germinadas, sendo para tanto consideradas, apenas aquelas que rompessem o tegumento emitindo radícula com pelo menos 2 mm de comprimento (Hadas, 1976). Com esses dados, foi calculado o índice de velocidade de germinação conforme Maguire (1962):

$$IVG = + \frac{G_1}{D_1} + \frac{G_2}{D_2} + \dots + \frac{G_n}{D_n}$$

$G_1, G_2, G_n$  = número de sementes germinadas na primeira, na segunda e na última contagem.

$D_1, D_2, D_n$  = número de dias da semeadura da primeira à última contagem.

### 3.5.3. Porcentagem de germinação das sementes

Foi obtida através do número total de sementes germinadas ao final dos 30 dias de avaliação do teste padrão de germinação, calculada para cada repetição dos tratamentos, sendo expressa em porcentagem (%), através da fórmula:

$$\%G = \frac{(Ni \times 100)}{Ns}$$

$Ni$  = número de sementes germinadas.

$Ns$  = número de sementes semeadas.

### 3.5.4. Teste de Emergência de Plântulas

Em cada tratamento, foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, distribuídas em caixas de acrílico (“Gerbox”) contendo o substrato comercial “Vermiculita” na quantidade de 0,040 gramas, e umedecidas com água destilada, conforme recomendação das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). As caixas foram distribuídas e mantidas em laboratório sob temperatura ambiente (27,7 °C ± 1,9) e foram avaliadas diariamente, por um período de 30 dias.

### 3.5.5. Índice de Velocidade de Emergência (IVE)

A avaliação do teste de emergência de plântulas foi realizada considerando diariamente, o número de plântulas emergidas. Com esses dados, foi calculado o índice de velocidade de emergência conforme Maguire (1962):

$$IVE = + \frac{E_1}{D_1} + \frac{E_2}{D_2} + \dots + \frac{E_n}{D_n}$$

$E_1, E_2, E_n$  = número de plântulas emergidas na primeira, na segunda e na última contagem.

$D_1, D_2, D_n$  = número de dias da semeadura da primeira à última contagem.

### **3.5.6. Porcentagem de Emergência de Plântulas**

Foi obtida através do número total de plântulas emergidas ao final dos 30 dias de avaliação do teste de emergência, calculada para cada repetição dos tratamentos, sendo expressa em porcentagem (%), através da fórmula:

$$\%G = \frac{(Ni \times 100)}{Ns}$$

$Ni$  = número de plântulas que emergiram.

$Ns$  = número de sementes semeadas.

### **3.5.7. Massa de matéria seca**

Ao término das avaliações, as plântulas normais obtidas do teste de emergência foram pesadas para determinação da massa fresca. Em seguida, foram acondicionadas em sacos de papel e levadas para a estufa de circulação de ar a 70 °C por 72 horas, sendo pesadas para determinar a massa de matéria seca das plântulas. Os resultados foram expressos em g/plântula.

### **3.5.8. Comprimento da parte aérea da plântula**

Para esta avaliação, foram utilizadas as plântulas provenientes do teste de emergência, ao final dos 30 dias de avaliação, sendo o comprimento da parte aérea das mesmas medidas com uma régua milimetrada. O comprimento médio da parte aérea das plântulas de cada repetição foi obtido dividindo-se a soma das medidas tomadas das subamostras pelo número de plântulas normais mensuradas. O resultado foi expresso em cm de parte aérea/plântula.

### **3.5.9. Comprimento da radícula da plântula**

Plântulas normais provenientes do teste de emergência foram utilizadas para determinação do comprimento da radícula, medindo-as com uma régua milimetrada. O comprimento médio da radícula das plântulas de cada repetição foi obtido dividindo-se a soma das medidas tomadas das subamostras pelo número de plântulas normais mensuradas. O resultado foi expresso em cm de radícula/plântula.

### 3.6. Análise dos dados: primeira fase

Os dados referentes ao TPG e Vigor foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk utilizando-se o programa estatístico R versão 2.15.2 (R Core Team, 2012).

Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de regressão polinomial, através do programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2000). Através das equações polinomiais obtidas, foi determinado o ponto de máximo de cada equação.

### 3.7. Segunda fase: criopreservação em NL<sub>2</sub>

#### 3.7.1. Considerações para a criopreservação das sementes

Após os processos descritos, os resultados referentes à análise estatística foram utilizados para definição do teor de água das sementes a serem criopreservadas em cada espécie.

As melhores respostas obtidas no experimento com diferentes teores de umidade nas sementes de *Passiflora*, bem como o ponto de máximo das equações obtidas nas regressões polinomiais das variáveis significativas foram utilizados para definição do teor de umidade (b.u. %) a ser utilizado na criopreservação das sementes em nitrogênio líquido (NL<sub>2</sub>).

Portanto, conforme pode ser observado na Figura 2, as sementes das espécies *P. micropetala*, *P. suberosa* e *P. foetida*, que não apresentaram resultados significativos quanto aos diferentes teores de umidade, foram criopreservadas com o seu teor de umidade inicial, com exceção de *P. suberosa*.

Para *P. suberosa* o teor de umidade foi ajustado para 9,5%, tendo em vista que o conteúdo de umidade das sementes é um dos principais fatores que controlam a criopreservação (Hoekstra et al., 2001; Walters et al., 2004) e que para sementes ortodoxas, recomenda-se conteúdos de umidade abaixo de 10%; porém, o intervalo de umidade favorável para o congelamento difere entre as espécies (Silva et al., 2011).

Para *P. nitida* foi utilizado os pontos de máximo das equações obtidas para as variáveis significativas; e *P. mucronata* e *P. edulis* foi considerada a melhor resposta observada nos tratamentos. Com isso, para as sementes de *P. nitida* ajustou-se o

teor de umidade em 10,4%, enquanto que para as de *P. mucronata* e *P. edulis* foi ajustado para 12% em todos os tratamentos (Figura 3).

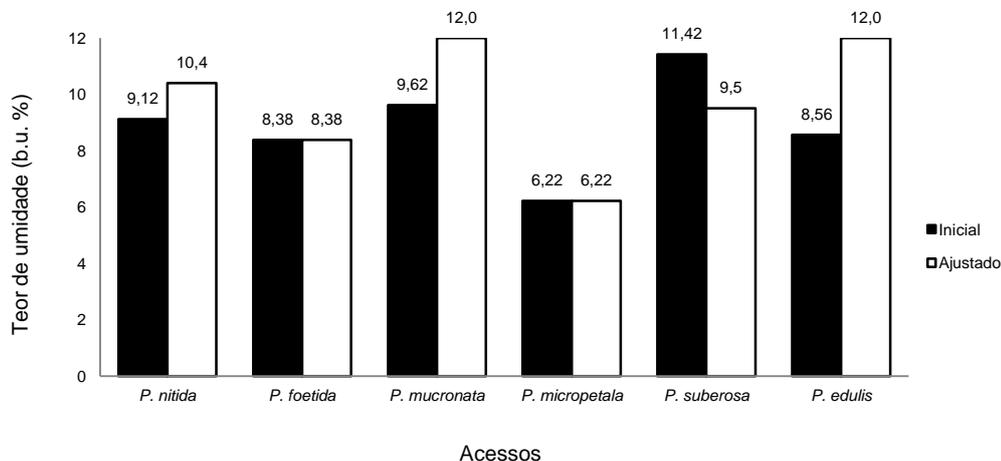


Figura 2. Teores de umidade de sementes natural e ajustados para criopreservação de seis espécies de *Passiflora*. Cáceres - MT, UNEMAT, 2014.

### 3.7.2. Crioprotetores

Foram utilizados como crioprotetores as soluções 7% Dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,3 M de Sacarose, com imersão das sementes durante três horas em temperatura ambiente de laboratório ( $27,7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,9$ ). As sementes foram posteriormente distribuídas em bandejas mantidas em laboratório durante um dia para secagem e adequação ao teor de umidade desejado.

### 3.7.3. Imersão em Nitrogênio Líquido ( $\text{NL}_2$ )

As amostras foram depositadas em embalagens de alumínio, sendo posteriormente armazenadas em um tanque de nitrogênio líquido ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por um período de 120 horas. Nesse ensaio, foram utilizados quatro tratamentos com cinco repetições de 50 sementes, no qual:

- $T_1$  - sementes criopreservadas com adição de DMSO na concentração de 7%;
- $T_2$  - sementes criopreservadas com adição de sacarose na concentração de 0,3 M;
- $T_3$  - sementes criopreservadas com ausência de crioprotetores;
- $T_4$  - controle: sementes que não foram criopreservadas e, portanto, também não continham os crioprotetores.

As amostras das sementes que não foram criopreservadas (T<sub>4</sub> – controle) de *P. nitida* e *P. mucronata*, após adequação do teor de umidade, foram submetidas ao tratamento para quebra de dormência descrita anteriormente, sendo posteriormente distribuídas em caixas “gerbox” destinadas ao Teste Padrão de Germinação e Teste de Emergência de Plântulas. Nas amostras de sementes que foram criopreservadas, o tratamento para quebra de dormência foi realizado após o descongelamento.

#### **3.7.4. Descongelamento**

O método de descongelamento usado foi o banho-maria, a uma temperatura de 37 °C durante 20 minutos. Para tanto, as amostras de sementes contidas nas embalagens de alumínio foram retiradas do NL<sub>2</sub> e depositadas em sacos de polietileno, com o objetivo de evitar qualquer contato direto das sementes com a água.

Depois, as mesmas foram utilizadas para os Testes Padrão de Germinação e emergência de plântulas, já descritos anteriormente, analisando-se as mesmas variáveis:

- **Índice de Velocidade de Germinação (IVG):** metodologia conforme Maguire (1962);
- **Porcentagem de germinação das sementes:** resultados expressos em porcentagem (%);
- **Índice de Velocidade de Emergência (IVE):** metodologia conforme Maguire (1962);
- **Porcentagem de Emergência de Plântulas:** expressa em porcentagem (%);
- **Massa de matéria seca:** os resultados foram expressos em g/plântula;
- **Comprimento da parte aérea da plântula:** resultados expressos em cm de parte aérea/plântula;
- **Comprimento da radícula da plântula:** O resultado foi expresso em cm de radícula/plântula.

#### **3.8. Análise dos dados: segunda fase**

Os dados referentes ao TPG e Vigor foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk utilizando-se o programa estatístico R versão 2.15.2 (R Core Team, 2012).

Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F, sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (FERREIRA, 2000).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Efeito de diferentes teores de umidade.

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios da umidade inicial de sementes das espécies *P. nitida*, *P. foetida*, *P. mucronata*, *P. micropetala*, *P. suberosa* e *P. edulis*, utilizadas para o experimento do efeito de diferentes teores de umidade nas sementes. As médias variaram de 6,99% (*P. micropetala*) a 8,96% (*P. edulis*) de umidade em base úmida. Os valores de umidade de todas as espécies foram ajustados para os teores de 6, 8, 10 e 12%. Os resultados de cada espécie serão apresentados e discutidos abaixo.

Tabela 1. Grau de umidade das sementes de *Passiflora* spp., armazenadas a 7°C

Espécie	Valores Médios	Desvio Padrão
<i>P. nitida</i>	7,46	(±0,18)
<i>P. foetida</i>	8,53	(±0,31)
<i>P. mucronata</i>	8,83	(±0,24)
<i>P. micropetala</i>	6,99	(±0,74)
<i>P. suberosa</i>	7,24	(±0,28)
<i>P. edulis</i>	8,96	(±0,05)

#### ***Passiflora nitida***

Através dos dados analisados, observou-se que os resultados foram significativos ( $P < 0,05$ ) para as variáveis Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e Porcentagem de germinação (G%) com as melhores médias obtidas no tratamento a 10% de umidade com valores de 0,288 e 11% (Tabela 2). Os demais tratamentos igualaram-se estatisticamente, com IVG variando de 0,027 a 0,046 e porcentagem de germinação (G%) que variou de 1 a 2%.

