

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE
PLANTAS
ARIANE DE FARIA**

Criopreservação de sementes de *Passiflora* spp.

**CÁCERES
MATO GROSSO – BRASIL
DEZEMBRO – 2016**

ARIANE DE FARIA

Criopreservação de sementes de *Passiflora* spp.

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.

Orientador: Prof. Dr. Petterson Baptista da Luz

CÁCERES
MATO GROSSO – BRASIL
DEZEMBRO – 2016

Faria, Ariane de

Criopreservação de sementes de *Passiflora* spp./Ariane de Faria. – Cáceres/MT: UNEMAT, 2016. 96f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Mato Grosso. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, 2016.

Orientador: Petterson Baptista da Luz

1. Maracujá. 2. Crioprotetor. 3. Raio-X. I. Título.

CDU: 634.776.3

Ficha catalográfica elaborada por Tereza Antônia Longo Job CRB1-1252


Criopreservação de sementes de *Passiflora* spp.

ARIANE DE FARIA


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 14 de dezembro de 2016.


Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Peterson Baptista da Luz
PGMP-Unemat



Prof.^a Dr.^a Carla Lima Corrêa
Depto Agronomia - Unemat



Prof.^a Dr.^a Elisangela Clarete Camili
FAMEV- UFMT

Dedico à minha filha Jasmine (meu motivo), minha mãe Wilma (meu exemplo) e meu esposo Romero (meu apoio)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que me permitiu realizar.

À Secretaria de Educação do Estado de Mato Grosso (SEDUC), pela concessão da licença para qualificação profissional.

À Universidade do Estado de Mato Grosso e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, por oportunizarem a realização deste mestrado.

Ao meu orientador Dr. Petterson Baptista da Luz, por todos os ensinamentos e auxílio durante o mestrado. Agradeço imensamente por sua compreensão e apoio.

Ao professor Dr. Severino de Paiva Sobrinho, pela assistência que prestou em vários momentos, colaborando com seu conhecimento.

À professora Dr.^a Andréa dos Santos Oliveira por realizar e auxiliar na interpretação das imagens de raio-x.

À Universidade Federal de Lavras por ceder o Laboratório Central de Sementes para realização das imagens de raio-x.

A todos os professores do mestrado, que contribuíram significativamente na ampliação do meu conhecimento.

Aos colegas do mestrado Patrícia, Talita, Taiana, Raiane, Marcilene, Camila, Paula, Antônio, Juliane e Amanda pela amizade, companheirismo e bons momentos.

Aos bolsistas e voluntários do Laboratório de Sementes e Plantas Ornamentais, muito obrigada por todo auxílio nas montagens e avaliações dos experimentos.

Aos alunos de outras turmas do mestrado, Fabiano Soares, Carolina Barros, Marcos Júnior e Thalita Marostega pela amizade e contribuições com o meu trabalho.

À minha filha por simplesmente existir, por compreender a necessidade da minha ausência e por seus sorrisos e abraços em meus retornos ao lar.

À minha mãe que sempre apoiou as minhas escolhas, por seus conselhos, suas orações, por seu amor e por cuidar do meu bem mais precioso.

Ao meu esposo, pelo companheirismo e, sobretudo seu amor. Por todo incentivo e auxílio em todos os momentos.

Ao meu irmão pelo apoio, companheirismo e amizade. A todos os meus familiares e amigos que sempre me incentivaram com palavras de motivação e carinho.

BIOGRAFIA

Ariane de Faria, filha de Wilma de Faria, nasceu no dia 10 de agosto de 1987 na cidade de Arenópolis - Mato Grosso. Realizou toda a educação básica e ensino médio em escola estadual no mesmo município de nascimento. Em 2008/2 diplomou-se em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) *Campus* de Tangará da Serra - Mato Grosso. Trabalhou entre os anos de 2009 e 2012 em empresa de consultoria ambiental em Tangará da Serra. Efetivou-se em 2012 como professora de Ciências do Ensino Fundamental na Rede Estadual de Educação. Em 2015 ingressou no curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Genética e Melhoramento de Plantas na Universidade do Estado de Mato Grosso, área de concentração em Biotecnologia, desenvolvendo sua pesquisa no *Campus* universitário de Cáceres - Mato Grosso, trabalhando com criopreservação de sementes de *Passiflora*.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	x
ABSTRACT GERAL	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Gênero passiflora	4
2.2. Descrição das espécies de <i>Passiflora</i>	5
2.3. Importância do maracujazeiro	7
2.4. Recursos genéticos e conservação	10
2.5. Armazenamento de sementes	12
2.6. Criopreservação.....	13
2.6.1. Métodos de criopreservação	15
2.6.2. Fatores que influenciam a criopreservação	17
2.7. Crioprotetores	18
2.8. Germinação e vigor.....	20
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
4. CAPÍTULO I - Criopreservação de sementes de <i>Passiflora</i> spp.	34
RESUMO	34
ABSTRACT	36
INTRODUÇÃO	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
5. CAPÍTULO II – Teste de raio-X na avaliação da qualidade de sementes de <i>Passiflora</i> spp. criopreservadas	59
RESUMO	59
ABSTRACT	61
INTRODUÇÃO	63
MATERIAL E MÉTODOS.....	65
RESULTADOS E DISCUSSÃO	69

CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
6. CONCLUSÕES GERAIS	83

RESUMO GERAL

FARIA, Ariane de; M. Sc.; UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO; Dezembro de 2016. **Criopreservação de sementes de *Passiflora* spp.** Orientador: Petterson Baptista da Luz.

O maracujazeiro é amplamente utilizado para fins alimentícios, medicinais e ornamentais. As espécies nativas possuem diversas características de interesse ao melhoramento genético, como resistência a doenças e pragas e produtividade. Diante da importância das passifloras nativas, trabalhos visando a conservação de recursos genéticos destas espécies tornam-se estrategicamente importantes. A criopreservação tem se destacado entre as técnicas de conservação de germoplasma, devido à possibilidade de manutenção da viabilidade das sementes por longo prazo. No entanto, esta técnica traz consigo alguns problemas como injúrias aos tecidos, devido ao congelamento e o descongelamento, que pode ser minimizado com o uso de crioprotetores. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência de diferentes dosagens de crioprotetores, na criopreservação de sementes de genótipos de *Passiflora* spp., e inferir sobre a necessidade de crioproteção. Objetivou-se ainda avaliar a qualidade de sementes criopreservadas por meio de teste de raio-X, a fim de relacionar as imagens com os possíveis danos causados nas sementes em função da crioproteção e criopreservação. No experimento de criopreservação foi avaliada a eficiência de diferentes dosagens de crioprotetores em sementes de *Passiflora eichleriana*, *Passiflora cristalina* e *Passiflora nitida*. Foram adotados 14 tratamentos (sementes criopreservadas com quatro diferentes dosagens de três crioprotetores, sementes criopreservadas sem crioprotetor e um controle): glicerol a 1,73, 2,28, 2,60 e 2,71 M; sacarose a 0,37, 0,46, 0,54 e 0,61 M; dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,37, 0,72, 1,04 e 1,35 M; sementes criopreservadas sem crioprotetor e sementes não crioprotetidas e nem criopreservadas (controle). Após a crioproteção realizou-se a criopreservação (vitificação) em nitrogênio líquido (-196 °C). As sementes foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 5 minutos. Os testes de germinação e vigor foram realizados utilizando delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes para cada teste. As variáveis analisadas foram: porcentagem de

germinação, índice de velocidade de germinação, porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz, massa seca de parte aérea e massa seca de raiz. Os resultados evidenciam que sementes de *P. eichleriana*, *P. cristalina* e *P. nitida* podem ser criopreservadas sem utilização de crioprotetor. O crioprotetor glicerol compromete a viabilidade e vigor das sementes de todas as espécies de maracujá testadas o DMSO nas maiores dosagens diminui a viabilidade e vigor de sementes de *P. cristalina* e *P. nitida*. Para realização do teste de raio-X, foram avaliadas as seguintes espécies: *P. eichleriana*, *P. nitida* e *P. mucronata*. As sementes foram crioprotetidas, criopreservadas e descongeladas seguindo o mesmo protocolo dos experimentos de criopreservação. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, as quais após o descongelamento, foram fixadas em folhas de transparência com fita dupla-face e submetidas a exposição em raio-X, por meio do equipamento Faxitron MX-20 DC 12, com ajuste automático do tempo de exposição e intensidade de radiação. As sementes foram classificadas em semente cheia, semente vazia, semente malformada e semente danificada, posteriormente submetidas ao teste de germinação para obtenção da porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação. Na análise de imagens do teste de raio-X, não foram observadas rachaduras/trincas nas sementes de *P. eichleriana*, *P. nitida* e *P. mucronata*, assim sendo, sementes destas espécies não são danificadas pelos processos de crioproteção e criopreservação.

Palavras-chave: maracujá, crioprotetor, raio-X.

ABSTRACT GERAL

FARIA, Ariane de; M. Sc; UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO; Dezembro de 2016. **Seed cryopreservation of *Passiflora* spp.** Advisor: Petterson Baptista da Luz.

Passion fruit is widely used for food, medicinal and ornamental purposes. Native species have several characteristics of interest for genetic improvement, such as disease and pest resistance and productivity. Considering the importance of the native passifloras, works aiming at the conservation of genetic resources of these species become strategically important. Cryopreservation has been prominent among germplasm conservation techniques, due to the possibility of maintaining seed viability for the long term. However, this technique brings with it some problems like tissue injury due to freezing and thawing, which can be minimized with the use of cryoprotectants. The present work had as objectives to evaluate the efficiency of different dosages of cryoprotectants, in the cryopreservation of seeds of genotypes of *Passiflora* spp., and to infer about the need for cryoprotection. The objective of this study was to evaluate the quality of cryopreserved seeds by means of X-ray test, in order to relate the images to the possible damage caused to the seeds as a function of cryoprotection and cryopreservation. In the cryopreservation experiment the efficiency of different cryoprotectant dosages in *Passiflora eichleriana*, *Passiflora crystallina* and *Passiflora nitida* seeds was evaluated. Fourteen treatments (cryopreserved seeds with four different dosages of three cryoprotectants, cryopreserved seeds without cryoprotectant and one control) were adopted: glycerol at 1.73, 2.28, 2.60 and 2.71 M; Sucrose at 0.37, 0.46, 0.54 and 0.61 M; Dimethylsulfoxide (DMSO) at 0.37, 0.72, 1.04 and 1.35 M; Cryopreserved seeds without cryoprotectant and seeds not cryoprotected nor cryopreserved (control). After cryoprotection, cryopreservation (vitrification) was performed in liquid nitrogen (-196 ° C). The seeds were thawed in a water bath at 37 ° C for 5 minutes. Germination and vigor tests were performed using a completely randomized design, with four replicates of 50 seeds for each test. The variables analyzed were: germination percentage, germination speed index, emergency percentage, emergency speed index, shoot length, root length, shoot dry mass and root dry mass. The results show that seeds of *P. eichleriana*, *P. cristalina* and *P. nitida* can be cryopreserved without

the use of cryoprotectants. The glycerol cryoprotectant compromises the viability and vigor of the seeds of all passion fruit species tested in DMSO at higher dosages, decreasing the viability and vigor of seeds of crystalline *P.* and *P. nitida*. For the X-ray test, the following species were evaluated: *P. eichleriana*, *P. nitida* *P. mucronata*. The seeds were cryoprotected, cryopreserved and thawed following the same protocol as the cryopreservation experiments. Four replicates of 25 seeds were used for each treatment, which after thawing were fixed in double-sided tape and exposed to X-ray, using the Faxitron MX-20 DC 12 equipment, with adjustment Automatic exposure time and radiation intensity. The seeds were classified as full seed, empty seed, malformed seed and damaged seed. Afterwards, submitted to the germination test to obtain the percentage of germination and index of germination speed. In the analysis of X-ray test images, no cracks were observed in the seeds of *P. eichleriana*, *P. nitida* *P. mucronata*, therefore, seeds of these species are not damaged by the cryoprotection and cryopreservation processes.