Tabela 2. Médias do Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Porcentagem de Germinação (G%), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Porcentagem de Emergência (E%), Comprimento da Radícula (CR), Comprimento da Parte Aérea (CPA) e Massa de Matéria Seca (MS) obtidas na avaliação do efeito de teores de umidade em seis espécies de *Passiflora*

Espécie	Umidade (%)	Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR (cm)	CPA (cm)	MS (g)
<i>P. nitida</i>	6	0,029b	1,0b	0,493a	17,0a	4,4a	6,4a	0,076a
	8	0,027b	1,0b	0,749a	25,0a	4,2a	5,5a	0,135a
	10	0,288a	11,0a	0,374a	12,5a	4,6a	6,4a	0,061a
	12	0,046b	2,0b	0,272a	9,0a	4,7a	5,5a	0,066a
	CV%	45,62	46,19	57,86	59,06	14,49	23,72	48,37
<i>P. foetida</i>	6	0,107a	11,0a	0,080a	5,0a	5,9a	6,4a	0,009a
	8	0,155a	15,5a	0,025a	1,5a	3,7a	3,1a	0,003a
	10	0,212a	20,5a	0,022a	1,5a	2,6a	3,6a	0,002a
	12	0,157a	14,5a	0,107a	5,0a	5,2a	4,7a	0,006a
	CV%	65,96	61,62	129,49	99,70	74,29	71,89	100,53
<i>P. mucronata</i>	6	0,025b	1,0b	1,737a	43,5a	3,1a	5,1a	0,063a
	8	0,011b	0,5b	2,303a	55,5a	2,9a	5,4a	0,074a
	10	0,030b	1,0b	2,132a	52,5a	2,9a	5,0a	0,073a
	12	0,601a	18,0a	1,825a	44,0a	3,1a	5,1a	0,071a
	CV%	73,98	58,26	16,14	15,77	8,73	4,05	19,18
<i>P. micropetala</i>	6	0,635a	25,5a	0,197a	15,5a	2,1a	3,8a	0,010a
	8	0,855a	30,5a	0,190a	15,5a	1,9a	3,4a	0,010a
	10	0,912a	30,0a	0,220a	15,5a	1,9a	3,5a	0,012a
	12	0,710a	24,0a	0,257a	20,0a	2,1a	3,4a	0,012a
	CV%	29,35	28,28	19,96	17,79	9,45	8,29	31,43
<i>P. suberosa</i>	6	3,132a	66,5a	0,552a	12,0a	2,9a	4,4a	0,011a
	8	2,635a	52,0a	0,615a	13,5a	3,2a	3,8a	0,013a
	10	2,877a	64,5a	0,785a	16,0a	2,8a	4,3a	0,016a
	12	2,302a	53,5a	0,360a	7,5a	3,1a	4,3a	0,008a
	CV%	23,45	21,53	46,08	45,57	18,69	10,89	52,90
<i>P. edulis</i>	6	4,555ab	82,0a	0,930a	31,5a	4,1a	5,5a	0,147a
	8	3,855b	75,0a	0,795a	33,5a	3,6a	4,4b	0,197a
	10	3,145b	74,0a	0,892a	39,5a	3,9a	4,5b	0,187a
	12	5,545a	89,0a	0,897a	34,0a	4,3a	5,4a	0,165a
	CV%	18,11	13,46	45,63	39,61	10,07	8,28	38,01

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Na espécie *P. nitida*, os valores de IVG e porcentagem de emergência (G%) mantiveram-se distantes dos outros tratamentos nos quais a porcentagem de germinação não passou de 2%, demonstrando aleatoriedade, o que não permite inferir com clareza o efeito dos teores de 6 a 12% de umidade sobre suas sementes. Contudo, outros estudos (Veiga-Barbosa et al., 2013) indicam que a dessecação das sementes para teor de umidade de 3% ( $\pm 0,37$ ) causa efeitos negativos na germinação das sementes dessa espécie, com respostas inferiores ao do controle ( $6,5\% \pm 0,60$  b.u.).

Meletti et al. (2007) obtiveram resultados parcialmente divergentes ao avaliarem a criopreservação de seis acessos de maracujazeiro, onde verificaram que em *P. nitida* a secagem das sementes com teores de umidade inicial de 30% para 20% provocou danos às sementes, não aceitando a desidratação prévia para a criopreservação.

Um dos fatores que influenciam na germinação de *P. nitida* são destacados por alguns autores como Meletti et al. (2005) ao afirmarem que por pertencer a região amazônica, provavelmente a temperatura é fator decisivo para a sua germinação. De fato, foi observado uma diferença considerável entre o número de sementes germinadas em B.O.D. sob temperatura constante de 25 °C e a emergência das sementes com o mesmo tratamento mantidas em temperatura ambiente de laboratório ( $27,7 \text{ °C} \pm 1,9$ ), sendo que nesta última as médias foram mais elevadas, alcançando 25% para sementes com 8% de teor de umidade.

Em um estudo realizado por Carvalho et al. (1998) sobre características físicas e de germinação de sementes de espécies frutíferas nativas da Amazônia, foi obtido 91,3% do total de germinação para *P. nitida*. Os mesmos autores também observaram que a espécie apresenta processo germinativo bastante lento e com acentuada desuniformidade, o que sugere a existência de mecanismo de dormência controlando a germinação.

Mello (1999) ao avaliar a influência do tempo, local de armazenamento e o tipo de embalagem durante treze meses em *P. nitida* concluiu que sementes recém-colhidas, apresentavam baixa germinação (menos de 1%), enquanto que a maior média foi obtida naquelas armazenadas há nove meses (60%).

A condição de desuniformidade e processo germinativo lento também foram confirmados nesse estudo, o que dificulta a sua utilização comercial e produção de

mudas. Por isso novos trabalhos visando acelerar o processo germinativo e identificar os mecanismos de dormência envolvidos na germinação para essa espécie são de grande importância.

Quanto ao Índice de Velocidade de Emergência (IVE) e porcentagem de emergência (E%), os resultados indicaram médias iguais estatisticamente para ambas as variáveis, tendo apresentado variações de 0,272 a 0,749 para IVG e de 9,0 a 25,0% para E%.

O mesmo ocorreu no Comprimento de Radícula (CR), Comprimento da Parte Aérea (CPA) e Massa de Matéria Seca (MS), nas quais para CR as médias obtidas variaram de 4,2 a 4,7 cm; para CPA as médias variaram de 5,5 a 6,4 cm; e em MS as médias variaram de 0,061 a 0,135 g.

As variáveis IVG e porcentagem de germinação (%) de *P. nitida* ajustaram-se a uma equação cúbica ( $y^{**} = 9,2753 - 3,4622x + 0,416x^2 - 0,016x^3$  e  $y^{**} = 351 - 131,08x + 15,75x^2 - 0,6042x^3$ , respectivamente), na qual o ponto de máximo (PM) obtido foi de 10,4% de teor de umidade. O valor de  $R^2$  correspondeu ao valor de 100% (Figura 3).

Observa-se na Figura 3 que o IVG e a porcentagem de germinação (G%) mantiveram-se baixos nos teores de 6 e 8%, havendo o aumento significativo das médias no teor de 10% de umidade das sementes, que reduziram novamente ao passar para o teor de 12% de umidade.

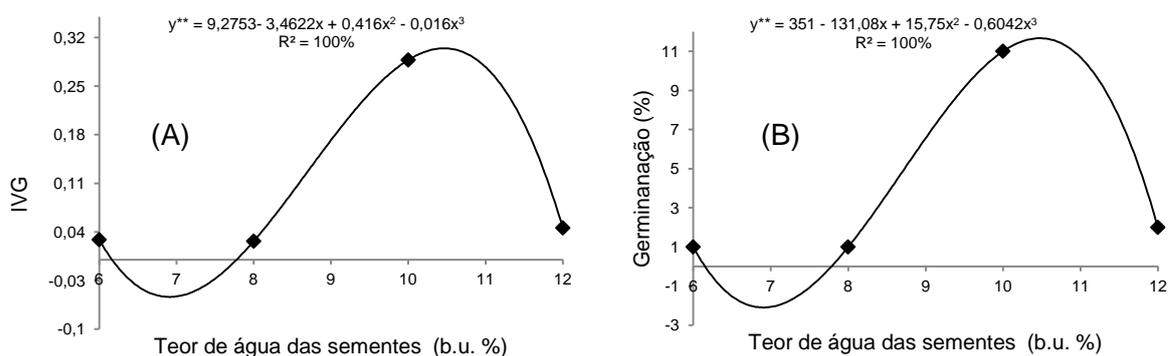


Figura 3. Efeitos de teores de umidade em sementes de *Passiflora nitida* para as variáveis: (A) - Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e (B) - Porcentagem de germinação (G%). Cáceres - MT, UNEMAT, 2014. \*\*Significativo a 1% de probabilidade.

Embora os resultados se demonstrem complexos e pouco lineares, pode-se inferir que o tratamento com teor de 10% de umidade foi superior aos demais, sendo

por isso, recomendado esse teor de umidade para a criopreservação de sementes de *P. nitida*.

### ***Passiflora foetida***

Os resultados revelaram médias semelhantes ( $P>0,05$ ) para todas as variáveis analisadas. Através das médias obtidas observa-se que o IVG variou de 0,107 a 0,212 enquanto as médias da porcentagem de germinação (G%) variaram de 11,0 a 20,5% (Tabela 2).

Com relação ao IVE e porcentagem de emergência (E%) as médias variaram de 0,022 a 0,107 para IVE e de 1,5 a 5,0% para porcentagem de germinação. Observou-se redução na porcentagem de sementes germinadas em substrato vermiculita ao comparar os resultados com a porcentagem de sementes germinadas em substrato papel mata-borrão acondicionadas em B.O.D. com temperatura de 25 °C. Provavelmente, essas diferenças indiquem que a temperatura e outros fatores como substrato podem influenciar a germinação de *P. foetida*.

Com relação à variável CR, as médias variaram de 2,6 a 5,9 cm. Já para a variável CPA as médias variaram de 3,1 a 6,4 cm. Os resultados para MS variaram de 0,002 a 0,009 g. Esses resultados indicam que para as espécies *P. foetida*, o teor de umidade das sementes no intervalo de 6 a 12% não influencia diretamente o seu potencial germinativo bem como o desenvolvimento das plântulas, tolerando os ajustes de umidade sem danos observáveis.

Resultados semelhantes foram obtidos em estudo sobre dessecação e criopreservação de sementes de mamão no qual verificou-se que durante o processo de secagem até a estabilização do grau de umidade em 4,5% e 5,3%, não foi observada perda significativa de viabilidade das sementes, o que sugere a possibilidade de conservá-las a longo prazo, em função da sua tolerância à dessecação (Althoff e Carmona, 1999).

Resultados complementares para *P. foetida* foram relatados por Veiga-Barbosa et al. (2013), no qual sementes com teor de umidade inicial em torno de 7,2% (b.u.) , quando desseçadas para valores próximos a 2,6% de umidade, tiveram redução na porcentagem de germinação quando comparadas ao controle.

Os resultados de *P. foetida* indicam que variações nos teores de umidade no intervalo de 6 a 12% não afetam o potencial fisiológico das sementes dessa espécie.

### ***Passiflora mucronata***

Para *P. mucronata*, os resultados foram significativos ( $P < 0,05$ ) para as variáveis IVG e porcentagem de germinação (G%). Para IVG as médias obtidas indicaram o teor de umidade de 12% (0,601) como o superior aos demais que se igualaram estatisticamente. Para porcentagem de germinação (G%) a melhor média também corresponde ao tratamento de 12% de umidade, correspondendo a 18% de sementes germinadas, enquanto os demais tratamentos igualaram-se estatisticamente (Tabela 2).

Para *P. mucronata*, os resultados observados nesse estudo foram parecidos com os de Meletti, et al. (2011), no qual as sementes sem tratamento obtiveram um índice de 0 a 15% de germinação, independente do tempo de armazenamento. Ainda nesse estudo, foram obtidos resultados superiores para sementes submetidas ao choque térmico (40 °C por 15 minutos) e armazenadas por seis meses, com uma média de 72,8%, indicando a importância da combinação desses dois fatores para a espécie. Resultados divergentes foram encontrados Chamma et al. (2014) em um estudo sobre superação de dormência em *P. mucronata*, em que demonstraram que sementes com teor de umidade em torno de 15% (b.u.) sem nenhum tratamento promoveu um percentual de germinação de 60% e IVG igual a 0,729.