Keywords: passion fruit, cryoprotectant, X-ray.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A fruticultura é tida como um segmento muito importante do agronegócio, tanto em nível nacional como internacional. O Brasil apresenta respeitável acervo de recursos genéticos de fruteiras, formando um verdadeiro pomar, visto que praticamente toda conservação é realizada na forma de coleções em campo, com exceção de poucos acessos duplicados na forma de sementes, entre eles o maracujá (Ferreira, 2011).

Dentre as fruteiras, o maracujazeiro possui grande relevância devido à importância social e econômica para o país, sendo expressiva fonte de renda para os produtores, com mercado promissor para a indústria de sucos (Paiva et al., 2014), para fins alimentícios, como fruta fresca (Meletti, 2011) e para fins medicinais, ornamentais (Zeraik et al., 2010; Faleiro et al., 2011).

A cultura do maracujazeiro caracteriza-se por ser atividade predominante em pequenas propriedades (3 a 5 ha) e desenvolvida por mão-de-obra familiar (Meletti, 2011; Cunha, 2013), que contribui grandemente na valorização do trabalho dos pequenos produtores onde se observam elevadas produções e qualidade que podem ser altamente compensadoras (Bruckner et al., 2002); apresenta ainda elevado nível de empregabilidade, uma vez que cada hectare de maracujá gera de 3 a 4 empregos diretos e ocupa cerca de 7 a 8 pessoas, nos diversos elos da cadeia produtiva (Meletti, 2011).

O maracujazeiro possui grande variabilidade genética a ser conhecida, caracterizada, protegida, conservada e convenientemente utilizada em programas de melhoramento genético (Faleiro et al., 2005). Várias espécies do gênero *Passiflora* possuem características de resistência a fungos do solo, morte precoce e diversas outras doenças, o que pode ser utilizado em programas de melhoramento genético para maracujazeiros comerciais (Aguiar et al., 2010; Andrade et al., 2010; Silva et al., 2012). Visto a importância que as passifloráceas nativas possuem, há de se buscar estratégias para aproveitar todo o potencial do gênero, principalmente de espécies da biodiversidade brasileira.

Estudos de caracterização, domesticação, documentação, divulgação e marketing são estratégicos e de grande importância para a conservação das

espécies de *Passiflora*, para usos futuros no melhoramento genético (Ferreira, 2005). Uma importante estratégia de conservação inicial é a colheita e o armazenamento adequado das sementes, onde os recursos genéticos podem ser preservados, garantindo a qualidade das sementes colhidas, especialmente no aspecto fisiológico (Abreu, 2009). A semente é a forma que proporciona maior tempo de sobrevivência à planta, mantendo-se com atividade fisiológica mínima (Wetzel et al., 2003). Carvalho e Otoni (2010) destacam que existem várias formas de armazenamento das sementes, como por exemplo, a criopreservação. A criopreservação em nitrogênio líquido é tida por muitos como o método ideal para a preservação de sementes (Camillo et al., 2009; Carvalho e Otoni, 2010; Santos, 2011),

O processo de criopreservação traz consigo alguns problemas de ordem fisiológica, onde as sementes podem sofrer injúrias mecânicas, comprometendo a viabilidade (Santos, 2000; Carvalho e Otoni, 2010). Para minimizar as injúrias às células das sementes, faz-se necessário a utilização de técnicas de proteção destas sementes antes da criopreservação, utilizando-se os chamados crioprotetores (Veiga et al., 2006).

Quanto ao processo de criopreservação, as sementes de diferentes espécies apresentam comportamento individualizado, o que exige uma diferenciação no protocolo a ser utilizado, sendo necessárias realizações de ensaios para definição de protocolos para cada espécie, onde se evidencie o comportamento fisiológico em relação ao armazenamento em nitrogênio líquido (NL₂) (Carvalho e Otoni, 2010).

Diante do exposto, é fundamental que mais estudos sejam realizados, visando o aperfeiçoamento do método de criopreservação para as diferentes espécies vegetais, para que assim se conservem no maior tempo possível suas sementes, que poderão no futuro próximo ou distante serem utilizadas em benefício da sociedade através do melhoramento genético.

Sendo assim neste trabalho o objetivo foi de avaliar a eficiência de diferentes dosagens de crioprotetores, na criopreservação de sementes de genótipos de *Passiflora* spp., e inferir sobre a necessidade de crioproteção. Objetivou-se ainda avaliar a qualidade de sementes criopreservadas por meio de teste de raio-X, a fim

de relacionar as imagens com os possíveis danos causados nas sementes em função da crioproteção e criopreservação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Passiflora*

As passifloras popularmente conhecidas como maracujá, fazem parte da família das Passifloraceae e estão largamente distribuídas pelos trópicos (Oliveira, 1987). A família Passifloraceae está dividida em duas tribos, Paropsieae e Passiflorieae sendo que a última está representada no continente americano por quatro gêneros, entre os quais destaca-se o *Passiflora* (Cervi, 2006).

O gênero *Passiflora* é o mais rico numericamente dentro da família Passifloraceae, apresentando entre 450 a 537 espécies (Feuillet e MacDougal, 2003; Vanderplank, 2007), sendo a maioria nativa da América tropical e pelo menos um terço tem o centro de origem no Brasil. As espécies desse gênero estão distribuídas em quatro subgêneros: *Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* e *Passiflora* (Feuillet e MacDougal, 2003).

O subgênero *Passiflora* é o mais representativo, com distribuição pantropical, sendo o Brasil e a Colômbia os países com maior número de espécies (Cervi, 1997; Bernacci et al., 2003). Cerca de 140 a 150 espécies são originárias no Brasil, um dos principais centros de diversidade genética, cujo maior centro de distribuição geográfica localiza-se no Centro-Norte do Brasil (Lopes, 1991; Ferreira, 2005; Cervi, 2006). No entanto a produção e cultivo de *Passiflora* estão essencialmente consagrados ao maracujá amarelo (D'eeckenbrugge, 2003).

As passifloras receberam dos colonizadores este nome em função da flor, o nome “flor da paixão” tem conotação no sentido religioso e se deve à primeira espécie descoberta (atualmente *Passiflora incarnata* L.) onde partes da flor e folhas para eles tinham relação a alguns instrumentos da paixão de Cristo. As folhas recordavam a lança que transpassou o Salvador na cruz; as gavinhas, o açoite; a corona de filamentos, de coloração vermelha e azul, a coroa de espinhos; os três estiletos simulavam os três cravos e as cinco anteras representavam as chagas do crucificado (Cervi, 1997).

O maracujazeiro é caracterizado por Embrapa (1994) como uma trepadeira lenhosa, perene, de crescimento rápido, vigoroso, contínuo e exuberante com raízes superficiais. Os frutos das passifloras são descritos como bagas de forma, tamanho

e cores variadas. No interior, em geral, contém polpa ácida, mucilagínosa ou aquosa, em forma de arilo que recobre as sementes. As sementes são numerosas, compridas de forma, ovada, obovadas ou obcordada e possuem testa dura, podendo ser reticulada, estriada, faveolada ou sulcada, o ápice é liso, bidentado ou tridentado (Cervi, 1997).

Os frutos são consumidos das mais variadas formas, diretamente a fresco ou em sucos, sorvetes, geleias e confeitarias. Além disso, pelas formas complexas, originais e espetaculares, muitas passifloras representam grande interesse ornamental (D'eeckenbrugge, 2003). São importantes do ponto de vista comercial por possuírem propriedades nutricionais e medicinais presentes nas folhas, flores e frutos, são desta forma utilizadas para fins alimentícios, medicinais e ornamentais (Bruckner et al., 2002; Andrade et al., 2010).

Quanto ao sistema reprodutivo na maioria das espécies de maracujá a polinização é cruzada, sendo o maracujazeiro uma planta alógama, onde para espécies de flores grandes a polinização é realizada eficientemente pelas mangavas (*Xylocopa* spp.), sendo a polinização fator preponderante para a frutificação em maracujazeiros (Bruckner et al., 2002; Cunha, 2013). A polinização cruzada é determinada na maior parte pela existência da autoincompatibilidade, que impede que os pólenes de uma planta fertilizem suas próprias flores e produzam sementes por meio da autofecundação (Bruckner et al., 2002; Cunha, 2013).

2.2. Descrição das espécies de *Passiflora*

Passiflora eichleriana Masters - Pode ser encontrada no Brasil nos estados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e, no Paraguai (Cervi, 1997; Bernacci et al., 2003). Popularmente é conhecida como maracujá no Paraná e maracujá-de-cobra em Minas Gerais e Santa Catarina. Trepadeira herbácea, glabra. Flor solitária, pétala subigual à sépala, alva com sementes ovadas, lustrosas, foveoladas. Floresce de agosto a dezembro e frutifica de novembro a fevereiro (Cervi, 1997; Bernacci et al., 2003).

Passiflora nitida HBK – Essa espécie recebe este nome por apresentar flores grandes e vistosas. É popularmente conhecida como maracujá-de-cheiro no

Amazonas e maracujá-de-rato ou maracujá suspiro (Cervi, 1997; Andrade et al., 2010). Trata-se de uma espécie heliófita que se desenvolve no Cerrado, bem como na floresta densa, isso quando os ramos atingem as copas das árvores mais altas. É uma planta escandente, totalmente glabra, apresenta caule cilíndrico, com folhas ovado-oblongas, ovado-elípticas ou ovadas. As flores medem de 9 a 12 cm de diâmetro e as sementes são obcordadas, reticuladas e tridentadas no ápice. Apresenta distribuição geográfica no Brasil, nos estados do Acre, Amazonas, Bahia, Brasília, Goiás, Mato Grosso, Pará e Rondônia, sendo também encontrada na Bolívia, Colômbia, Guiana, Guiana Francesa, Panamá, Peru, Suriname, Venezuela. Floresce de dezembro a março e frutifica de abril a julho (Cervi, 1997). Tem sido estudada como fonte de resistência a doenças e como porta-enxerto (Andrade et al., 2010).