Para IVE e porcentagem de emergência (E%) os resultados não foram significativos ( $P > 0,05$ ). No entanto, houve aumento considerável na germinação de sementes em comparação ao IVG e porcentagem de germinação, obtendo-se médias para o IVE que foram de 1,737 a 2,303 e porcentagem de emergência de plântulas de 43,5 a 55,5%.

Para CR, CPA e MS os resultados revelam que as variações no teor de umidade das sementes (6 a 12% de umidade) não influenciaram o desenvolvimento das plântulas. As médias do CR variaram de 2,9 a 3,1 cm; as do CPA foram de 5,0 a 5,4 cm; e as da MS variaram de 0,063 a 0,074g.

Os resultados sobre *P. mucronata* permitem inferir que os teores de 6 a 10% de umidade causaram danos na germinação apenas no Teste Padrão de Germinação. Nessa situação, observou-se redução significativa da viabilidade de suas sementes nos tratamentos. Pammenter e Berjak (2000) relatam que a remoção

de água na semente pode acarretar injúrias físicas nos tecidos desordenando o metabolismo e conseqüentemente afetando a capacidade de germinação.

Resultados relatados por Veiga-Barbosa et al. (2013), convergem em partes com o presente estudo, e sugerem que a dessecação em sementes de *P. mucronata*, com diminuição do teor de umidade inicial (em torno de 7% b.u.) para valores próximos de 3% de umidade, afeta negativamente sua germinação.

Para *P. mucronata* as variáveis IVG e porcentagem de germinação (%) ajustaram-se em uma resposta quadrática ( $y^{**} = 2,154040 - 0,569441x + 0,036486x^2$  e  $y^{**} = 65,075000 - 17,112500x + 1,093750x^2$ , respectivamente), na qual o valor de  $R^2$  correspondeu ao valor de 94,65% par IVG e 94,57% para porcentagem de germinação. A variação entre os teores de 6 a 10% de umidade observada foi mínima, sem diferenças estatísticas, e observou-se que a diferença aumentou significativamente quando o teor passou a 12% de umidade (Figura 4).

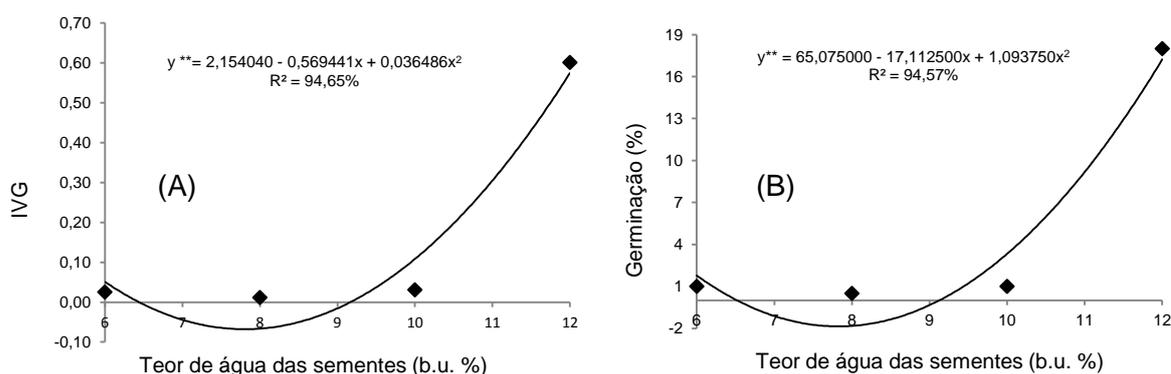


Figura 4. Efeitos de teores de umidade em sementes de *Passiflora mucronata* para as variáveis: (A) - Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e (B) - Porcentagem de germinação (G%). Cáceres - MT, UNEMAT, 2014. \*\*Significativo a 1% de probabilidade.

### ***Passiflora micropetala***

Os resultados foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) para todas as variáveis analisadas. Para IVG e porcentagem de germinação (G%) as médias obtidas variaram de 0,635 a 0,912 e de 24,0 a 30,5%, respectivamente (Tabela 2).

Quanto ao IVE e porcentagem de emergência (E%) todas as médias obtidas foram menores do que as do IVG e porcentagem de germinação, variando de 0,190 a 0,257 para IVE e de 15,5 a 20,0% para porcentagem de plântulas emergidas.

Os resultados quanto ao CR demonstraram variação nas médias das plântulas de 1,9 a 2,1 cm, enquanto no CPA as médias variaram de 3,4 a 3,8 cm. As

médias obtidas para MS variaram de 0,010 a 0,012 g nos tratamentos. A massa de matéria seca, bem como o comprimento de radícula e comprimento da parte aérea é uma medida de grandeza física usada para mensurar o crescimento de plântulas, ou seja, seu desempenho durante a avaliação experimental (Vanzolini et al., 2007).

Os resultados indicam que para a espécie *P. micropetala*, o teor de umidade das sementes no intervalo de 6 a 12% não influencia diretamente o seu potencial germinativo ou mesmo o desenvolvimento das plântulas. Com isso, sugere-se que sementes de *P. micropetala* com teores de umidade iniciais nesse intervalo (6 a 12%) podem ser criopreservadas sem necessidade de adequação do teor de umidade.

Já em um estudo sobre criopreservação de espécies de *Passiflora* Veiga-Barbosa et al. (2013) relataram que sementes de *P. micropetala* com teor de umidade inicial em torno de 6,1% (b.u.) , quando dessecadas para valores próximos a 1,9% de umidade, tiveram redução na porcentagem de germinação quando comparadas ao controle.

### ***Passiflora suberosa***

Os resultados foram iguais estatisticamente em todos os tratamentos ( $P > 0,05$ ) para as variáveis analisadas. Para IVG e porcentagem de germinação (G%) as médias obtidas variaram de 2,302 a 3,132 e de 52,0 a 66,5%, respectivamente (Tabela 2).

Quanto ao IVE e porcentagem de emergência (E%) todas as médias obtidas foram menores do que as do IVG e porcentagem de germinação, variando de 0,360 a 0,785 para IVE e de 7,5 a 16,0% para porcentagem de plântulas emergidas.

Os resultados quanto ao CR demonstraram variação nas médias das plântulas de 2,8 a 3,2 cm, enquanto no CPA as médias variaram de 3,8 a 4,4 cm. As médias obtidas para MS variaram de 0,008 a 0,016 g nos tratamentos.

Esses resultados sugerem que para a espécie *P. suberosa*, o teor de umidade das sementes no intervalo de 6 a 12% não influencia diretamente o seu potencial fisiológico, tolerando os ajustes para esses teores de umidade sem danos aparentes nas sementes.

### ***Passiflora edulis***

Os resultados foram significativos ( $P < 0,05$ ) para as variáveis IVG, no qual os melhores tratamentos foram para o grupo de sementes com teor de água a 12% (5,545) e de 6% (4,555) de umidade, e para a variável CPA, no qual os melhores tratamentos também corresponderam aos teores de 6 e 12% de umidade com médias de 5,5 e 5,4 cm, respectivamente (Tabela 2).

*P. edulis* apresentou comportamento não comum, ao apresentar as melhores médias nos teores de 6 e 12% de umidade, revelando certa aleatoriedade nos resultados, o que dificulta a compreensão dos efeitos dos diferentes teores de umidade na germinação das sementes e vigor das plântulas. Martins et al. (2005) também observou uma variação aleatória nos dados de germinação de *P. edulis*, distribuída durante o armazenamento e sem causa evidente, o que dificultou a identificação da associação (teor de água e temperatura) mais favorável a conservação das sementes.

Resultados semelhantes ao presente estudo foram obtidos por Fonseca e Silva (2005) ao avaliar através de variações no teor de água das sementes e na temperatura do ambiente de armazenamento, o comportamento fisiológico de sementes de *P. edulis*, onde verificou que não houve diferenças significativas entre os diferentes teores de umidade (7, 11, 17, 21, 27 e 31% b.u.) para sementes recém-colhidas. Quando armazenados e mantidos em diferentes temperaturas, a combinação do grau de umidade de 7% das sementes com a temperatura de 10 °C foi a mais eficiente no favorecimento à manutenção do potencial fisiológico das sementes.

Num ensaio sobre criopreservação de sementes de *P. edulis*, Ospina et al. (2000) verificou que em sementes com 14,4 de teor de umidade a viabilidade obtida alcançou a média de 94,3%, enquanto sementes com 2,6% de umidade secadas em sílica gel, tiveram sua viabilidade reduzida a 57%. Por isso, esses autores afirmaram que a sensibilidade à dessecação observada nas sementes confirmam o seu comportamento como intermediária, como sugerido por Hong et al. (1996).

O estudo de Veiga-Barbosa et al. (2013) também divergem dos resultados obtidos nesse ensaio para *P. edulis*. Nele foi verificado que a dessecação afeta negativamente a germinação tanto de *P. edulis* quanto *P. edulis* f. *flavicarpa*. Em sementes de *P. edulis* a maior germinação ocorreu em sementes com teor de água entre 6,6 a 7,7% do que no conteúdo de água 2 a 3%, enquanto que *P. edulis* f.

*flavicarpa* obteve melhores respostas em sementes com teor de água entre 6,8 a 7,1 do que nas sementes dessecadas com teor de umidade de 2,2 a 2,6%.

Analisando-se esses estudos supracitados sobre efeitos do teor de umidade nas sementes de *P. edulis*, é possível inferir que sua viabilidade é reduzida apenas quando o teor de água das sementes passa a ser muito reduzido (em torno de 2 a 3%).

Outros estudos que corroboram com essa hipótese foram realizados por Catunda et al. (2003) no qual evidenciaram que sementes de maracujá amarelo acondicionadas em embalagem permeável em câmara fria, não tiveram seu comportamento germinativo prejudicado, embora as sementes terem atingido valores de teor de água entre 4 e 6%.

Carlesso et al. (2008) verificaram através dos testes de vigor e germinação que sementes de *P. edulis* podem ser embaladas em recipientes de vidro ou polietileno, por períodos de 90 e 180 dias, sem afetar a sua qualidade fisiológica e o vigor das plântulas, mantendo também o teores de água estatisticamente iguais para cada tratamento de secagem (8,7 a 10,8% b.u.).

Quanto às variáveis porcentagem de germinação (G%), IVE e porcentagem de emergência (E%), as médias foram semelhantes em todos os tratamentos ( $P > 0,05$ ). Para porcentagem de germinação (G%) as médias variaram de 74,0 a 89,0%; para IVE houve variação de 0,795 a 0,930, já as médias de porcentagem de emergência de plântulas variaram de 31,5 a 39,5%. Com base nos resultados é possível inferir que as variações do teor de umidade nas sementes (6 a 12% b.u.) não alterou o potencial fisiológico para emergência, mantendo médias estatisticamente iguais de 6 a 12%.

Para as variáveis CR e MS também não foi observado efeitos significativos ( $P > 0,05$ ), onde para CR as médias variaram de 3,6 a 4,3 cm, e para MS variaram de 0,147 a 0,197 g.

Os resultados de *P. edulis* para IVG e Comprimento da Parte Aérea (CPA) resultaram em equações quadráticas ( $y^{**} = 17,983000 - 3,374500x + 0,193750x^2$  e  $14,445625 - 2,254062x + 0,125469x^2$ ) e valores de  $R^2$  diferentes para cada variável, sendo 84,52% para a IVG e 99,06% para CPA. Embora as maiores médias obtidas correspondam aos tratamentos 6 e 12% de umidade nas sementes como pode ser

observado na Figura 5, houve pouca variação entre esses e os demais tratamentos (8 e 10%).

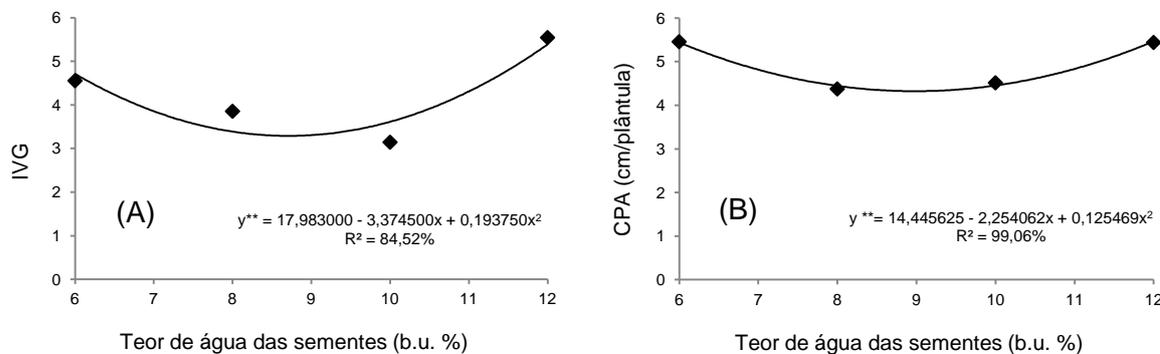


Figura 5. Efeitos de teores de umidade em sementes de *Passiflora edulis* para as variáveis: (A) - Índice de Velocidade de Germinação (IVG) e (B) – Comprimento da Parte Aérea (CPA). Cáceres - MT, UNEMAT, 2014. \*\*Significativo a 1% de probabilidade.

### Considerações sobre os diferentes teores de umidade

De modo geral, verificou-se que as espécies de *Passiflora* utilizadas nesse estudo apresentaram diferentes respostas nos testes de germinação e vigor, que estão relacionadas aos diferentes teores de umidade em que foram ajustados (6, 8, 10 e 12% de umidade), sendo em alguns casos obtidos resultados que divergem da literatura e/ou outros complexos que não permitem inferir com clareza os efeitos desses teores de umidade nas sementes.

A maioria das espécies, ainda assim, suportaram os ajustes nos teores de 6 a 12% de umidade, sem danos observáveis nas sementes segundo os testes de germinação e vigor realizados, mesmo para aquelas em que se realizou a dessecação para o teor de 6% de umidade.

Mendonça e Dias (2000) afirmam que a susceptibilidade à dessecação pode variar entre espécies e ser parcialmente explicada por diferenças anatômicas e fisiológicas, mas também é possível encontrar variações entre diferentes lotes de sementes de um mesmo cultivar, o que torna difícil o entendimento. No entanto, algumas características como a presença de açúcares solúveis, grande quantidade de reservas complexas e um decréscimo na vacuolização pode minimizar os danos com a dessecação.

## 4.2. Criopreservação em Nitrogênio Líquido (NL<sub>2</sub>)

As amostras de sementes criopreservadas em NL<sub>2</sub> obtiveram respostas diferentes quanto à tolerância as baixas temperaturas, evidenciando padrões diferentes para as espécies e os tratamentos com 0,3 M de sacarose, 7% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e sem crioprotetores, e serão discutidas abaixo.

### ***Passiflora nitida***

Os resultados foram significativos para todas as variáveis, com exceção do IVG e porcentagem de germinação. Nestas, houve uma variação de 0,0 a 0,014 para IVG e de 0,0 a 0,8% para porcentagem de germinação, indicando interferência de possíveis fatores como a dormência no potencial germinativo da espécie, como já discutidos anteriormente (Tabela 3).

Quanto ao IVE os resultados foram significativos ( $P < 0,05$ ) no qual o melhor tratamento foi o sem crioprotetores com média igual a 0,213 enquanto os outros tratamentos se igualaram estatisticamente. Para a porcentagem de emergência (E%), verificaram-se resultados significativos, no qual as maiores médias foram obtidas para o tratamento sem crioprotetores (10,8%) e controle (5,6%) (Tabela 3).

A criopreservação sem quaisquer crioprotetores aumentou as médias das variáveis IVE, E%, CR, CPA e MS de *P. nitida*, indicando que para esta espécie possíveis condições de dormência nas sementes tenham sido diminuídas com a exposição direta ao NL<sub>2</sub>.

Deste modo, pode-se inferir que a utilização de crioprotetores é desnecessária para a sua criopreservação. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, como Veiga-Barbosa et al. (2013) em que sementes não dessecadas, sem crioprotetores aumentaram significativamente ( $P < 0,05$ ) a germinação, sendo superior ao controle. O mesmo estudo indicou também que sementes dessecadas de *P. nitida* ( $3,0\% \pm 0,37$  b.u.) apresentaram menor germinação após criopreservação quando comparadas ao controle.

Ao comparar a média de emergência das sementes sem crioprotetores com o controle de *P. nitida*, verificou-se que houve o acréscimo em torno de 92,8% na emergência, enquanto que para os tratamentos sacarose houve redução significativa e por último o DMSO que não foi observado a germinação de nenhuma semente.

Tabela 3. Médias do Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Porcentagem de Germinação (G%), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Porcentagem de Emergência (E%), Comprimento da Radícula (CR), Comprimento da Parte Aérea (CPA) e Massa de Matéria Seca (MS) obtidas na avaliação da criopreservação em Nitrogênio Líquido (NL<sub>2</sub>) em seis espécies de *Passiflora*

Espécie	Tratamento	Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR (cm)	CPA (cm)	MS (g)
<i>P. nitida</i>	DMSO	0,000a	0,0a	0,000b	0,0b	0,0b	0,0b	0,000b
	SAC	0,000a	0,0a	0,027b	1,2b	0,5b	1,5b	0,005b
	S/CRIO	0,014a	0,8a	0,213a	10,8a	3,3a	6,4a	0,055a
	Controle	0,000a	0,0a	0,074b	5,6ab	2,0ab	4,1ab	0,030ab
	CV%	273,86	273,86	85,90	81,31	78,23	85,37	90,09
<i>P. foetida</i>	DMSO	0,031ab	1,6ab	0,019a	1,6a	1,9a	2,4a	0,001a
	SAC	0,005b	0,4b	0,010a	0,8a	1,4a	1,5a	0,001a
	S/CRIO	0,063ab	4,0ab	0,013a	1,2a	1,2a	1,58a	0,001a
	Controle	0,098a	6,4a	0,022a	2,0a	1,8a	1,98a	0,001a
	CV%	100,54	91,81	154,82	156,49	178,42	176,14	185,03
<i>P. mucronata</i>	DMSO	0,174a	7,6a	0,212c	8,8c	5,4a	3,7c	0,014b
	SAC	0,698a	22,4a	0,938b	36,4b	3,6b	5,9a	0,066a
	S/CRIO	1,250a	30,0a	0,389c	15,6c	4,2ab	5,3b	0,018b
	Controle	1,088a	29,6a	1,765a	57,2a	3,4b	6,4a	0,052a
	CV%	84,60	69,75	29,79	26,15	20,62	6,22	35,28
<i>P. micropetala</i>	DMSO	0,463b	26,0b	0,221a	16,8a	1,0a	2,3a	0,009a
	SAC	0,321b	16,4b	0,109a	8,4a	1,7a	3,7a	0,005a
	S/CRIO	0,473b	28,0b	0,173a	13,2a	1,9a	3,5a	0,005a
	Controle	0,980a	55,6a	0,095a	6,8a	1,2a	2,2a	0,003a
	CV%	38,55	39,57	114,46	108,24	62,39	64,63	122,26
<i>P. suberosa</i>	DMSO	2,561a	47,6a	1,395a	34,0a	2,6c	4,5a	0,029a
	SAC	2,447a	47,2a	1,491a	33,6a	3,1ab	4,3ab	0,024a
	S/CRIO	3,393a	62,0a	1,127a	28,0a	3,5a	4,2ab	0,019a
	Controle	2,556a	52,4a	1,892a	38,8a	2,9bc	3,8b	0,020a
	CV%	23,95	22,92	29,06	31,00	7,93	7,25	35,18
<i>P. edulis</i>	DMSO	0,000c	0,0c	0,479bc	17,6c	4,1a	6,4a	0,094bc
	SAC	1,173b	49,2b	0,384c	13,2c	3,9a	6,4a	0,048c
	S/CRIO	3,301a	77,6a	0,837b	29,2b	3,6a	5,5a	0,136ab
	Controle	2,899a	69,6a	1,776a	41,2a	3,8a	5,7a	0,180a
	CV%	18,34	20,74	26,28	24,24	11,18	13,67	30,97

\*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. Legenda: DMSO – Dimetilsulfóxido; SAC – Sacarose; S/CRIO – Sem crioprotetor.

Goldfarb et al. (2008) observaram que os percentuais germinativos das sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) criopreservadas a -196 °C foram estatisticamente superiores aos das sementes armazenadas a temperatura ambiente de 23 °C.

Os mesmos autores sugeriram a hipótese da ocorrência de modificações fisiológicas na estrutura interna da semente durante a exposição a temperaturas ultrabaixas, originando quebra de dormência e resultando em aumento da viabilidade dessas sementes. Rocha et al. (2009) também concluíram que a conservação criogênica, aumenta o percentual de germinação e o vigor das sementes de algodão, em razão dessa temperatura promover quebra de dormência pela ação do frio.

Assim como no presente estudo, a perda de viabilidade ao utilizar uma solução crioprotetora tem sido relatada para algumas espécies. Molina et al. (2006) ao avaliarem a criopreservação de sementes de cebola, concluíram que o uso de glicerol (50%) como crioprotetor foi prejudicial à qualidade fisiológica das sementes, causando modificações em sua composição química e diminuindo a porcentagem de germinação para 70%. Já as sementes criopreservadas sem crioprotetor obtiveram um índice de 93% de germinação, que se igualou estatisticamente ao controle (92%).

Para as variáveis CR e CPA, as melhores médias corresponderam ao grupo de sementes armazenadas em NL<sub>2</sub> sem crioprotetores, com médias de 3,3 e 6,4 cm respectivamente, estando em consonância com os resultados da variável porcentagem de emergência (E%). As sementes utilizadas como controle foram estatisticamente iguais ao tratamento sem crioprotetores, bem como aos demais tratamentos, apresentando uma média igual a 2,0 e 4,1 cm.

Na variável MS, verificou-se novamente resultado superior para o tratamento sem crioprotetor, com média correspondendo a 0,055 g. Também o tratamento controle se manteve igual estatisticamente aos demais tratamentos, com média de 0,030g.

De modo geral, pode-se inferir que para *P. nitida* não houve uma grande vantagem na utilização de soluções crioprotetoras, pois os resultados apontaram médias iguais do tratamento sem crioprotetores em relação ao controle para a maioria das variáveis analisadas. No entanto, como sua germinação foi baixa e

lenta, novos estudos sobre os mecanismos de dormência que envolve essa espécie, bem como outros voltados para o aumento da germinação são imprescindíveis para o sucesso no armazenamento de sementes em NL<sub>2</sub>.

### ***Passiflora foetida***

Conforme é apresentado na Tabela 3, em *P. foetida*, verificou-se que os resultados foram significativos apenas para as variáveis IVG e porcentagem de germinação (G%). Para o IVG, observou-se que as melhores médias foram obtidas no controle (0,098), no tratamento sem crioprotetor (0,063) e o DMSO (0,031).

Quanto à porcentagem de germinação (G%), os resultados foram semelhantes ao do IVG, com efeitos significativos para os tratamentos, dos quais as melhores médias foram obtidas no controle (6,4%), sem crioprotetores (4,0%) e DMSO (1,6%).

Através desses resultados, verificou-se que a exposição direta ao NL<sub>2</sub>, causaram danos no potencial germinativo de *P. foetida* apenas no Teste Padrão de Germinação, embora de modo geral, a germinação tenha sido baixa para todos os tratamentos.

Estudos sobre quebra de dormência e germinação de sementes de *P. foetida* divergem dos resultados obtidos nesse ensaio. Souza (2012) obteve um alto IVG (31,58) e porcentagem de germinação (65%) em temperatura de 25 °C, alcançando valores ainda maiores (81,20 e 98%) quando tratadas com a solução KNO<sub>3</sub> a 20%.

Provavelmente, a dormência nas sementes de *P. foetida* tenha interferido no processo germinativo, de modo que, a concentração de KNO<sub>3</sub> utilizada nesse estudo tenha sido ineficiente para que as sementes pudessem expressar todo seu potencial germinativo.

Observa-se que após criopreservadas, as sementes de *P. foetida* sem crioprotetores ainda mantiveram 62,5% de sua germinação, quando comparadas ao controle; e as tratadas com DMSO tiveram seu potencial reduzido a 25%. O pior resultado ocorreu no grupo de sementes tratadas com sacarose, que mantiveram apenas 6,25% de germinação após exposição ao NL<sub>2</sub> em comparação com o controle.