Passiflora cristalina Vanderpl. & Zappi – Esta espécie pertence à secção Distephana do subgênero *Passiflora*, recebe este nome em função do local de sua descoberta, pois, foi encontrada primeiramente no Parque Estadual Cristalino, na Floresta Amazônica ao norte do estado de Mato Grosso. Apresenta flores de coloração vermelho brilhante, que se mantêm eretas antes e durante a antese, tornando-se peduncular à medida que o ovário se desenvolve. Seus frutos são verde-escuros, ricamente variegados com manchas verde-claras em seis seções bem definidas; as sementes são simétricas ou ligeiramente assimétricas, ovoide-lenticular, com base aguda, ápice arredondado com bico triangular e com superfície reticulada em ambos os lados (Vanderplank e Zappi, 2011).

É uma espécie que necessita de alta intensidade de luz para iniciar a floração, o que ocorre durante o período de seca em agosto, precedendo a frutificação na mesma temporada (Vanderplank e Zappi, 2011). Por possuir flores vermelhas e vistosas, esta espécie torna-se alvo para a ornamentação, e a conservação desse material é de suma importância, pois, o mesmo pode apresentar uso potencial no melhoramento (Göttert et al., 2015).

Passiflora mucronata Lam. – Esta espécie recebe este nome por possuir as estípulas mucronadas. É uma espécie heliófita que vive exclusivamente na restinga, sobre arbustos. Trata-se de uma planta escandente, totalmente glabra, com caule cilíndrico, flexuoso, com folhas ovado-cordado medindo de 4 a 12 x 2,5 a

6 cm. As flores são alvas, e fosforescentes, com antese noturna; possuem longo período de florescimento apresentando resistência ao frio, e vigor vegetativo moderado observado nas condições avaliadas, com suas flores medindo cerca de 8 a 19 cm de diâmetro (Meletti et al., 2011; Cervi, 1997). Fruto ovoide e sementes oblongo-obcordadas, achatadas e foveoladas. No Brasil *Passiflora mucronata* é encontrada nos estados da Bahia, Espírito Santo, Paraíba, Pernambuco e Rio de Janeiro. Na Bahia e no Rio de Janeiro recebe o nome de sururú e maracujá-de-restinga. Floresce e frutifica durante todo o ano, porém, a floração máxima ocorre nos meses de fevereiro a maio (Cervi, 1997).

De acordo com Meletti et al. (2011), *P. mucronata*, apresenta elevado potencial ornamental dentro do grupo das plantas trepadeiras, sendo indicada para cercas vivas ou caramanchões, sendo também seus frutos comestíveis (Bernacci et al., 2003). As sementes desta espécie apresentam germinação desuniforme e lenta necessitando da utilização de métodos de superação de dormência para ter a germinação ampliada, o que é alcançado quando as sementes são armazenadas em câmara seca e fria associada ao choque térmico. As sementes desta espécie por apresentar uma longevidade maior que a maioria das passifloráceas, permite a formação de lotes comerciais de sementes (Meletti et al., 2011).

2.3. Importância do maracujazeiro

A fruticultura é um seguimento de grande importância dentro do setor do agronegócio tanto a nível nacional quanto internacional. O Brasil detém respeitável acervo de recursos genéticos de fruteiras, com um verdadeiro pomar de coleções em campo (Ferreira, 2011).

Na fruticultura tropical, a cultura do maracujá vem ocupando um lugar de destaque, onde tal segmento muito se expandiu, onde o início de cultivo econômico como fruteira tropical ocorreu na Austrália e no Havaí, com a utilização de espécies nativas do Brasil (Meletti et al., 2011).

O maracujazeiro apresenta expressiva fonte de renda para os produtores e um mercado promissor para a indústria de sucos, o que lhe confere grande relevância devido a sua importância social e econômica para o país (Paiva et al., 2014). Meletti (2011) e Cunha (2013) afirmam que a cultura do maracujazeiro é

predominante em pequenas propriedades, sendo desenvolvida por mão-de-obra familiar. O que além de gerar empregabilidade, para amplia a receita de pequenos produtores por ser um produto de elevada produtividade e qualidade (Bruckner et al., 2002; Meletti, 2011).

A cultura de maracujá ganhou expressão econômica na década de 80, inicialmente pelo incentivo da agroindústria para produto na forma de suco (Bruckner e al., 2002). De acordo com Cunha (2013) além do consumo *in natura*, o maracujá pode ser processado como polpa, geleia e néctar e ainda ser utilizado na fabricação de suco pronto para beber, integral a 14 ° Brix e concentrado a 50 ° Brix que é destinado para exportação. No entanto, para aumentar a produtividade dessa espécie, é necessário que cultivares mais produtivas, adaptadas a diferentes regiões do país e resistentes a doenças sejam introduzidas nos cultivos comerciais (Meletti, 2011).

Dados do IBGE dos anos de 2013, 2014 e 2015 mostram um decréscimo na produção da cultura do maracujazeiro. Em 2013 a produção nacional de maracujá foi de 838.244 toneladas com uma área de colhida de 57.277 hectares (IBGE, 2013), em 2014 a produção foi de 823.284 toneladas com uma área de colhida de 56.825 hectares (IBGE, 2014), já em 2015 teve-se uma produção de 694,539 toneladas em 50.837 hectares colhidos (IBGE, 2015). No Mato-Grosso no ano de 2013 produziu-se 7.779 toneladas com uma área colhida de 464 hectares (IBGE, 2013) e no ano de 2014 a produção foi de 6.588 toneladas em uma área de 416 hectares (IBGE, 2014).

De acordo com Faleiro et al. (2005) e Machado et al. (2015) os problemas fitossanitários, notadamente as doenças provocadas por patógenos do solo e às várias doenças que afetam a cultura, constituem-se as mais importantes causas para a queda de produção, fato que corresponde a inexistência de cultivares com resistência e técnicas que diminuam os danos econômicos causados pelo ataque de insetos, pragas e doenças.

O maracujazeiro possui grande variabilidade genética principalmente no Brasil, a ser conhecida, caracterizada, protegida, conservada e convenientemente utilizada comercialmente ou em programas de melhoramento genético (Bernacci et al., 2005; Faleiro et al., 2005; Ferreira, 2005).

Segundo Meletti et al. (2005) algumas espécies nativas de maracujá do Centro-Norte brasileiro são de grande importância ao melhoramento genético por apresentarem resistência a doenças e pragas, longevidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos interessantes para a indústria farmacêutica e outras potencialidades, quase todas ainda inexploradas. Apresentam também grande utilização e importância como porta-enxertos visando resistência a fungos do solo, morte precoce do maracujazeiro e no controle de doenças do maracujazeiro, ampliando a base genética da resistência, em combinação com características de produtividade e qualidade de frutos (Faleiro et al., 2008; Aguiar et al., 2010; Andrade et al., 2010; Silva et al., 2012; Machado et al., 2015).

No Brasil, o aumento da utilização de novas áreas do Centro-Norte para fins agrícolas, fatalmente implica na eliminação de espécies nativas e desaparecimento de muitos genótipos que poderiam ser utilizados, por exemplo, no melhoramento genético do maracujá-azedo (Faleiro et al., 2011).

Para evitar ou diminuir o problema, são necessárias ações tais como: criação, ampliação e manutenção de bancos de germoplasma; conservação, caracterização (morfológica, agrônômica, citogenética e molecular) e uso de germoplasma (utilização em cultivos comerciais, em programas de melhoramento genético, em intercâmbio de germoplasma e utilização de princípios ativos, moléculas e genes), obtendo-se assim a combinação de características de produtividade e qualidade de frutos com a resistência múltipla a doenças, permitindo o lançamento de novas cultivares (Faleiro et al., 2011).

Além dos usos comerciais das passifloras, estas ainda apresentam potencial ornamental, onde híbridos têm sido cultivados para este fim em vários países do hemisfério norte, onde se verifica clima desfavorável para desenvolvimento de espécies tropicais. O Brasil, por sua vez possui condições edafoclimáticas e ampla variabilidade genética, no entanto, é um mercado praticamente inexplorado. Assim, através de programas de melhoramento, a flor de maracujá pode ser introduzida no mercado de plantas ornamentais tropicais brasileiras (Pires et al., 2012).

Para que haja efetivo sucesso da fruticultura brasileira, vários fatores são necessários, sendo um deles a pesquisa científica, especialmente voltada ao melhoramento genético, o qual está intimamente correlacionado e é altamente dependente dos recursos genéticos (Ferreira, 2011).

2.4. Recursos genéticos e conservação

Recursos genéticos correspondem ao germoplasma que é a soma de todo material hereditário de uma espécie, constituindo a fonte de variabilidade genética disponível para o melhoramento de plantas, sendo que a importância está tanto no favorecimento do ambiente a nível ecológico, quanto para interesses agrícolas manipulados pela população humana (Pereira et al., 2010; Ferreira, 2011). O germoplasma possui abrigo nos chamados Bancos de Germoplasma, os quais tratam-se do repositório da variabilidade genética de uma ou de várias espécies, localizados em centros de pesquisa ou instituições públicas e privadas, que conservam as coleções sob a forma de sementes, explantes *in vitro* ou plantas a campo (Ferreira, 2011).

No Brasil o primeiro Banco de Germoplasma a ser criado foi o do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), em 1930. Apenas na década de 70 foi criado pelo Governo Federal o Centro Nacional de Pesquisa em Recursos Genéticos e Biotecnologia – EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN) – tornando-se em 2008 o quarto maior Banco de Germoplasma do mundo, com 150 mil subamostras (Embrapa, 2008).

A principal forma de conservação dos Bancos de Germoplasma de espécies é a *ex situ*, ou seja, fora do *habitat* natural, no entanto a principal crítica feita a este tipo de conservação é que a seleção natural fica impossibilitada de atuar, e assim os genótipos não sofrem o processo de evolução no ambiente natural (Nick et al., 2010). A conservação *ex situ* pode ser implantada por meio de propagação vegetativa, banco de sementes e germoplasma *in vitro* (Santos, 2000; Wetzel et al., 2003; Carvalho e Otoni, 2010; Santos, 2011).

De acordo com Meletti et al. (2007), para algumas espécies, as coleções *in vitro* têm sido bem sucedidas, especialmente as que exigem produção de matrizes livres de vírus, com a vantagem da economia de espaço e da simplificação nos

procedimentos de intercâmbio e quarentena de germoplasma. Para a maioria das espécies de *Passiflora*, o uso extensivo da técnica de manejo de germoplasma é limitado, pois, faltam protocolos de regeneração e conservação *in vitro* específicos. Outros fatores que dificultam a adoção dessa técnica são a necessidade de repetidas subculturas, a exigência de infraestrutura e mão-de-obra especializada e a frequente contaminação por patógenos.

Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), *ex situ* mantém parte da diversidade existente somente por curto ou médio prazos. Isso, no entanto, gera altos custos de manutenção, além de expor as plantas a doenças, pragas e problemas climáticos, que podem acelerar a erosão genética (Engelmann, 1991).

A semente, por sua vez, é a forma pela qual a planta sobrevive o máximo de tempo com o mínimo de atividade fisiológica é a forma mais simples de conservar recursos genético *ex situ* (Wetzel et al., 2003; Tarré et al., 2007; Carvalho e Otoni 2010). Também é a forma mais comum neste tipo de conservação, já que esta é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (Roberts, 1973).

Para Wetzel et al. (2003) e Faleiro et al. (2005), observando-se os recursos genéticos, em uma perspectiva de perda do material, é possível apontar como forte agente o avanço das fronteiras agrícolas no Centro-Norte do Brasil (principal centro de distribuição geográfica do maracujá), onde os trabalhos visando a conservação de recursos genéticos tornaram-se estrategicamente importantes. De acordo com Abreu (2009), os remanescentes florestais encontram-se drasticamente alterados, ocasionando erosão genética de diversas espécies vegetais, comprometendo a regeneração natural e a sobrevivência de futuras gerações.

Portanto, a coleta de germoplasma a conservação de sementes é uma importante estratégia para amenizar problemas relacionados ao desmatamento, onde os recursos genéticos podem ser preservados e utilizados na recuperação dos ecossistemas degradados, mantendo a variabilidade genética de espécies ameaçadas (Guerrant et al., 2014). Para Santos e Salomão (2010), os bancos de sementes são de elevada importância no papel da conservação a longo prazo de uma diversidade genética, visto que esta diversidade é essencial para o contínuo

melhoramento de muitas espécies agrícolas e para a segurança nutricional e alimentar.

2.5. Armazenamento de sementes

Para manter a viabilidade das sementes por um período superior à sua longevidade natural, pode-se realizar o armazenamento (Nodari et al., 1998). A longevidade implica na manutenção da viabilidade das sementes por um período de tempo e depende diretamente das características das sementes (Popinigis, 1985), como fisiologia, morfologia, composição química e maturidade (Bonner, 2008). A longevidade varia também em função do genótipo, do grau de umidade, das condições do ambiente de armazenamento, atuação de mecanismos de dormência e integridade das sementes (Costa, 2009; Carvalho e Nakagawa, 2012).

O ambiente de armazenamento tem por objetivo reduzir o metabolismo das sementes tanto quanto possível, sem danificá-las, e ainda impedir o ataque por microrganismos, sendo fundamental para o prolongamento da vida útil das sementes. Quando armazenadas, as sementes devem ter a taxa metabólica em níveis que mantenha a integridade dos embriões, conservando o máximo possível das reservas alimentares (Bonner, 2008).

O armazenamento deve proporcionar condições adequadas, para os diferentes tipos de sementes, a fim de conservar a viabilidade das mesmas por maiores períodos de tempo. Os ambientes utilizados para armazenamento são: Câmaras frias e úmidas - com temperatura variando de 5 a 10 °C e U.R. de 40 a 90% ; Câmaras secas - com temperatura variando de 10 a 15 °C e U.R. de 40 a 50%; Câmaras frias e secas - com temperatura variando de 4 a 10 °C e U.R. de 40 a 50% (Barbosa, 2014).

Para conservação há de se considerar o tipo de semente, e neste sentido Roberts (1973) dividiu as espécies em duas categorias: espécies com sementes ortodoxas e espécies com sementes recalcitrantes. Tal classificação depende da maior ou menor tolerância à dessecação e ao armazenamento sob baixas temperaturas (Costa, 2009).

As sementes ortodoxas podem ser desidratadas para aproximadamente 5 a 10% do teor de água inicial e armazenadas a aproximadamente -18 °C (Roberts,

1973; Costa, 2009; Radha et al., 2012); podem ser mantidas em embalagens à prova de umidade, sendo comum o armazenamento seco com baixa temperatura (Bonner, 2008).

As sementes recalcitrantes são ricas em umidade e são incapazes de suportar dessecação excessiva para permitir o armazenamento a baixa temperatura (Roberts, 1973; Costa, 2009; Radha et al., 2012).

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

Uma outra classe de sementes, as intermediárias, apresentam pequena resistência a baixas temperaturas, porém, certa tolerância à dessecação, apresentando comportamento intermediário entre ortodoxas e recalcitrantes (Costa, 2009). Toleram a desidratação até teores de água entre 7 e 10% e não toleram temperaturas baixas por períodos prolongados (Ellis et al., 1990).

As sementes de espécies do gênero *Passiflora* podem ser classificadas como ortodoxas ou ortodoxas intermediárias, tolerantes à perda de umidade (Nakagawa et al., 1991; Catunda et al., 2003; Meletti et al., 2007). Quanto a melhor forma de armazenar sementes de *P. edulis* (maracujá-amarelo) Nakagawa et al. (1991), determinaram que o armazenamento em câmara fria apresenta melhor desempenho para manter a germinação das sementes.

No entanto, a conservação de semente ortodoxas sob condições de baixas temperaturas (-18 a -20 °C) e umidade (< 7%) não inibe completamente a respiração e o processo de deterioração das sementes, sendo necessária a utilização de outros métodos de conservação do material biológico. Dentre as formas de conservação *ex situ* a longo prazo tem-se empregado os métodos de criopreservação (Costa, 2009; Carvalho e Otoni, 2010).

2.6. Criopreservação

Carvalho e Otoni (2010) apontam a criopreservação como importante técnica de armazenamento de sementes, onde o material é armazenado em temperaturas

ultrabaixas. A criopreservação é definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou em sua fase de vapor a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Engelmann, 1991; Santos e Salomão, 2010; Radha et al., 2012).

Camillo et al. (2009) e Engelmann (2011), apontam a criopreservação como eficiente alternativa de armazenamento, por permitir a conservação do material por longos períodos em temperaturas ultrabaixas ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), apresentando como principais vantagens neste tipo de armazenamento a longevidade da conservação, espaço físico reduzido, proteção contra contaminações e o baixo custo, já que não necessita de sistema de refrigeração. No tocante baixo custo alguns trabalhos demonstram que a criopreservação de um acesso de fruteira temperada apresenta custo anual de cerca de um dólar com um custo inicial de 50 a 60 dólares (Engelmann et al., 2004; Santos, 2011).

A criopreservação é considerada ideal por muitos autores, pois, proporciona preservação sem limites de tempo com redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é praticamente paralisada, prolongando a viabilidade das sementes a longo prazo (Veiga et al., 2006; Tarré et al., 2007; Engelmann, 2011; Santos, 2011). Para Santos (2000) e Engelmann (2011), a criopreservação é a única técnica capaz de atender pré-requisitos de conservação a longo prazo de estruturas organizadas com alta estabilidade genética e biológica para espécies propagadas vegetativamente e espécies com sementes recalcitrantes ou intermediárias.

O armazenamento por criopreservação é a condição mais adotada pela maioria dos bancos de sementes demonstrando grande eficiência, podendo aumentar significativamente a habilidade de conservar o germoplasma de plantas propagadas vegetativamente e aquelas cujas sementes são difíceis de conservar (Wetzel et al., 2003; Carvalho e Otoni, 2010; Pereira et al., 2010).

Santos e Salomão (2010) e Radha et al. (2012), afirmam que ao longo de 25 anos, as técnicas de criopreservação vem sendo desenvolvidas e melhoradas representando um valioso método de armazenamento de germoplasma vegetal a longo prazo. Os autores apontam ainda, que qualquer parte da planta pode ser utilizada para criopreservação, sendo elas: sementes, meristemas, ápices caulinares, gemas dormentes (gemas axilares), pólenes, embriões somáticos ou

zigóticos e criopreservação de sistemas *in vitro* (células em suspensão, embriões somáticos e calos).

Diversos trabalhos foram realizados com criopreservação de sementes, podendo-se citar: alface (Kaurin e Stushnoff, 1985; Jaganathan et al., 2014); cebola (Molina et al., 2006); espécies do gênero *Encholirium* e *Dyckia* (Bromeliaceae) (Tarré et al., 2007); pinhão-manso (Goldfarb et al., 2008); algodão (Rocha et al., 2009); dendezeiro (Camillo et al., 2009); espécies de Amaryllidaceae (Tombolato et al., 2009); calos de sementes de arroz maduras (Miranda et al., 2009); espécies de *Passiflora* (Araújo et al., 2016); orquídea *Cattleya labiata* (Ferrari, 2016) e bromélia *Encholirium spectabile* (Ferrari et al., 2016).

No entanto, o desenvolvimento de protocolos de criopreservação é voltado na grande maioria para espécies economicamente importantes, sendo limitados os estudos com espécies nativas e ameaçadas (Civatti et al., 2014). Vários métodos de criopreservação são utilizados podendo-se citar o método clássico como precursor, seguido de métodos baseados na vitrificação (Santos, 2001; Carvalho e Otoni, 2010).

2.6.1. Métodos de criopreservação

Os primeiros protocolos de criopreservação de tecidos vegetais utilizavam congelamento em duas fases: congelamento lento, até uma temperatura de pré-congelamento (-30 a -40 °C), a uma velocidade de congelamento definida (1 a 10 °C/hora) usando-se um congelador programável, seguido de congelamento rápido com a imersão direta em nitrogênio líquido (Santos e Salomão, 2010; Santos, 2001).

No congelamento lento, a cristalização da água ocorre primeiramente no meio externo (Engelmann, 1991). À medida que a temperatura decresce e aproxima-se de 0 °C, a célula e seu meio externo inicialmente atingem um estado de super-resfriamento (“supercooling”) e, posteriormente, ocorre a formação de gelo no meio extracelular. O conteúdo da célula supercongelada permanece descongelado em virtude da parede celular e da membrana plasmática agirem como barreiras, prevenindo que os cristais de gelo presentes nos espaços intercelulares penetrem a célula e desencadeiem o congelamento do citoplasma (Engelmann, 1991; Santos, 2000).

A perda de água da célula supercongelada ocorre em função da pressão de vapor, em maior quantidade na célula do que no exterior celular congelado, e com a progressiva redução da temperatura, a água se difunde do interior das células para a solução extracelular e é convertida em gelo na superfície das células ou entre o protoplasto e a parede celular. Como resultado, a concentração da solução celular aumenta e a célula perde turgor. Este fenômeno é chamado de desidratação induzida por congelamento ("freeze-induced desiccation"). Em tais casos, a célula desidrata-se, reduzindo a um mínimo ou removendo completamente a água livre, evitando assim a formação de gelo em seu interior. Quando o potencial hídrico das células parcialmente desidratadas iguala-se àquele do gelo extracelular, um equilíbrio é estabelecido e a desidratação adicional não ocorrerá contanto que a temperatura permaneça constante (Santos, 2000).