Em um estudo realizado por Veiga-Barbosa et al. (2013), observou-se que a porcentagem de germinação não foi afetada pelo armazenamento em NL<sub>2</sub>, tanto

para sementes de *P. foetida* dessecadas quanto para as não dessecadas, sendo que para essa última condição, observou-se aumento na germinação, com média estatisticamente superior ao do controle. Nesse mesmo estudo, foi verificado ainda que, a diminuição de germinação em *P. foetida* após dessecação (2,6%  $\pm$ 0,23 b.u.) embora tenha sido melhorada após imersão em NL<sub>2</sub>, não alcançou estatisticamente a média do controle.

Esses resultados, em parte, convergem com os obtidos no presente estudo, indicando que as sementes da espécie *P. foetida* podem suportar a exposição a temperaturas de nitrogênio líquido mesmo sem crioprotetores e, portanto, serem criopreservadas.

Através das análises realizadas, pode-se inferir que sementes de *P. foetida* suportaram o armazenamento em baixas temperaturas (-196 °C) com ligeira perda do potencial fisiológico apenas na germinação em todos os tratamentos comparados ao controle.

Por isso, sugere-se que sejam realizados novos estudos visando determinar o tratamento mais adequado para criopreservação de sementes dessa espécie. Nesse aspecto, a utilização de diferentes concentrações de soluções crioprotetoras e/ou mesmo outros crioprotetores que não foram contemplados nesse ensaio podem ser vantajosos.

### ***Passiflora mucronata***

*P. mucronata*, os resultados foram significativos para todas as variáveis, com exceção do IVG e porcentagem de germinação (G%). Para o IVE e porcentagem de emergência as maiores médias foram obtidas com o controle (1,765 e 57,2%), seguido do tratamento com sacarose (0,938 e 36,4%), enquanto os outros tratamentos foram inferiores a estes e estatisticamente iguais (Tabela 3).

Em *P. mucronata* as maiores médias para CR foram obtidos nos tratamentos DMSO (5,4 cm) e no sem crioprotetores (4,2 cm), este último demonstrando-se igual aos demais tratamentos. Para a variável CPA e MS as melhores médias ocorreram no tratamento controle (6,4 cm e 0,052 g) e sacarose (5,9 cm e 0,014 g) que se igualaram estatisticamente. No entanto, no CPA o tratamento sem crioprotetor (5,3 cm) se manteve superior ao DMSO (3,7 cm), enquanto para variável MS, os dois se igualaram estatisticamente (0,018 e 0,014, respectivamente). Com exceção da

variável CR, os piores resultados foram obtidos nos tratamentos com DMSO e sem crioprotetores.

Através dos resultados obtidos é possível inferir que a criopreservação causa danos em sementes de *P. mucronata*, sendo necessária a utilização de crioprotetores, sendo que nesse aspecto, a sacarose se mostrou eficiente em diminuir a injúria nas sementes quando comparada ao DMSO.

Como no presente estudo não foram realizados múltiplas dosagens de soluções crioprotetoras, não foi possível afirmar se a concentração de DMSO foi tóxica ou insuficiente para diminuição de injúria nas sementes. Da mesma forma, com relação a sacarose, não há argumentos suficientes para determinar se a concentração de solução utilizada corresponde à melhor resposta de proteção para as sementes.

Contudo, autores demonstram a importância da sacarose para criopreservação na redução da injúria causada pela exposição às baixas temperaturas. Açúcares, especialmente a sacarose podem manter o estado líquido cristalino das bicamadas de membranas e estabilizar proteínas em condições de congelamento (Crowe et al, 1984; Kendall et al, 1993)

A sacarose apresenta grande eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento, podendo agir como agente osmótico externo, removendo o excesso de água intracelular através de gradiente osmótico ou substituindo a água removida das biomoléculas, mantendo as estruturas hidrofílicas mesmo depois da remoção da água, além de ser isenta de citotoxicidade mesmo quando em altas concentrações no citoplasma celular (Santos, 2000).

As avaliações realizadas por Veiga-Barbosa et al. (2013) apontaram resultados diferentes para *P. mucronata*. Observou-se que sementes não dessecadas (7,2%  $\pm$ 0,26 b.u.) e dessecadas (2,7%  $\pm$ 0,07 b.u.) quando armazenadas em NL<sub>2</sub> apresentaram médias estatisticamente superiores ao do controle, sendo o melhor tratamento obtido para sementes sem dessecação.

Não foi descartada a possibilidade de que o fato das sementes de *P. mucronata* terem sido armazenadas em NL<sub>2</sub> com 12% de teor de umidade pode ser um fator prejudicial às sementes. Stanwood (1984), afirma que o teor de água das sementes, após secagem para serem submetidas à preservação do potencial fisiológico em nitrogênio líquido, deve estar entre 4 e 7%.

Em um estudo sobre criopreservação de sementes de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.) realizado por Martins et al. (2009) verificaram que sementes criopreservadas com graus de umidade de 12,5, 8,4 e 4,2% mantiveram seu desempenho fisiológico no nitrogênio líquido. Por outro lado, o teor de água mais elevado (18,3%) causou declínio na germinação, indicando ação prejudicial à conservação das sementes.

No presente estudo, embora os resultados do tratamento sem crioprotetores não tenha superado estatisticamente o controle, nota-se que a sacarose ainda manteve após a criopreservação, cerca de 63,6% de suas sementes viáveis em comparação com o controle.

Por isso, em *P. mucronata* observou-se resultados favoráveis à criopreservação com o uso da sacarose, com médias que mais se aproximaram do controle, sendo que para algumas variáveis foram estatisticamente iguais ao do controle. Portanto, sugere-se o uso da sacarose para diminuição da injúria em sementes de *P. mucronata* causada por temperaturas ultrabaixas, ainda sendo necessária correlacionar a concentração mais adequada para esse processo.

### ***Passiflora micropetala***

Em *P. micropetala* os resultados foram significativos ( $P < 0,05$ ) para as variáveis IVG e porcentagem de germinação (G%). Nestas, a melhor média foi observada no controle (0,980 e 55,6%), enquanto os tratamentos restantes se igualaram estatisticamente, com IVG variando de 0,321 a 0,473 e a porcentagem de germinação (%) de 16,4 a 28% (Tabela 3).

Quanto ao IVE e porcentagem de emergência (E%), as médias variaram de 0,095 a 0,221 e de 6,8 a 16,8%, respectivamente. Para CR, os valores médios dos tratamentos oscilaram de 1,0 a 1,9 cm, enquanto o CPA variou de 2,2 a 3,7 cm por plântula. A variável MS manteve médias que variaram de 0,003 a 0,009g.

Os resultados sobre o IVG e porcentagem de germinação de *P. micropetala* indicam que a criopreservação afetou negativamente o processo germinativo das sementes. No entanto, observou-se que não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos levados à imersão em  $NL_2$ . Isso sugere que, as concentrações das soluções crioprotetoras utilizadas nesse estudo foram ineficientes para redução da injúria causada por baixas temperaturas.

Segundo Fuller (2004) na maioria dos solutos neutros convencionalmente utilizados como crioprotetores, concentrações superiores a 50% peso/volume são necessários para alcançar a vitrificação biologicamente aplicável, mas tais concentrações podem impor graves problemas de potencial osmótico e toxicidades químicas para as células.

Alguns autores afirmam que após a criopreservação pode haver germinação anormal ou morte por injúrias internas, as quais podem estar relacionadas com as características de certas sementes, tais como o tamanho, teor de água e sua composição química (Cromarty et al, 1982;. Santos, 2001; Goldfarb et al., 2010; Silva et al., 2011).

Resultados divergentes foram obtidos por Veiga-Barbosa et al. (2013), em que sementes de *P. micropetala* criopreservadas sem dessecação prévia foram estatisticamente superior ao controle, enquanto as que passaram por processo de dessecação (1,9%  $\pm$ 0.11 b.u.) sem imersão em NL<sub>2</sub> tiveram o pior resultado de germinação; e ainda as sementes dessecadas e criopreservadas aumentaram a sua porcentagem, se igualando estatisticamente ao controle.

Comparando os resultados do tratamento sem crioprotetores com o controle, observou-se que houve uma diminuição em torno de 50,3% na germinação das sementes, de modo que, nesse estudo, sementes de *P. micropetala* apresentaram um comportamento quando exposto a baixas temperaturas sugestivo de intermediário. Portanto, diante da controvérsia, novos estudos visando determinar a classificação das sementes dessa espécie são necessários para aprofundar o conhecimento sobre o método mais adequado de armazenamento.

### ***Passiflora suberosa***

Os resultados foram semelhantes em todos os tratamentos ( $P > 0,05$ ) para a maioria das variáveis, com exceção do CR e CPA (Tabela 3). Para IVG e porcentagem de germinação (G%) as médias dos tratamentos variaram de 2,447 a 3,393 e de 47,2 a 62,0%, indicando que o armazenamento em NL<sub>2</sub> não prejudicou o potencial germinativo das sementes de *P. suberosa*.

O mesmo ocorreu nas variáveis IVE e porcentagem de emergência (E%). Nestas as médias variaram de 1,127 a 1,892 e de 28,0 a 38,8%, respectivamente, demonstrando valores menores de emergência para todos os tratamentos do que as

das sementes utilizadas no Teste Padrão de Germinação. Para MS, as análises também indicaram resultados não significativos, sendo que as médias dos tratamentos oscilaram de 0,019 a 0,029 g.

Em *P. suberosa* os resultados foram significativos ( $P < 0,05$ ) apenas para as variáveis CR e CPA, no entanto, ambas divergiram quanto ao tratamento com melhor média.

Na CR a melhor média foi observada no tratamento das sementes armazenadas em  $NL_2$  sem crioprotetores (3,5 cm) e sacarose (3,1 cm), seguido do controle (2,9 cm) e por último o DMSO (2,6 cm). Na CPA, a situação do DMSO se inverteu, obtendo a maior média (4,5 cm), juntamente com tratamentos sacarose (4,3 cm) e sem crioprotetor (4,2 cm), seguido por último do controle (3,8 cm).

Devido à ambiguidade desses resultados, não é possível inferir com certeza qual o melhor tratamento para criopreservação de *P. suberosa*. O que parece claro até então, é que embora a exposição ao  $NL_2$  não tenha resultado em perdas no potencial germinativo das sementes, houve diferenças significativas no desenvolvimento das plântulas, variando consideravelmente conforme o tratamento realizado.

Portanto, para *P. suberosa*, embora os resultados sejam bastante contrastantes, não deixam dúvidas de que sementes dessa espécie podem ser criopreservadas com sucesso. Como para a maioria das variáveis não houve resultados significativos, pressupõe-se que suas sementes possam ser criopreservadas sem danos aparentes nas sementes. No entanto, novos estudos devem ser realizados para elucidar os efeitos do  $NL_2$  no desenvolvimento de plântulas após o processo.

### ***Passiflora edulis***

Os resultados foram significativos ( $P < 0,05$ ) para a maioria das variáveis, com exceção do CR e CPA. Para IVG e porcentagem de germinação (G%) as maiores médias corresponderam aos tratamentos sem crioprotetores (3,300 e 77.6%) e o controle (2,899 e 69.6%) que se igualaram estatisticamente, seguidos da sacarose (1,173 e 49,2%) e por último o DMSO em que não houve germinação (Tabela 3).

Para IVE e porcentagem de emergência (E%), novamente as sementes sem crioprotetores superaram as médias das criopreservadas com DMSO e sacarose,

com IVE de 0,837 e porcentagem de emergência igual a 29,2%. Notou-se, porém que desta vez as médias não se igualaram ao controle que se mostrou superior entre todos os tratamentos (1,776 e 41,2%, respectivamente), o que sugere possíveis danos causados pela criopreservação.

Conforme Martínez-Montero et al. (2002) é possível que os danos observados na criopreservação possam ter sido causados pela perda da integridade celular devido à formação de cristais de gelo e ao emprego do crioprotetor, que poderia danificar membrana.

O tratamento com DMSO na variável IVE se mostrou igual estatisticamente aos tratamentos sem crioprotetor e sacarose. Já na variável porcentagem de emergência (E%), o mesmo tratamento foi inferior ao sem crioprotetor e igual à sacarose estatisticamente.