Entretanto, se as células forem excessivamente desidratadas podem ser danificadas pela exposição aos efeitos nocivos da concentração elevada dos eletrólitos celulares (efeitos de solução). O método de congelamento lento é um procedimento complexo no qual a velocidade de congelamento e a temperatura de pré-congelamento têm papel crítico na preservação da viabilidade do material (Santos, 2000). Este tipo de congelamento permite a remoção da maior parte da água livre de dentro das células, processo difícil por ser complexo e requerer congelador programável, equipamento este de custo elevado (Santos e Salomão, 2010).

Em protocolos convencionais emprega-se também pré-tratamento com soluções crioprotetoras, utilizando um único crioprotetor ou mistura de substâncias químicas coligativas, por exemplo, dimetilsulfóxido (DMSO) inferior a 15%, os quais são normalmente adicionados progressivamente, porém em concentrações inferiores as soluções de crioprotetores utilizadas em procedimentos baseados na vitrificação, porém sem excessiva remoção de água das células (Gonzales-Arnão et al., 2008).

Engelmann (2011) aponta ao todo sete procedimentos de criopreservação desenvolvidos a partir da vitrificação, sendo eles: (1) encapsulamento-desidratação; (2) vitrificação; (3) encapsulamento vitrificação; (4) dessecação; (5) pré-tratamento; (6) pré-tratamento-desidratação; e (7) congelamento por gota.

As técnicas de criopreservação desenvolvidas baseadas na vitrificação tem por princípio a formação do estado vítreo. Kartha (1985) afirma que abaixo de -130 °C tem-se o estado físico cristalino ou estado vítreo, onde a viscosidade é muito elevada, a difusão é insignificante, a energia cinética molecular é muito baixa e as reações metabólicas são paralisadas completamente, uma vez inexistente a energia térmica.

A transição para o estado vítreo apresenta apenas mudanças físicas na viscosidade do líquido sem que haja mudanças químicas, o sólido formado apresenta propriedades mecânicas sólidas, porém, sem formação de estrutura cristalina, e sim uma solução supersaturada e de alta viscosidade, sem cristalização do gelo. O congelamento ultra-rápido promove a desidratação das células antes do congelamento, evitando a formação de grandes cristais de gelo dentro das células (Sakai, 2000; Santos, 2000; Carvalho e Otoni, 2010). De acordo com Engelmann (1991), no congelamento rápido a água intracelular forma micro-cristais em tamanhos inofensivos para a integridade dos componentes celulares.

2.6.2. Fatores que influenciam na criopreservação

O efeito da criopreservação na semente se dá por três fatores, a desidratação, o congelamento e o descongelamento. A desidratação corresponde ao processo de retirada de água das sementes anteriormente à criopreservação. A água é fundamental em várias funções biológicas nas células de organismos vivos, no entanto para a criopreservação, esta água em altos teores precisa ser removida para evitar injúria causada pela formação de gelo durante o congelamento. Desta forma retira-se algo que é fundamental às células, mas que em contrapartida prejudica a criopreservação (Santos, 2000).

A criopreservação, portanto pode apresentar alguns problemas, sendo um dos pontos críticos do processo o teor de água no material, onde quando teores muito baixos levam a desidratação excessiva e morte das células, e teores de água elevados levam a formação de cristais de gelo no interior das células, que podem causar injúria mecânica por rompimento das membranas e conseqüente morte do embrião. Na fase de descongelamento também haver formação de cristais de gelo (Santos, 2000; Carvalho e Otoni, 2010).

A cristalização ocorre das seguintes formas: cristais de gelo diminutos formados no congelamento têm a oportunidade de crescer, devido ao aumento da temperatura, formando cristais grandes, os quais então causam rompimento e morte das células; outra forma é quando a água que sofreu vitrificação, mas não se congelou, passa pela de-vitrificação, pois, com o aumento da temperatura a água na forma líquida pode se congelar antes que a temperatura ambiente seja atingida (Santos, 2000).

Em teoria, a temperatura ultrabaixa (-196 °C) mantém a qualidade do tecido, mas, na prática os tecidos vegetais ricos em água requerem compostos que evitem danos do cristal de gelo durante a criopreservação (Zeliang e Pattanayak, 2012). Desta forma, métodos para evitar a formação de cristais de gelo são essenciais para o sucesso do processo de criopreservação. Os protocolos para criopreservação envolvem, em sua maioria, uma sequência de tratamentos destinados a prevenir ou a minimizar possíveis danos (Veiga et al., 2006). No processo de criopreservação como forma de reduzir a injúria sofrida pela célula, utilizam-se substâncias químicas durante o congelamento e descongelamento denominados de crioprotetores (Carvalho e Otoni, 2010).

2.6.3. Crioprotetores

A principal função dos crioprotetores durante o congelamento é reduzir o ponto de congelamento intracelular (Santos e Salomão, 2010), mantendo a viabilidade dos materiais biológicos durante o congelamento e descongelamento, não causando toxicidade (Zeliang e Pattanayak, 2012).

Os crioprotetores são compostos químicos de fácil penetração no tecido vegetal, capazes de protegê-los dos efeitos danosos causados pelos cristais de gelo, formados dentro e fora da célula, durante o processo de congelamento (Carvalho e Otoni, 2010). A crioproteção trata-se de um pré-tratamento no qual os crioprotetores agem de formas diferentes, desidratando células bem como protegendo membranas (Engelmann 1991).

Os primeiros crioprotetores descritos foram o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO), no entanto tais crioprotetores podem causar toxidez ou estresse osmótico nas células, causando efeitos fisiológicos deletérios ou modificando a resposta

morfogênica (Sakai, 1985; Carvalho e Otoni, 2010). Um razoável número de compostos químicos com propriedades crioprotetoras tem sido utilizado, tais como o PVS₂, o gel de alginato de sódio, sacarose, álcoois, aminoácidos, DMSO, etileno, metanol, glicerol e propileno glicol, porém são apontados como os mais eficientes e utilizados a sacarose, o glicerol e o dimetilsulfóxido (Veiga et al, 2006; Kim et al., 2009; Santos e Salomão, 2010; Santos, 2011).

Dentre as propriedades apresentadas pelos crioprotetores, os açúcares são capazes de formar pontes de hidrogênio, substituindo a água, mantendo as estruturas hidrofílicas na orientação hidratada, mesmo na ausência de água, penetram nas células de forma lenta e não causam citotoxicidade (Carvalho e Otoni, 2010; Santos, 2011; Zeliang e Pattanayak, 2012).

Os crioprotetores glicerol e DMSO são compostos de baixo peso molecular e penetram as células com facilidade, sendo que o DMSO é indicado para explantes maiores ou estruturas mais complexas, justamente por ter maior poder de penetração das camadas de lipoproteínas de membranas, sendo geralmente mais eficiente, no entanto em condições de temperaturas elevadas o DMSO é tóxico (Kaurin e Stushnoff, 1985; Santos e Salomão, 2010; Zeliang e Pattanayak, 2012).

Observa-se que vários crioprotetores são adotados com sucesso e outros apresentam falhas, como evidenciam Carvalho e Otoni (2010). Isso pode dever-se ao fato de que as sementes recalcitrantes, ortodoxas e intermediárias apresentam comportamento diferenciado quanto ao processo de criopreservação.

Diante da diversidade de respostas entre as espécies de plantas, não é possível a generalização e desenvolvimento de um protocolo de caráter universal, o que exige uma diferenciação no protocolo a ser utilizado com base no comportamento fisiológico em relação ao armazenamento de cada espécie. Para cada espécie, deve-se determinar a escolha de crioprotetores e sua concentração, bem como a duração do pré-tratamento (Engelmann, 1991).

Após a realização do processo de criopreservação, a regeneração do material apontará a eficiência do processo, visto que a única evidência inquestionável da viabilidade do material submetido ao congelamento em nitrogênio líquido é a retomada do crescimento e a regeneração de um novo indivíduo,

devendo-se assim estudar os efeitos da criopreservação sob uma determinada espécie (Santos, 2000 e Civatti et al., 2014).

2.7. Germinação e vigor

Germinação é considerada como o encerramento do período de repouso fisiológico, o que pode ser considerado de maneiras diferentes na Fisiologia Vegetal e a Tecnologia de sementes, porém com o mesmo conceito de que a germinação tem início com a embebição. Para a Fisiologia Vegetal a germinação é a protrusão da raiz primária (originada da radícula do embrião), enquanto para o segundo grupo, o processo inclui o desenvolvimento da estrutura embrionária e a formação de uma plântula, onde a normalidade de suas partes constituintes seja evidente (Marcos Filho, 2015).

Para Marcos Filho (2015) a germinação e o desenvolvimento inicial de plântula são processos antagônicos, já que os genes ativados em uma fase estão reprimidos na outra, de forma que os genes que gerenciam a germinação e o crescimento da plântula não são os mesmos. No mesmo sentido Bewley et al. (2013), afirmam os processos que estão ocorrendo no desenvolvimento inicial da plântula, como a intensa mobilização das principais reservas também não devem fazer parte da conceituação de germinação pois são eventos pós-germinação.

Após a germinação vários processos levam ao crescimento da plântula. No entanto, muitas espécies mesmo apresentando sementes viáveis não conseguem germinar, sendo atribuído a esse fenômeno o nome de dormência de sementes (Bewley, 1997).

De acordo com Carvalho e Nakagawa (2012) este fenômeno corresponde a um processo que distribui a germinação no tempo de forma a só ocorrer em condições ambientes favoráveis, tornando-se, assim, um mecanismo natural de sobrevivência de algumas espécies. A dormência é tida como uma adaptação para a sobrevivência das espécies a longo prazo. No entanto esta dormência pode ser considerada um problema por causar a não germinação ou desuniformidade desta (Marcos Filho, 2015). Para superação deste fenômeno realiza-se a superação de dormência para que as sementes possam germinar, de forma mais rápida, uniforme e em maior percentual (Sena e Gariglio, 2008).

A dormência pode estar relacionada a vários fatores, dentre estes, destacam-se os de origem genética (variação entre espécies e cultivares), pré e a pós-colheita (injúrias mecânicas durante a colheita, problemas fitossanitários, variações climáticas, secagem, armazenamento), morfológicos, fisiológicos (dormência, maturidade, vigor), dentre outros (Pádua et al., 2011).

A germinação de sementes das espécies do gênero *Passiflora* ocorre de forma irregular, podendo se estender de dez dias a três meses (Kuhne, 1968; Pereira e Dias, 2000). Sabe-se que algumas espécies apresentam 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).

Atribui-se a dormência das sementes de espécies de *Passiflora* a fatores físicos (impermeabilidade do tegumento à água e gases), químicos (presença de fatores inibidores), mecânicos (resistência do tegumento ao crescimento do embrião) ou fisiológicos (mecanismos fisiológicos de inibição da germinação, imaturidade ou dormência do próprio embrião) (Bewley, 1997; Duarte Filho et al., 1998; Smith et al., 2003; Delanoy et al., 2006).

Diversos trabalhos demonstram que tratamentos de superação de dormência com ácidos, hormônios, tratamento térmico e com luz, melhoram o desempenho germinativo de espécies de *Passiflora* (Rossetto et al., 2000; Passos et al., 2004; Zonta et al., 2006; Zucareli et al., 2009; Júnior et al., 2010; Welter et al., 2011; Marostega et al., 2013; Santos et al., 2016).

O arilo também é apontado como contribuinte para a desuniformidade na germinação de sementes de *Passiflora*, pois, pode conter reguladores vegetais, tais como esteroides, triterpenoides e açúcares redutores que podem interferir direta ou indiretamente na absorção de água, inibindo a germinação das sementes (Pereira e Dias, 2000; Martins et al., 2010). Estudos realizados com a retirada do arilo demonstraram um aumento da porcentagem da germinação de sementes de *Passiflora edulis* e *P. alata* (Lopes et al., 2007; Osipi et al., 2011).

Como forma de quantificar a germinação de sementes de diversas espécies, utiliza-se os testes de germinação, que tem por principal objetivo 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, demonstrando a aptidão das sementes em produzir uma planta normal sob condições favoráveis de campo, determinando a viabilidade de sementes (Brasil, 2009).

Os testes de vigor visam determinar, com maior precisão, o grau de deterioração das sementes. O vigor é definido como a soma de atributos que conferem a semente o potencial para germinar, emergir e resultar rapidamente em plântulas normais, sob ampla diversidade de condições ambientais (Popinigis, 1985; Krzyzanowski e Neto, 2001). Marcos Filho (2015) afirma que o uso de apenas um teste de vigor pode gerar informações incompletas, assim a tendência predominante é a combinação de testes para se obter informações mais consistentes.

A literatura tem documentado vários estudos envolvendo a análise de imagens, a fim de estabelecer uma relação com o vigor de sementes (Marcos Filho et al., 2009). Entre os métodos para análise de imagens destaca-se o teste de raio-X, indicado pela ISTA – “International Seed Testing Association” (ISTA, 1995). É considerado um método rápido, simples e não destrutivo. Este método tem como objetivo detectar sementes vazias, cheias, ocorrência de sementes mal formadas, presença de danos internos causados por insetos ou danos mecânicos e anormalidades no embrião, características estas que podem influenciar os resultados de germinação. Possibilita ainda a visualização da posição, forma e danificações que ocorrem no eixo embrionário das sementes (Cícero et al., 1998; Carvalho et al., 1999; Battisti et al., 2000; Machado e Cícero, 2002).

O raio-X tem sido empregado em avaliações de sementes desde a década de 1950, quando Simak e Gustafsson (1953) demonstraram a viabilidade deste teste para a avaliação da qualidade de sementes de *Pinus sylvestris* L. Atualmente tem se estendido para espécies nativas, destacando-se dentre as técnicas de avaliação da condição das sementes (Carvalho et al., 2009). Tem ainda grande importância em bancos de sementes para a conservação *ex situ* de germoplasma (Terry et al., 2003), permitindo a seleção de sementes sem danos.

Diversos trabalhos já foram realizados utilizando a técnica de raio-X na avaliação de sementes, dentre estes pode-se citar trabalhos com sementes de pimentão - *Capsicum annuum* (Dell’Aquila, 2007); embaúba - *Cecropia*

pachystachya (Pupim et al., 2008); Ipê-de-jardim - *Tecoma stans* (Socolowski e Cicero, 2008); pinhão-manso - *Jatropha curcas* (Pinto et al., 2009); arnica - *Lychnophora pinaster*, (Melo et al., 2009); espécies florestais de Lauraceae (Carvalho et al., 2009^a); abóbora - *Cucurbita moschata* (Carvalho et al., 2009^b; Silva e Nascimento, 2010); alface - *Lactuca sativa* (Kikuti e Marcos-Filho, 2010); mamona - *Ricinus communis* (Carvalho et al., 2010; Kobori et al., 2012); ipê-roxo - *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) (Amaral et al., 2011); pepino - *Cucumis sativus* L. (Nakada et al., 2011), dentre outros.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, D. C. A. **Bases fisiológicas para a conservação a longo prazo de sementes *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze.** Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2009. 92p. Tese (Doutorado em Produção e Tecnologia de Sementes).
- AGUIAR, A. V. M.; SILVA, R. M.; CARDOSO, E. A.; MARACAJÁ, P. B.; PIRES, H. G. Utilização de espécies de *Passiflora* spp. como portaenxertos no controle de doenças do maracujazeiro. **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, 06: 17-22, 2010.
- ALEXANDRE, R. S.; JÚNIOR, A. W.; NEGREIROS, J. R. S.; PARIZZOTTO, A.; BRUCKNER, C. H. Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. **Pesq. Agropec. Bras.** 12: 1239-1245, 2004.
- AMARAL, J. B.; MARTINS, L.; FORTI, V. A.; CÍCERO, S. M.; MARCOS-FILHO, J. Teste de raios x para avaliação do potencial fisiológico de sementes de ipê-roxo. **Revista Brasileira de Sementes.** 4: 601-607, 2011.
- ANDRADE, S. R. M.; ROSA, S. D.; ARAÚJO, C. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Estudos preliminares sobre a germinação de *Passiflora nitida*.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010. 13p.
- ARAÚJO, D. S.; LUZ, P. B.; NEVES, L. G.; SOBRINHO, S. P. Seed Cryopreservation of *Passiflora* species. **Journal of Seed Science.** 3: 248-253, 2016.
- BARBOSA, L. M.; PARAJARA, F. C.; BARBOSA, K. C.; BARBOSA, T. C. **Manual de Orientação para Implantação de Viveiro de Mudas.** 2. ed. São Paulo: CEA/Instituto de Botânica – SMA, 2014. 100p.
- BATTISTI, A.; CANTINI, R.; FECI, E.; FRIGIMELICA, G.; GUIDO, M.; RAQUES, A. Detection and evaluation of seed damage of cypress, *Cupressus sempervirens* L. Italy. **Seed Science and Technology.** 3: 729-738, 2000.
- 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.
- 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.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. Seeds: physiology of development, germination and dormancy . 3. ed. New York: **Springer.** 2013. 392p.

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

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, 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.; MELETTI, L. M.; OTONI, W. C.; JUNIOR, F. M. Z. Maracujazeiro. In: BRUCKNER, C. H. (ed). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. p.373-410.

CAMILLO, J.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI - PEREIRA, J. E. Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**. 44: 211-215, 2009.

CARVALHO, L.R; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A.C. Utilização do teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de espécies florestais de Lauraceae. **Revista Brasileira de Sementes**. 4: 57-66, 2009b.

CARVALHO, M.L.M.; ALVES, R.A.; OLIVEIRA, L.M. Radiographic analysis in castor bean seeds (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**. 1: 170-175, 2010.

CARVALHO, M.L.M.; VAN AELST, A. C.; VAN ECK, J. W.; HOEKSTRA, F. A. Pre harvest stress cracks in maize (*Zea mays* L.) kels as characterized by visual, X-ray and low temperature scanning electron microscopical analysis: effect on kernel quality. **Seed Science Research**. 3: 227-236, 1999.

CARVALHO, M.L.M.; SILVA, C.D.; OLIVEIRA, L.M.; SILVA, D.G.; CALDEIRA, C.M. Teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de abóbora. **Revista Brasileira de Sementes**. 2: 221-227, 2009a.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.ed. FUNEP: Jaboticabal, 2012. 590p.

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.

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*. **FontQuerria**. 45: 1-92, 1997.

CICERO, S. M.; VAN DER HEIJDEN, G. W. A. M. ; VAN DER BURG, W. J.; BINO, R.J. Evaluation of mechanical damages in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**. 3: 603-612, 1998.

CIVATTI, L. M.; MARCHI, M. N. G.; TORRES-SILVA, G.; ASSIS, J. G. A.; BELLINTANI, M. C.; Cryoconservation of plant germplasm native to Brazil. **African Journal of Biotechnology**. 38: 3847-3859, 2014.

COSTA, C. J. **Armazenamento e Conservação de Sementes de Espécies de Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2009. 30p.

CUNHA, M. **Produtividade e características de frutos de pomares de maracujá implantados com sementes originais e reaproveitadas do híbrido BRS Gigante Amarelo**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013. 46p. Dissertação de Mestrado.

D'EECKENBRUGGE, G. C. Exploração da diversidade genética de *Passifloras*. In: Simpósio Brasileiro Sobre a Cultura do Maracujazeiro, Campos de Goytacazes, RJ. 2003 **Anais...** Campos de Goytacazes: UENF, 2003. p.1-25.

DELANOY, M.; VAN DAMMEA, P.; SCHELDEMAN, X.; BELTRAN, J. Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) L H Bailey, *Passiflora tricuspidata* Mast. And *Passiflora nov sp*. **Seeds. Scientia Horticulturae**. 110: 198-203, 2006.

DELL'AQUILA, A. Pepper seed germination assessed by combined X-radiography and computer-aided imaging analysis. **Biologia Plantarum**. 51: 777-781, 2007.

DUARTE FILHO, J.; VASCONCELLOS, M. A.; CARVALHO, C. M. Germinação de sementes de *Passiflora giberti* sob temperatura controlada. In: Simpósio Brasileiro Sobre a Cultura do Maracujazeiro, Jaboticabal, 1998 **Anais...** Jaboticabal: FUNEP, 1998. P.315-316.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H.; TAO, K. L. Low moisture content limits to relations between seed longevity and moisture. **Annals of Botany**. 65: 493-504, 1990.

EMBRAPA . Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **A Cultura do Maracujá**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. v.13, 76p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Brasil terá o quarto maior banco de germoplasma**. Disponível em: <http://www.cenargen.embrapa.br/cenargenda/noticias/anba2904.pdf>. Acesso em: 10, maio, 2016.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. **Euphytica**. 57: 227-243,1991.

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

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant Biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 47:5-16, 2011.

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.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. **Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados e pesquisa 2005-2008**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 57p.

FERRARI, E. A. P. **Criopreservação de sementes de orquídeas brasileiras**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2016. 68p. Tese (Doutorado em Agronomia).

FERRARI, E. A. P.; COLOMBO, R. C.; FARIA, R. T.; TAKANE, R. J. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. **Revista Ciência Agronômica**. 1: 127-177, 2016.

FERREIRA, F. R. Germoplasma de fruteiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. esp.: 1-6, 2011.

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.