Para as variáveis CR verificou-se que as médias variaram de 3,6 a 4,1 cm, enquanto os valores do CPA oscilaram de 5,5 a 6,4 cm por plântula. Para MS, os resultados foram semelhantes aos obtidos no IVE e porcentagem de emergência, pois as melhores médias novamente foram obtidas com o controle (0,180 g) e sem crioprotetores (0,136 g).

Diferentes estudos indicam que em algumas espécies mesmo com a ausência de crioprotetores o potencial germinativo das sementes pode ser mantido. Althoff e Carmona (1999) ao avaliarem sementes de mamão que foram criopreservadas com 5,3% de umidade e o controle com 9,8% de umidade, possuíam viabilidade estimada em 85%. Após 48 horas de criopreservação a viabilidade não foi alterada nos tratamentos que envolveram o reaquecimento à temperatura de -20°C por 24 horas antes do descongelamento à temperatura ambiente, independentemente da forma de congelamento.

Veiga-Barbosa et al. (2013) obtiveram resultados semelhantes em estudo sobre criopreservação de espécies de *Passiflora*. Sementes de *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa* dessecadas e não dessecadas foram imersas em NL<sub>2</sub>, onde os resultados apontaram que as sementes de *P. edulis* não dessecadas quando criopreservadas mantiveram o mesmo potencial de germinação do controle, enquanto as dessecadas que tiveram a pior porcentagem de germinação aumentaram seu potencial fisiológico após exposição em NL<sub>2</sub>. Entretanto, *P. edulis* f. *flavicarpa* apresentou resultados contrastantes, pois as sementes

dessecadas e criopreservadas melhoram seu potencial de tal modo que dentre as espécies avaliadas, estas foram as que obtiveram as melhores médias.

Meletti et al. (2007) ao avaliarem os efeitos da dessecação e criopreservação em NL<sub>2</sub> em diferentes variedades de *P. edulis*, verificaram que: nas sementes com teor de umidade reduzido a 20%, a variedade maracujá roxo e roxinho-miúdo obtiveram a maior porcentagem de germinação (50 e 95%) quando armazenadas em ambiente de laboratório (25 °C), com ligeira perda ao serem criopreservadas (44,2 e 82%, respectivamente). Ao contrário dela, as sementes de maracujá amarelo a rosa-maçã apresentaram as maiores porcentagens de germinação, após armazenamento de nitrogênio líquido (98 e 100%, respectivamente), do que aquelas que somente foram dessecadas (85,5 e 94%).

Diante das controvérsias sobre as variedades, o que parece comum aos estudos com *P. edulis* é que esta espécie suporta o congelamento em temperaturas ultrabaixas reduzindo ligeiramente seu potencial fisiológico ou mantendo-o estatisticamente, mesmo sem a presença de crioprotetores, condição essa favorável para criopreservação.

No caso de *P. edulis*, onde estudos apontam que a vida útil das sementes tem sido considerada de apenas um ano (Meletti e Bruckner, 2001), a criopreservação torna-se um método vantajoso, pois com isso é possível resguardar os genes de interesse dessa espécie comercial por longo prazo, sem a necessidade de renovação periódica do banco de sementes em campo.

Os piores resultados foram observados para sementes criopreservadas com soluções crioprotetoras (DMSO e sacarose). Em comparação com o controle, sementes sem crioprotetores ainda mantiveram cerca de 70,8% do seu potencial fisiológico na emergência. Já para DMSO esse potencial foi reduzido a aproximadamente 42,7%, e o da sacarose para 32%.

Segundo Sakai (1995) alguns crioprotetores podem ser tóxicos ou podem causar estresse osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogênética em cultura.

Como as sementes de *P. edulis* foram criopreservadas com teor de umidade superior à sua condição natural, não é possível inferir com certeza se houve danos nas sementes devido ao teor de 12%. No entanto, lembrando os estudos de Meletti et al. (2007) observou-se que sementes com teores de 20% de umidade em

três variedades (maracujá amarelo, rosa-maçã e roxo) tiveram aumento na porcentagem de emergência após a criopreservação, o que indica que a umidade das sementes não foi afetada pelo elevado teor de umidade.

Pode-se inferir de modo geral, que sementes de *P. edulis* suportaram o armazenamento em baixas temperaturas (-196 °C) mantendo médias iguais no tratamento sem crioprotetor e controle apenas para as variáveis IVG e porcentagem de germinação (G%). Os testes de vigor evidenciaram ligeira perda do potencial fisiológico para as variáveis IVE, porcentagem de emergência (E%) e MS.

Isso sugere que sementes de *P. edulis* podem ser criopreservadas com sucesso, sem a necessidade de utilização de crioprotetores.

## 5. CONCLUSÕES

- Sementes de *P. foetida*, *P. micropetala* e *P. suberosa* mantêm seu potencial fisiológico nos teores de 6 a 12% de umidade.
- Sementes de *P. nitida* apresentaram bons resultados para 10% de umidade. Sementes de *P. mucronata* e *P. edulis* mantêm sua viabilidade nos teores de 6 a 12% de umidade, porém o teor de 12% de umidade nas sementes se mostrou mais adequado.
- Sementes de *P. nitida*, *P. foetida*, *P. suberosa* e *P. edulis* podem ser criopreservadas sem a utilização dos crioprotetores.
- Para sementes de *P. mucronata* recomenda-se o uso da sacarose na criopreservação.
- Sementes de *P. micropetala* criopreservadas perdem seu potencial germinativo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIOLI, M. F. **Ecologia de polinização de *Passiflora suberosa* Linnaeus (*Passifloraceae*)**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. 70p. (Dissertação – Mestre em Ecologia).
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. São Paulo: Edgard Blücher, 1971. 381p.
- ALPERT, P. The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. **Plant Ecology**. 151: 5-17, 2000.
- ALTHOFF, M. A.; CARMONA, R. Conservação de sementes de mamão (*Carica papaya* L. - *Caricaceae*). **Revista Brasileira de Sementes**. 21: 151-156, 1999.
- APPLE, J. L.; FEENER JR. D. H. Ant visitation of extrafloral nectaries of *Passiflora*: the effects of nectary attributes and ant behavior on patterns in facultative ant-plant mutualisms. **Oecologia**. 127: 409-416, 2001.
- BARBEDO, C. J.; BILIA, D. A. C. Evolution of research on recalcitrant seeds. **Scientia Agricola**. 55: 121-125, 1998.
- BARBEDO, C. J.; FILHO, J. M. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**. 12: 145-164, 1998.
- BARBOSA, J. M.; BARBOSA, L. M. Avaliação dos substratos, temperaturas de germinação e potencial de armazenamento de sementes de três frutíferas silvestres. **Ecossistema**. 10: 152-160, 1985.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. San Diego: Academic Press, 2001. 666p.
- BENEVIDES, C. R.; GAGLIANONE, M. C.; HOFFMANN, M. Visitantes florais do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. *Passifloraceae*) em áreas de cultivo com diferentes proximidades a fragmentos florestais na região Norte Fluminense, RJ. **Revista Brasileira de Entomologia**. 53: 415-421, 2009.
- BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. (Ed). **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. Corvallis: Springer, 2008. p.15-32.
- BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PASSOS, I. R. S.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T.V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.559-586.
- BERNACCI, L. C.; VITTA, F. A.; BAKKER, Y. V. *Passifloraceae*. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPPERD, G. J.; MELHEM, T. S.; GIULIETTI, A. M.; KIRIZAWA, M.

(Eds.) **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo: RIMA/FAPESP, 2003. p.247-274.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From *Avicennia* to *Zizania*: Seed Recalcitrance in Perspective. **Annals of Botany**. 101: 213–228, 2008.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Recalcitrant is not an all-or-nothing situation. **Seed Science Research**. 4: 263-264, 1994.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Chapter 4: Orthodox and recalcitrant seeds. In: VOZZO, J. A. (Ed). **Tropical tree seed manual**. Washington: USDA Forest Service's/Reforestation, Nurseries, e Genetics Resources, 2003. p.137-147.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 12: 22-55, 2000.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PASSOS, I. R. S.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T.V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.559-586.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (*Passifloraceae*). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 25: 355-356, 2003.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **The Plant Cell**. 9: 1055-1066, 1997.

BEWLEY, J. D.; BLACK. M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BLACK, M.; OBENDORF, R. L.; PRITCHARD, H. W. Damage and tolerance in retrospect and prospect. In: BLACK, M.; PRITCHARD, H. W. (Eds.). **Desiccation and survival in plants: drying without dying**. Wallingford: CABI, 2002. p.367-382.

BONNER, F. T. Storage of seeds. In: BONNER, F. T.; KARRFALT, R. P. (Eds.). **The woody plant seed manual**. Washington: Department of Agriculture, Forest Service, Agriculture Handbook 727, 2008. p.85-95.

BRADFORD, K. J. A water relations analysis of seed germination rates. **Plant Physiology**. 94: 840-849, 1990.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Regras para análise de sementes/ Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 395p.

BRUCKNER, C. H.; SUASSUNA, T. M. F.; RÊGO, M. M.; NUNES, E. S. Auto-incompatibilidade do maracujá – implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T.V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá:**

germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.317-338.

CARLESSO, V. O.; BERBERT, P. A.; SILVA, R. F.; DETMANN, E. Secagem e armazenamento de sementes de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Revista Brasileira de Sementes**. 30: 65-74, 2008.

CARVALHO, J. E. U.; NASCIMENTO, W. M. O.; MULLER, C. H. **Características físicas e de germinação de sementes de espécies frutíferas nativas da Amazônia**. Belém: Embrapa – CPATU, 1998. 18p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588p.

CARVALHO, V. S.; OTONI, W. C. Criopreservação de Germoplasma Vegetal. In: PEREIRA, T. N. S. (Ed). **Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas**. Viçosa: Arca, 2010. p.89-113.

CATUNDA, P. H. A.; VIEIRA, H. D.; SILVA, R. F.; POSSE, S. C. P. Influência do teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Sementes**. 25: p.65-71, 2003.

CDB. **Convenção sobre Diversidade biológica**. Rio de Janeiro: Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, 1992. Disponível em: [http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf\\_dpg/arquivos/cdbport.pdf](http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf_dpg/arquivos/cdbport.pdf). Acesso em: 05, Agosto, 2014.

CERVI, A. C. O Gênero *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summae Editionem**. 16: 1-5, 2006.

CERVI, A. C. *Passifloraceae* do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. **FontQueria**. 45: 1-92, 1997.

CHAMMA, L.; CHAMMA, H. M. C. P.; PARISI, J. J. D.; MEDINA, P. F.; MELETTI, L. M. M. Sanidade e quebra de dormência em sementes de maracujás nativos: *Passiflora mucronata* Lam. In: VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, Campinas, SP. 2014. **Anais...**Campinas: 2014. p.1-8.

CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **Design of seed storage facilities for genetic conservation**. Rome: IBPGR, 1985. 100p.

CROMARTY, A. S.; ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. **Design of seed storage facilities for genetic conservation**. Roma: IBPGR, 1982. 101p.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**. 223: 701-703, 1984.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CARPENTER, J. F.; RUDOLPH, A. S.; WISTRUM, C. A.; SPARGO, B. J.; ANCHORDOGUY, T. J. Interactions of sugars with membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 947: 367-384, 1988.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**. 94: 1-23, 2004.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? **Journal of Experimental Botany**. 41: 1167-1174, 1990.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 40: 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. Importance of cryopreservation for the conservation of genetic resources. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm**: current research progress and application. Tsukuba: JIRCAS e IPGRI, 2000. p.8-20.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.187-210.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; OLIVEIRA, E. J.; PEIXOTO, J. R.; COSTA, A. M. **Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro**: histórico e perspectivas. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. 36p.

FAO. **The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997. 511p.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de *Passiflora*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.41-51.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**. 6: 36-41, 2008.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (*Passifloraceae*). **Passiflora**. 14: 34-38, 2003.

FONSECA, S. C. L.; SILVA, W. R. Conservação de sementes de maracujá-amarelo: interferências do teor de água das sementes e da temperatura de armazenamento. **Bragantia**. 64: 273-289, 2005.

FREITAS, L. B. História evolutiva das espécies de *Passiflora* L. de ocorrência no Rio Grande do Sul: aspectos genéticos, estrutura populacional e filogenia. **Revista Brasileira de Biociências**. 9: 41-47, 2011.