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

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.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; PANTA A.; ROCA, W.M.; ESCOBAR R. H.; ENGELMANN F. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue Organ Cult**. 92: 1-13, 2008.

GÖTTERT, V.; BISPO, R. B.; MARTINS, K. C.; SOUZA, S. A. M. Estabelecimento de uma coleção de germoplasma de *Passiflora* na Universidade do Estado de Mato Grosso - *Campus* Alta Floresta. In: III Seminário de Biodiversidade e Agroecossistemas Amazônicos, Cáceres, MT. 2015 **Anais...** Cáceres: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2015. P.512-517.

GUERRANT, E. O.; KAYRI H.; PATI V.; HERENDEEN, P. S. (ed). "Sampling for Effective Ex Situ Plant Conservation". **International Journal of Plant Sciences**. 1: 11-20, 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal (PAM) 2014.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2014/>. Acesso em: 16, junho, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal (PAM) 2013.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2013/>. Acesso em: 16, junho, 2016.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal (PAM) 2015.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2015/>. Acesso em: 16, junho, 2016.

ISTA. International Seed Testing Association. International Rules for testing seed. **Seed Science and Technology**, 2: 300-520, 1995.

JAGANATHAN, G. K.; LIU, B. Effects of dimethyl sulfoxide concentration, pre-cooling and cooling rate on cryopreservation of hydrated lettuce seeds. **Seed Science. & Technology**. 42: 214-226, 2014.

JÚNIOR, M. X.; JOSÉ, A. R. S.; REBOUÇAS, T. N.; MORAIS, O. M.; DOURADO, F. W. N. Superação de dormência de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. 2: 584-590, 2010.

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.

KAURIN, A.; STUSHNOFF, C. Influence of dimethyl sulfoxide on freezing resistance of lettuce seeds. **Cryobiology**. 22: 569-573, 1985.

KIKUTI, A.L.P.; MARCOS FILHO, J. Evaluation of lettuce seed viability by combined X-ray and germination tests. In: ISTA CONGRESS, 2010, Cologne. **Seed Symposium Abstracts**. Bassersdorf: International Seed Testing Association, 2010. p.54-55.

KIM, H. H.; LEE, Y. G.; SHIN, D. J.; KO, H. C.; GWAG, J. G.; CHO, E. G.; ENGELMANN F. Development of alternative plant vitrification Solutions in droplet vitrification procedures. **CryoLetters**. 30: 320-334, 2009.

KOBORI, N. N.; CÍCERO, S. M.; MEDINA, P. F. Teste de raios-X na avaliação da qualidade de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**. 1: 125-133, 2012.

KRZYZANOWSKI, F. C.; FRANÇA NETO, J. B. Vigor de sementes. **Informativo Abrates**. 3: 81-84, 2001.

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

LOPES, J. C.; BONO, G. M.; ALEXANDRE, R. S.; MAIA, V. M. Germinação e vigor de plantas de maracujazeiro amarelo em diferentes estádios de maturação do fruto, arilo e substrato. **Ciência e Agrotecnologia**. 5: 1340-1346, 2007.

LOPES, S.C. Citogenética do maracujá, *Passiflora* spp. In: SÃO JOSÉ, A. R.; FERREIRA, F. R.; VAZ, R. L. (eds). **A cultura do maracujá no Brasil**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. p. 201-209.

MACHADO, C. F.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, V. N. T.; JESUS, O. N.; ARAÚJO, F. P.; GIRARDI, E. A. A Enxertia do maracujazeiro: técnica auxiliar no manejo fitossanitário de doenças do solo. **Circular técnica – Embrapa mandioca e fruticultura**. 116: 1-15, 2015.

MACHADO, C.F.; CÍCERO, M.S. Metodologia para a condução do teste de germinação e utilização de raios-X para a avaliação da qualidade de sementes de aroeira branca (*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.). **Informativo ABRATES**, 123: 28-34, 2002.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2 ed. Londrina: ABRATES, 2015. 660 p.

MARCOS FILHO, J.; KIKUTI, A. L. P.; LIMA, L. B. Métodos para avaliação do vigor de sementes de soja, incluindo análise computadorizada de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**. 1: 102-112, 2009.

MAROSTEGA, T. N.; FERRAZ, A. C. L.; ARAÚJO, L. M.; LUZ, P. B.; SOBRINHO, S. P.; NEVES, L. G. Superação de dormência em sementes de *Passiflora foetida* L. **Perspectiva**. 139: 57-64, 2013.

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**. 9: 1934-1940, 2010.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. esp.: 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, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; ALVARES, V.;

FILHO, J. A. A. de. Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam.: Nova alternativa de maracujá ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 1: 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. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (ed). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 55-78.

MELO, P.R.B.; OLIVEIRA, J.A.; CARVALHO, M.L.M.; GUIMARAES, R.M.; CARVALHO, B.O. Aplicação do teste de raios X no estudo da morfologia interna e da qualidade fisiológica de aquênios de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**. 2: 146-154, 2009.

MIRANDA, H. L. C.; BOBROWSKI, V. L.; DODE, L. B.; MENEGHELLO, G. E. Criopreservação de calos de arroz. **Scientia Agraria**. 2: 165-168, 2009.

MOLINA, T. F.; TILLMANN, M. A. A.; DODE, L. B.; VIÉGAS, J. Criopreservação 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.

NAKADA, P. G.; OLIVEIRA, J. A.; MELO, L. C.; GOMES, L. A.; PINHO, E. V. R. V. Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**. 1: 022-030, 2011.

NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C.; AMARAL, W. A. N. Armazenamento de sementes de maracujá Amarelo. **Revista Brasileira de Sementes**. 1: 77-80, 1991.

NICK, C.; SILVA, D. J. H. da.; MATTEDI, A. P.; PEDROSA, A. 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 palmitero (*Euterpe edulis* Mart.) sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Árvore**. 22: 01-10, 1998.

OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (ed). **Maracujá**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 1987. p. 218-246.

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.

PÁDUA, J. G.; SCHWINGEL, L. C.; MUNDIM, R. C.; SALOMÃO, A. N.; ROVERIJOSÉ, S. C. B. Germinação de sementes de sementes de *Passiflora*

setacea e dormência induzida pelo armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**. 1: 080-085, 2011.

PAIVA, C. L.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SILVA, R. N.; OLIVEIRA, E. J. Diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com o uso da estratégia Ward – MLM. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 2: 381-390, 2014.

PASSOS, I. R. S.; MATOS, G. V. C.; MELETTI, L. M. M.; SCOTT-SOARES, G.; BERNACCI, L. C.; VIEIRA, M. A. R. Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nitida* Kunth germinadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 2: 380-381, 2004.

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.

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.

PINTO, T.L.F.; MARCOS FILHO, J.; FORTI, V.A.; CARVALHO, C.; GOMES JUNIOR, F.G. Avaliação da viabilidade de sementes de pinhão manso pelo teste de tetrazólio e de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**. 2: 195-201, 2009.

PIRES, M. V.; ALMEIDA, A. A. F.; FIGUEIREDE, A. L.; PINTO F. Germination and seedling growth of ornamental species of *Passiflora* under artificial shade. **Acta Scientiarum. Agronomy**. 1: 67-75, 2012

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

PUPIM, T.L.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; CARVALHO, M.L.M.; CICERO, S.M. Adequação do teste de raios X para avaliação da qualidade de sementes de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec.). **Revista Brasileira de Sementes**. 2: 28-32, 2008.

RADHA, R. K.; DECRUSE, W. S.; KRISHNAN, P. N. Plant Cryopreservation. In: KATKOV, I. **Current Frontiers in Cryopreservation**. In teck: Hard Cover, 2012. p.431-438.

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.

ROSSETTO, C. A. V.; CONEGLIAN, R. C. C.; NAKAGAWA, J.; SHIMIZU, M. K.; MARIN, V. A. Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand)

em função de tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira de Sementes**. 1: 247-252, 2000.

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: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. 12: 70-84, 2000.

SANTOS, C. H. B.; NETO, A. J. C.; JUNGHANS, T. G.; JESUS, O. N.; GIRARDI, E. A. Estádio de maturação de frutos e influência de ácido giberélico na emergência e crescimento de *Passiflora spp*. **Revista Ciência Agronômica**. 3: 481-490, 2016.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: A alternativa para a conservação a longo prazo. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**. 20: 60-65, 2011.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: A alternativa para conservação a longo prazo. **Biociência: Ciência & Desenvolvimento**. 20: 60-65, 2011.

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

SENA, C. M.; GARIGLIO, M. A. **Sementes Florestais: Colheita, Beneficiamento e Armazenamento**. Natal : MMA - Secretaria de Biodiversidade e Florestas, 2008. 28p.

SILVA, D. R.; NARITA, N.; RÓS, A. B.; TAKATA, W. H. S.; HIRATA, A. C. S.; CAVICHIOLI, J. C. Produtividade de maracujazeiros sobre diferentes porta-enxertos e com raiz dupla. **Colloquium Agrariae**. n. esp: 18-23, 2012.

SILVA, P. P.; NASCIMENTO, W. M. Definição da metodologia para realização do teste de raios-X em sementes de abóbora. **Horticultura Brasileira**. 28: 4273-4277, 2010.

SIMAK, M.; GUSTAFSSON, A. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. **Hereditas**. 39: 458-468, 1953.

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.

SOCOLOWSKI, F.; CICERO, S.M. Caracterização morfológica de embriões por imagens de raios X e relação com a massa e a qualidade fisiológica de sementes de *Tecoma stans* L. Juss. ex Kunth (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Sementes**. 2: 200-208, 2008.

TARRÉ, E.; PIRES, B. B. M.; GUIMARÃES, A. P. M.; CARNEIRO, L. A.; FORZZA, R. C.; MANSUR, E. Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. and *Dyckia* Schult. & Schult. f. species (Bromeliaceae). **Acta Botânica Brasileira**. 4: 777-783, 2007.

TERRY, J.; PROBERT, R.J.; LININGTON, S.H. Processing and Maintenance of the Millenium Seed Bank Collections. In: SMITH, R. D.; LININGTON, S. H.; DICKIE, J. B.; LININGTON, S. H.; PRITCHARD, H. W.; PROBERT, R. J. Seed Conservation turning science into practice. Kew: **Royal Botanic Gardens**, 2003. p.307-325.

TOMBOLATO, A. F. C.; LUCON, T. N.; MOURA, M. F.; BARBOSA, W.; JÚNIOR, M. B. M.; SCHIAVINATO, Y.; VEIGA, R. F. A. Crioconservação de espécies de Amaryllidaceae. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 1: 77-82, 2009.

VANDERPLANK, J. AND D. ZAPPI. *Passiflora cristalina*, a striking new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso, Brazil. **The Board os Trustees of the royal botanic Gardens, Kew Bulletin**. 66: 149-153, 2011.

VANDERPLANK, R. J. R. There are... lies, damned lies and statistics. A statistical look at the genus *Passiflora*. **Passiflora online Journal**. 17: 14 – 15, 2007.