FREITAS, B. M.; OLIVEIRA FILHO, J. H. Ninhos racionais para mamangava (*Xylocopa frontalis*) na polinização do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*). **Ciência Rural**. 33: 1135-1139, 2003.

FULLER, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. **CryoLetters**. 25: 375-388, 2004.

GILBERT, L. E. The coevolution of a butterfly and a vine. **Scientific American**. 247: 110-121, 1982.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**. 23: 27-33, 2010.

GOLDFARB, M.; MARTINS, M. E. D.; MATA, M. E. R. M. C., PIMENTEL, L. W.; SEVERINO, L. S. Limite de teor de umidade para crioconservação de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**.10: 121-129, 2008.

GONZÁLEZ-ARNAO, M. T.; RAVELO, M. M.; VILLAVICENCIO, C. U.; MONTERO, M. E. M.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of pineapple (*Ananas comosus*) apices by vitrification. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: JIRCAS e IPGRI, 2000. p.398-400.

HADAS, A. Water uptake and germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solution. **Journal of Experimental Botany**. 52: 480-489, 1976.

HANSEN, A. K.; GILBERT, L. E.; SIMPSON, B. B.; DOWNIE, S. R.; CERVI, A. C.; JANSEN, R. K. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany**. 31: 138-150, 2006.

HOEKSTRA F. A.; GOLOVINA E. A.; BUITINK J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**. 6: 431-438, 2001.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Storage. In: **Tropical tree seed manual**. Washington: USDA Forest Service's, Reforestation, Nurseries & Genetic Resources, 2003. p.125-136.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Rome: IPGRI, 1996. 62p.

HONG, T. D.; LININGTON, S.; ELLIS, R. H. **Seed storage behaviour: a compendium**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute (Handbooks for Genebanks, n. 4), 1996.103p.

IBGE. **Instituto brasileiro de geografia e estatística**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em: 15, Agosto, 2014.

IBPGR. **Elservier's dictionary of plant genetic resources**. Rome: International Board for Plant Genetic Resources, 1991. 187p.

JANZEN, D. H. Reproductive behaviour in the *Passifloraceae* and some of its pollinators in the Central America. **Behaviour**. 32: 33-48, 1968.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.81-108.

KAMI, D. Cryopreservation of Plant Genetic Resources. In: KATKOV, I. (Ed.). **Current frontiers in cryobiology**. Japan: InTech, 2012. p.439-456.

KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha, K. K. (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Florida: CRC Press, 1985. p.115-134.

KAY, E. Observations on the pollination of *Passiflora penduliflora*. **Biotropica**. 33: 709-713, 2001.

KENDALL, E. J.; KARTHA, K. K.; QURESHI, J. A.; CHERMAK, P. Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using an abscisic acid pretreatment. **Plant Cell Reports**. 12: 89-94, 1993.

KILLIP, E. P. The American species of *Passifloraceae*: botanical Series (field museum of natural history). **Botanical Series**. 19: 1- 613, 1938.

KOSCHNITZKE, C.; SAZIMA, M. Biologia floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) em mata semidecídua. **Revista Brasileira Botânica**. 20: 119-126, 1997.

KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**. 96: 302-304, 1991.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. San Diego: Academic Press, 1995. 482p.

KUHNE, F. A. Cultivation of granadillas. **Farming in South Africa**. 43: 29-32, 1968.

KUMAR, C. A.; CHITRA, C. R.; KRISHNAN, P. N.; SALIM, N.; NAIR, G. M. Effects of desiccation and temperature on the storage of *aegle marmelos* seeds. **Journal of Tropical Forest Science**. 19: 236-239, 2007.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**. 2:176-177, 1962.

MAROSTEGA, T. N. **Variabilidade genética de acessos de maracujazeiro e avaliação da qualidade fisiológica de sementes**. Cáceres: Universidade do

Estado de Mato Grosso, 2014. 69p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

MARTINS, L.; SILVA, W. R.; MELETTI, L. M. M. Conservação de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* SIMS F. *flavicarpa* DEG.). **Revista Brasileira de Sementes**. 27: 183-189, 2005.

MARTINS, L.; LAGO, A. A.; ANDRADE, A. C. S.; SALES, W. R. M. Conservação de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.) em nitrogênio líquido. **Revista Brasileira de Sementes**. 31: 71-76, 2009.

MARTINS, C. M.; VASCONCELLOS, M. A. S.; ROSSETTO, C. A. V.; CARVALHO, M. G. Prospecção fitoquímica do arilo de sementes de maracujá amarelo e influência em germinação de sementes. **Ciência Rural**. 40: 1934-1940, 2010.

MARUYAMA, E.; ISHII, K. Cryopreservation of tissue-cultured tropical forest trees. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: JIRCAS e IPGRI, 2000. p.432-434.

MATSUMOTO, T. Cryopreservation of *in vitro*-cultured meristems of wasabi. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba, Japan: JIRCAS e IPGRI, 2000, p. 212-216.

MAY, P. G.; SPEARS JR, E. E. Andromonoecy and variation in phenotypic gender of *Passiflora incarnata* (*Passifloraceae*). **American Journal of Botany**. 75: 1830-1841, 1988.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. spe.: p. 83-91, 2011.

MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. A.; PIO, R. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**. 6: 13-20, 2007.

MELETTI, M. M.; BRUCKNER, C. H. Melhoramento genético. In: BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p.345-385.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; ALVARES, V.; FILHO, J. A. A. Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam.: nova alternativa de maracujá ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 17: 87-95, 2011.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. Em: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005, p. 55-78.

MELLO, A. L. **Métodos de quebra de dormência e de armazenamento de sementes, e de aspectos da obtenção de mudas de maracujá suspiro (*Passiflora nitida* H. B. H.)**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 1999. 94p. (Tese – Doutorado em Agronomia).

MENDONÇA, R. J. N.; DIAS, D. C. F. Conservação de sementes de fruteiras tropicais recalcitrantes: uma abordagem. Revisão Bibliográfica. **Agropecuária Técnica**. 21: 57-73, 2000.

MOLINA, T. F.; TILLMANN, M. A. A.; DODE, L. B.; VIÉGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**. 28: 72-81, 2006.

MORLEY-BUNKER, M. J. S. **Some aspects of seed dormancy with reference to *Passiflora* spp. and other tropical and subtropical crops**. London: University of London, 1974. 43p.

MUSCHNER, V. C. **Filogenia molecular, taxas evolutivas, tempo de divergência e herança organelar em *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005. 162p. (Tese – Doutorado em Genética e Biologia Molecular).

MUSCHNER, V. C.; LORENZ, A. P.; CERVI, A. C.; BONATTO, S. L.; SOUZA-CHIES, T. T.; SALZANO, F. M.; FREITAS, L. B. First molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**. 90: 1229–1238, 2003.

NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C.; AMARAL, W. A. N. Armazenamento de sementes de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de sementes**. 13: 77-80, 1981.

NETO, L. G. P. **Germinação de sementes de soja armazenadas em banco de germoplasma**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004. 76p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia).

NEVES, S. M. A. S.; NUNES, M. C. M.; NEVES, R. J. Caracterização das condições climáticas de Cáceres/MT Brasil, no período de 1971 a 2009: subsídio às atividades agropecuárias e turísticas municipais. **Boletim Goiano Geográfico**. 31: 55-68, 2011.

NEWSTROM, L. E.; FRANKIE, G. W.; BAKER, H. G. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. **Biotropica**. 26: 141-159, 1994.

NICK, C.; SILVA, D. J. H.; MATTEDI, A. P.; PEDROSA, D. A. Conservação *ex situ* dos recursos fitogenéticos. In: PEREIRA, T. N. S. (Ed). **Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas**. Viçosa: Arca, 2010, p.59-87.

NODARI, R. O.; FANTINI, A. C.; GUERRA, M. P.; REIS, M. S.; SCHUCH, O. Conservação de frutos e sementes de palmito (*Euterpe edulis* Mart.) sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Árvore**. 22: 01-10, 1998.

NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. A Família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus**. 1: 33-46, 2001.

OLIVEIRA, J. C.; FERREIRA, F. R. Melhoramento Genético do Maracujazeiro. In: **A Cultura do Maracujá no Brasil**. Ribeirão Preto: FUNEP, 1991. p.221-239.

OSIPI, E. A. F.; LIMA, C. B. DE; COSSA, C. **A. Influência de métodos de remoção do arilo na qualidade fisiológica de sementes de *Passiflora alata* Curtis**. Revista Brasileira de Fruticultura. v. spe.: 680-685, 2011.

OSPINA, J. A.; GUEVARA, C. L.; CAICEDO, L. E.; BARNEY, V. Effects of moisture content on *Passiflora* seed viability after immersion in liquid nitrogen. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: JIRCAS e IPGRI, 2000. p.384-388.

PÁDUA, J. G.; SCHWINGEL, L. C.; MUNDIM, R. C.; SALOMÃO, A. N.; ROVERIJOSÉ, S. C. B. Germinação de sementes de *Passiflora setacea* e dormência induzida pelo armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**. 33: 80-85, 2011.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 12: 56-59, 2000.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.143-158.

PEREIRA, M. G.; SILVA, F. F.; PEREIRA, T. N. S. Recursos genéticos vegetais e o melhoramento de plantas. In: PEREIRA, T. N. S. (Ed). **Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas**. Viçosa: Arca, 2010, p.141-176.

PEREIRA, K. J. C.; DIAS, D. C. F. Germinação e vigor de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) submetidas a diferentes métodos de remoção da mucilagem. **Revista Brasileira de Sementes**. 22: 288-291. 2000.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. 2 ed. Brasília: AGIPLAN,1985. 289p.

R, CORE. TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2012.

ROBERTS, R. H. Storage environment and the control of viability. In: ROBERTS, E. H. (Ed). **Viability of seeds**. London: Chapman an Hall, 1972. p.14-58.

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

ROCHA, M. S.; CAVALCANTI MATA, M. E. R. M.; CARVALHO, J. M. F. C.; LOPES, K. P. Crioconservação de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**.13: 312-318, 2009.

SACCO, J. C. Passifloráceas. In: REITZ, R. (Ed.) **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1980. 130p.

SACCO, J. C. **Flora ilustrada catarinense: passifloraceas**. Itajai: R. Reitz. 1980. 132 p.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry: Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.53-69.

SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: JIRCAS e IPGRI, 2000, p.1-7.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal. **Bio-Tecnologia: Ciência & Desenvolvimento**. 20: 60-65, 2001.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 12: 70-84, 2000.

SANTOS, I. R. I.; SALOMÃO, A. N. **Manual de curadores de germoplasma – vegetal: criopreservação**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010. 16p.

SANTOS, T. M.; FLORES, P. S.; OLIVEIRA, S. P.; SILVA, D. F. P. S.; BRUCKMER, C. H. Tempo de armazenamento e métodos de quebra de dormência em sementes do maracujá-de-restinga. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**. 2: 26-31, 2012.

SHIMONISHI, K.; ISHIKAWA, M.; SUZUKI, S.; OOSAWA, K.. Cryopreservation of melon somatic embryos by desiccation method. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba: JIRCAS e IPGRI, 2000, p.167-171.

SILVA, R. C.; CAMILLO, J.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Potencial germinativo e morfoanatomia foliar de plântulas de pinhão-manso originadas de germoplasma criopreservado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 46: 836-844, 2011.

SMITH, M. T.; WANG, B. S. P.; MSANGA, H. P. Chapter 5: dormancy and germination. In: VOZZO, J. A. (Ed). **Tropical tree seed manual**. Washington: USDA Forest Service's/Reforestation, Nurseries, e Genetics Resources, 2003. p.149-176.

SOARES, W. S.; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BARROSO, P. A.; MEDEIROS, L. R. N. Caracterização de frutos e sementes em acessos de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 13: 569-573, 2011.

SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Citogenética clássica e molecular em *Passifloras*. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.213-239.

SOUZA, S. A. M. **Fenologia reprodutiva, germinação de sementes e morfologia polínica em *Passiflora* spp.** Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2012. 169p. (Tese – Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

SOUSA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades, cultivo**. São Paulo: FEALQ, 1997. 179p.

STANWOOD, P. C. Cryopreservation of seeds: a preliminary guide to the practical preservation of seeds germplasm in liquid nitrogen. In: FAO. **International Board for Plant Resources**. Roma: IBPGR Advisory Committee on Seed Storage, 1984. p.8-27.

STOCKMAN, A. L.; BRANCALION, P. H. S.; NOVEMBRE, A. D. L. C.; CHAMMA, H. M. C. P. Sementes de ipê-branco (*Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand. - Bignoniaceae): temperatura e substrato para o teste de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**. 29: 139-143, 2007.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. **Passiflora: passionflowers of the world**. Cambridge: Timber Press, 2004. 276p.

VALOIS, A. C. C.; NASS, L. L.; GOES, M. de. Conservação *ex situ* de recursos genéticos vegetais. In: NASS, L. L.; et al. **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001, p. 123-147.

VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3 ed. Cambridge: The MIT Press, 2000. 224p.

VANZOLINI, S.; ARAKI, C. A. S.; SILVA, A. C. T. M.; NAKAGAWA, J. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de sementes**. 29: 90-96, 2007.

VASCONCELLOS, M. A. S.; SILVA, A. C.; SILVA, A. C.; REIS, F. O. Ecofisiologia do maracujazeiro e implicações na exploração diversificada. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.295-313.

VARASSIN, I. G.; TRIGO, J. R.; SAZIMA, M. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 136: 139-152, 2001.

VEIGA-BARBOSA, L.; MIRA, S.; GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; SOUZA, M. M.; MELETTI, L. M. M.; PÉREZ-GARCÍA, F. Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of *Passiflora* species. **Seed Science & Technology**. 41: 89-97, 2013.

WALTERS C.; WHEELER, L.; STANWOOD, P. C. Longevity of cryogenically stored seeds. **Cryobiology**. 48: 229-244, 2004.

WATKINS, J. T.; CANTLIFFE, D. J. Mechanical resistance of the seed coat and endosperm during germination of *Capsicum annuum* at low temperature. **Plant Physiology**. 72: 146-150, 1983.

WELBAUM, G. E.; BRADFORD, K. J. Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Plant Physiology**. 92: 1038-1045, 1990.

WILLIAMS, R. J.; LEOPOLD, A. C. The glassy state in corn embryos. **Plant Physiology**. 89: 977-981, 1989.

YAMAGUCHI, E.; ISHIKAWA, M. Cryopreservation of maize (*Zea mays* L.) pollen. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Eds.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Tsukuba, Japan: JIRCAS e IPGRI, 2000, p. 369-370.

YOCKTENG, R.; NADOT, S. Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (ncpGS). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 31: 379-396, 2004.

ZAMBERLAN, P. M. **Filogenia de *Passiflora* L. (Passifloraceae): questões infra-subgenéricas**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. 105p. (Dissertação – Mestrado em Genética e Biologia Molecular).

ZUCARELI, V.; BONJOVANI, M. R.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Tolerância à dessecação e influência do tegumento na germinação de sementes de Citrumelo 'Swingle' (*Citrus paradisi* MACF X *Poncirus trifoliata* (L) RAF.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 31: 291-295, 2009.

## 7. ANEXO

### Anexo I

Tabela 04. Resumo do quadro de Análise de Variância conjunta para as variáveis Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Porcentagem de germinação (G%), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Porcentagem de Emergência (E%), Comprimento de Radícula (CR), Comprimento da Parte Aérea (CPA) e Massa de Matéria Seca (MS) referentes aos quatro tratamentos sobre os efeitos de diferentes teores de umidade em sementes de *Passiflora* spp. Cáceres – MT, 2014

<b><i>Passiflora nitida</i></b>								
FV	GL	QM Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR(cm)	CPA (cm)	MS (g)
Tratamento	3	0,0648**	94,3333**	0,1695 <sup>ns</sup>	190,9167 <sup>ns</sup>	0,2358 <sup>ns</sup>	1,0749 <sup>ns</sup>	0,0046 <sup>ns</sup>
Erro	12	0,0020	3,0000	0,0746	87,9167	0,4202	2,0049	0,0017
Total	15	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	0,0972	3,7500	0,4721	15,8750	4,4744	5,9706	0,0844
CV%	-	45,62	46,19	57,86	59,06	14,49	23,72	48,37

<b><i>Passiflora foetida</i></b>								
FV	GL	QM Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR	CPA	MS
Tratamento	3	0,0074 <sup>ns</sup>	61,5833 <sup>ns</sup>	0,0070 <sup>ns</sup>	16,3333 <sup>ns</sup>	9,1367 <sup>ns</sup>	8,8704 <sup>ns</sup>	0,0000 <sup>ns</sup>
Erro	12	0,0109	89,7500	0,0058	10,5000	10,5034	10,2622	0,0000
Total	15	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	0,1581	15,3750	0,0587	3,2500	4,3625	4,4562	0,0052

Tabela 04, Cont...

CV%	-	65,96	61,62	129,49	99,70	74,29	71,89	100,53
-----	---	-------	-------	--------	-------	-------	-------	--------

***Passiflora mucronata***

FV	GL	QM Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR	CPA	MS
Tratamento	3	0,3348**	294,9167**	0,2786 <sup>ns</sup>	146,2500 <sup>ns</sup>	0,0744 <sup>ns</sup>	0,1147 <sup>ns</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>
Erro	12	0,0152	8,9167	0,1040	59,4167	0,0688	0,0439	0,0002
Total	15	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	0,1669	5,1250	1,9991	48,8750	3,0069	5,1750	0,0703
CV%	-	73,98	58,26	16,14	15,77	8,73	4,05	19,18

***Passiflora micropetala***

FV	GL	QM Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR	CPA	MS
Tratamento	3	0,0655 <sup>ns</sup>	42,0000 <sup>ns</sup>	0,0037 <sup>ns</sup>	20,2500 <sup>ns</sup>	0,0604 <sup>ns</sup>	0,1772 <sup>ns</sup>	0,0000 <sup>ns</sup>
Erro	12	0,0521	60,5000	0,0019	8,7500	0,0363	0,0863	0,0000
Total	15	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	0,7781	27,5000	0,2162	16,625	2,0175	3,5431	0,0112
CV%	-	29,35	28,28	19,96	17,79	9,45	8,29	31,43

***Passiflora suberosa***

Tabela 04, Cont...

FV	GL	QM Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR	CPA	MS
Tratamento	3	0,5005 <sup>ns</sup>	220,9167 <sup>ns</sup>	0,1232 <sup>ns</sup>	51,0000 <sup>ns</sup>	0,1489 <sup>ns</sup>	0,3101 <sup>ns</sup>	0,0000 <sup>ns</sup>
Erro	12	0,4119	162,0833	0,0710	31,1667	0,3097	0,2084	0,0000
Total	15	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	2,7369	59,1250	0,5781	12,2500	2,9781	4,1900	0,0119
CV%	-	23,45	21,53	46,08	45,57	18,69	10,89	52,90

***Passiflora edulis***

FV	GL	QM Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR	CPA	MS
Tratamento	3	4,1928**	194,6667 <sup>ns</sup>	0,0136 <sup>ns</sup>	46,9167 <sup>ns</sup>	0,2920 <sup>ns</sup>	1,3566**	0,0020 <sup>ns</sup>
Erro	12	0,5996	116,0000	0,1608	188,0833	0,1612	0,1679	0,0044
Total	15	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	4,2750	80,0000	0,8787	34,6250	3,9875	4,9494	0,1744
CV%	-	18,11	13,46	45,63	39,61	10,07	8,28	38,01

<sup>ns</sup> Não significativo, \*\* e \*Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Anexo II

Tabela 05. Resumo do quadro de Análise de Variância conjunta para as variáveis Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Porcentagem de germinação (G%), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Porcentagem de Emergência (E%), Comprimento de Radícula (CR), Comprimento da Parte Aérea (CPA) e Massa de Matéria Seca (MS) referentes aos quatro tratamentos sobre criopreservação em NL<sub>2</sub> em sementes de *Passiflora* spp. Cáceres – MT, 2014

<b><i>Passiflora nitida</i></b>								
FV	GL	QM Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR(cm)	CPA (cm)	MS (g)
Tratamento	3	0,0002 <sup>ns</sup>	0,8000 <sup>ns</sup>	0,0447 <sup>**</sup>	120,0000 <sup>**</sup>	10,9544 <sup>**</sup>	39,6467 <sup>**</sup>	0,0032 <sup>**</sup>
Erro	16	0,0000	0,3000	0,0045	12,8000	1,2814	6,5217	0,0004
Total	19	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	0,0036	0,2000	0,0784	4,4000	1,4470	2,9915	0,0226
CV%	-	273,86	273,86	85,90	81,31	78,23	85,37	90,09

<b><i>Passiflora foetida</i></b>								
FV	GL	QM Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR(cm)	CPA (cm)	MS (g)
Tratamento	3	0,0081 <sup>ns</sup>	35,4000 <sup>ns</sup>	0,0002 <sup>ns</sup>	1,3333 <sup>ns</sup>	0,6860 <sup>ns</sup>	0,9298 <sup>ns</sup>	1,30E-0007 <sup>ns</sup>
Erro	16	0,0025	8,1000	0,0006	4,8000	7,8465	10,9067	0,0000
Total	19	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	0,0494	3,1000	0,0161	1,4000	1,5700	1,8750	0,0010
CV%	-	100,54	91,81	154,82	156,49	178,42	176,14	185,03

Tabela 05, Cont...

<b><i>Passiflora mucronata</i></b>								
FV	GL	QM Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR(cm)	CPA (cm)	MS (g)
Tratamento	3	1,1469 <sup>ns</sup>	547,7333 <sup>ns</sup>	2,4372 <sup>**</sup>	2394,3333 <sup>**</sup>	4,3862 <sup>**</sup>	6,8679 <sup>**</sup>	0,0033 <sup>**</sup>
Erro	16	0,4602	244,1000	0,0605	59,5000	0,7253	0,1100	0,0002
Total	19	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	0,8033	22,4000	0,8259	29,5000	4,1300	5,3350	0,0375
CV%	-	84,46	69,75	29,79	26,15	20,62	6,22	35,28
<b><i>Passiflora micropetala</i></b>								
FV	GL	QM Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR(cm)	CPA (cm)	MS (g)
Tratamento	3	0,4166 <sup>**</sup>	1418,8667 <sup>**</sup>	0,0172 <sup>ns</sup>	104,2000 <sup>ns</sup>	0,8605 <sup>ns</sup>	3,0805 <sup>ns</sup>	0,0000 <sup>ns</sup>
Erro	16	0,0465	155,4000	0,0293	149,6000	0,8241	3,4979	0,0000
Total	19	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	0,5595	31,5000	0,1495	11,3000	1,4550	2,8940	0,0054
CV%	-	38,55	39,57	114,46	108,24	62,39	64,63	122,26
<b><i>Passiflora suberosa</i></b>								
FV	GL	QM Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR(cm)	CPA (cm)	MS (g)

Tabela 05, Cont...

Tratamento	3	0,9644 <sup>ns</sup>	237,0000 <sup>ns</sup>	0,5027 <sup>ns</sup>	97,6000 <sup>ns</sup>	0,6587 <sup>**</sup>	0,4387 <sup>*</sup>	0,0001 <sup>ns</sup>
Erro	16	0,4305	143,7000	0,1840	108,5000	0,0570	0,0925	0,0000
Total	19	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	2,7394	52,3000	1,4761	33,6000	3,0100	4,1965	0,0229
CV%	-	23,95	22,92	29,06	31,00	7,93	7,25	35,18

***Passiflora edulis***

FV	GL	QM Variáveis						
		IVG	G%	IVE	E%	CR(cm)	CPA (cm)	MS (g)
Tratamento	3	11,8070 <sup>**</sup>	6072,2000 <sup>**</sup>	2,0187 <sup>**</sup>	789,5333 <sup>**</sup>	0,2179 <sup>ns</sup>	1,2362 <sup>ns</sup>	0,0160 <sup>**</sup>
Erro	16	0,1143	103,7000	0,0521	37,6000	0,1868	0,6769	0,0012
Total	19	-	-	-	-	-	-	-
Média	-	1,8432	49,1000	0,8690	25,3000	3,8670	6,0170	0,1145
CV%	-	18,34	20,74	26,28	24,24	11,18	13,67	30,97

<sup>ns</sup> Não significativo, <sup>\*\*</sup> e <sup>\*</sup>Significativo a 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.