VEIGA, R. F. A. de.; MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; TOMBOLATO, A. F. C. A crioconservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto agrônômico (IAC). **O agrônômico**. 58: 19-21, 2006.

WELTER, M. K.; SMIDERLE, O. J.; UCHÔA, S. C. P.; CHANG, M. T.; MENDES E. P. Germinação de sementes de maracujá amarelo azedo em função de tratamentos térmicos. **Revista Agro@ambiente On-line**. 3: 227-232, 2011.

WETZEL, M. M.V.S.; REIS, R. B. RAMOS, K. R. Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas. **Circular técnica - Embrapa recursos genéticos e biotecnologia**. 26: 1-5, 2003.

ZELIANG,P. K.; PATTANAYAK, A. Fundamental Cryobiology and Basic Physical, Thermodynamical and Chemical Aspects of Plant Tissue Cryopreservation. In: ABDURAKHMONOV, I. (ed). **Plant Breeding**. In teck: Hard Cover, 2012. p.41-56.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN V. G.; YARIWAKE J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 3: 459-471, 2010.

ZONTA, J. B.; SILVA, I. C.; DIAS, M. A.; CÔRREA, N. B.; LOPES, J. C. Germinação de sementes do maracujazeiro (*Passiflora alata* dryand) submetidas a tratamentos físicos no tegumento e a pré-embebição em ácido giberélico (ga^3). In: IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, São José dos Campos, SP. 2006 **Anais...** São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2006. P.590-592.

ZUCARELI, V.; HENRIQUE, L. A. V.; ONO, E. O. Influence of light and temperature on the germination of *Passiflora incarnata* L. seeds. **Journal of Seed Science**. 2: 162-167, 2015.

4. CAPÍTULO 1 – Criopreservação de sementes de *Passiflora* spp.

RESUMO

FARIA, Ariane de; M. Sc.; UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO; Dezembro de 2016. **Criopreservação de sementes de *Passiflora* spp.** Orientador: Petterson Baptista da Luz.

O maracujazeiro é amplamente utilizado para fins alimentícios, medicinais e ornamentais. As espécies nativas possuem diversas características de interesse ao melhoramento genético. Diante do interesse e importância das passifloras nativas, trabalhos visando à conservação de recursos genéticos destas espécies tornam-se estrategicamente importantes. Dentre as diversas formas de se conservar, a criopreservação de sementes é uma das mais efetivas. No entanto, esta estratégia traz consigo alguns problemas como injúria mecânica, que pode ser minimizada com o uso de crioprotetores. Objetivou-se neste trabalho avaliar a eficiência de diferentes dosagens de crioprotetores, na criopreservação de sementes de genótipos de *Passiflora* spp., e inferir sobre a necessidade de crioproteção. O trabalho foi realizado com sementes de *Passiflora eichleriana*, *Passiflora cristalina* e *Passiflora nitida*. Foram adotados 14 tratamentos (sementes criopreservadas com quatro diferentes dosagens de três crioprotetores, sementes criopreservadas sem crioprotetor e um controle): glicerol 1,73, 2,28, 2,60 e 2,71 M; sacarose 0,37, 0,46, 0,54 e 0,61 M; dimetilsulfóxido (DMSO) 0,37, 0,72, 1,04 e 1,35 M; sementes criopreservadas sem crioprotetor e sementes não crioprotetidas e nem criopreservadas (controle). Em seguida realizou-se a criopreservação (vitrificação) em nitrogênio líquido (-196 °C), onde permaneceram por 7 dias. O descongelamento foi realizado em banho-maria a 37 °C por 5 minutos. Os testes de germinação e vigor foram realizados utilizando delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes para cada teste. As variáveis analisadas foram: porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz, massa seca de parte aérea e massa seca de raiz. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o teste Dunnett, através do

programa ASSISTAT, comparando-se todos os tratamentos com sementes criopreservadas sem crioproteção. As sementes de *P. eichleriana*, *P. cristalina* e *P. nitida* podem ser criopreservadas sem utilização de crioprotetor. O crioprotetor glicerol compromete a viabilidade e vigor das sementes de todas as espécies de maracujá testadas e DMSO nas maiores dosagens diminui a viabilidade e vigor de sementes de *P. cristalina* e *P. nitida*.

Palavras-chave: nitrogênio líquido, glicerol, sacarose, dimetilsulfóxido, vigor.

Seeds cryopreservation of *Passiflora spp.*

ABSTRACT

FARIA, Ariane de; M. Sc. UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, Dezembro de 2016. **Seeds cryopreservation of *Passiflora spp.*** Orientador: Petterson Baptista da Luz.

Passion fruit is widely used for food, medicinal and ornamental purposes. Native species have several characteristics of interest for genetic improvement. Considering the interest and importance of the native passifloras, works aiming at the conservation of genetic resources of these species become strategically important. Among the several ways of conserving, the cryopreservation of seeds is one of the most effective. However, this strategy carries with it some problems like mechanical injury, which can be minimized with the use of cryoprotectants. The objective of this work was to evaluate the efficiency of different cryoprotectant dosages in the cryopreservation of seeds of *Passiflora spp.* Genotypes and to infer the need for cryoprotection. The work was carried out with *Passiflora eichleriana*, *Passiflora cristalina* and *Passiflora nitida* seeds. Fourteen treatments (cryopreserved seeds with four different dosages of three cryoprotectants, cryopreserved seeds without cryoprotectant and one control) were used: glycerol 1.73, 2.28, 2.60 and 2.71 M; Sucrose 0.37, 0.46, 0.54 and 0.61 M; Dimethylsulfoxide (DMSO) 0.37, 0.72, 1.04 and 1.35 M; Cryopreserved seeds without cryoprotectant and seeds not cryoprotected nor cryopreserved (control). Then, cryopreservation (vitrification) was performed in liquid nitrogen (-196 ° C), where they remained for 7 days. Thawing was performed in a water bath at 37 ° C for 5 minutes. Germination and vigor tests were performed using a completely randomized design, with four replicates of 50 seeds for each test. The variables analyzed were: germination percentage, germination speed index, emergency percentage, emergency speed index, shoot length, root length, shoot dry mass and root dry mass. The data were submitted to the analysis of variance using the Dunnett test, through the ASSISTAT program, comparing all the treatments with cryopreserved seeds without cryoprotection. The seeds of *P. eichleriana*, *P. cristalina* and *P. nitida* can be cryopreserved without the use of cryoprotectants. The cryoprotectant glycerol compromises the viability and vigor of the seeds of all the

passion fruit species tested and DMSO in the higher dosages decreases the viability and vigor of seeds of *P.cristalina* and *P nitida*.

Key words: liquid nitrogen, glycerol, sucrose, dimethylsulfoxide, vigor.

INTRODUÇÃO

O maracujazeiro é uma planta trepadeira lenhosa, perene, de crescimento rápido, vigoroso, contínuo e com raízes superficiais (Embrapa, 1994). De acordo com Bruckner et al. (2002); D'eeckenbrugge, (2003); Pires et al. (2012) e (Paiva et al., 2014) as passifloras são utilizadas para fins alimentícios, medicinais e ornamentais. Atualmente possuem grande relevância devido a sua importância social e econômica para o país, sendo expressiva fonte de renda para os produtores e um mercado promissor para a indústria de sucos.

Espécies nativas de maracujá do Centro-Norte brasileiro são alternativas para a ampliação da base genética de resistência e com potencial para trabalhos de melhoramento genético (Meletti et al., 2005). As passifloras nativas têm grande importância e são utilizadas como porta-enxerto visando resistência a fungos do solo, morte precoce e controle de doenças do maracujazeiro (Faleiro et al., 2008; Aguiar et al., 2010; Andrade et al., 2010; Silva et al., 2012).

A crescente expansão agrícola utilizando áreas do Centro-Norte (principal centro de distribuição geográfica do maracujá) implica na eliminação de espécies nativas e, desaparecimento de muitos genótipos de interesse, para o melhoramento do maracujá-azedo (Wetzel et al., 2003; e Faleiro et al., 2005). Para evitar ou diminuir o problema, é fundamental a criação, ampliação e manutenção de maior número de Bancos de Germoplasma. Abreu (2009) aponta que as alterações nos remanescentes florestais, ocasionam erosão genética de diversas espécies vegetais, comprometendo a regeneração natural e a sobrevivência de futuras gerações, sendo de grande importância a colheita e o armazenamento adequado de sementes, para uso futuro em recuperação dos ecossistemas degradados.

A semente é a forma pela qual a planta sobrevive o máximo de tempo com o mínimo de atividade fisiológica sendo a forma mais simples de conservar recursos genético *ex situ* (Wetzel et al., 2003; Carvalho e Otoni, 2010). É também a forma mais comum, já que esta é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores (Roberts, 1973).

Carvalho e Otoni (2010) apontam a criopreservação como uma importante técnica de armazenamento de sementes. A criopreservação é definida como a

conservação de material biológico em nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou em sua fase de vapor a $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kartha, 1985; Santos e Salomão, 2010).

Tal método é considerado por muitos autores ideal e de grande eficiência superando as demais formas de conservação, pois, proporciona longevidade às sementes, onde a deterioração biológica é praticamente paralisada, prolongando a viabilidade das sementes a longo prazo (Santos, 2000; Salomão, 2002; Wetzel et al., 2003; Veiga et al., 2006; Santos, 2011). Esta condição de armazenamento é a mais adotada pela maioria dos bancos de sementes, demonstrando grande eficiência, até mesmo para espécies cujas sementes são difíceis de conservar, tendo como vantagens o baixo custo e espaço físico reduzido (Santos, 2000; Wetzel et al., 2003; Camillo et al., 2009; Carvalho e Otoni, 2010; Pereira et al., 2010; Santos, 2011).

Em contrapartida a criopreservação pode apresentar alguns problemas, pois com teores muito baixos de água ocorre desidratação excessiva e morte das células, e com teores de água elevados, ocorre a formação de cristais de gelo no interior das células. O congelamento e formação de cristais de gelo podem levar a injúria mecânica da célula (Santos, 2000; Carvalho e Otoni, 2010).

Para reduzir a injúria sofrida pela célula, utilizam-se substâncias químicas denominados de crioprotetores (Carvalho e Otoni, 2010). A principal função dos crioprotetores durante o congelamento é reduzir o ponto de congelamento e o congelamento intracelular (Santos e Salomão, 2010).

De acordo com Sakai (1995) e Carvalho e Otoni (2010), os primeiros crioprotetores descritos foram o glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO), no entanto alguns crioprotetores podem ser tóxicos ou podem causar estresse osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogênica. Crioprotetores são compostos químicos com capacidade de proteger as sementes dos efeitos nocivos causados pelos cristais de gelo, que se formam dentro e fora da célula, durante o processo de congelamento e descongelamento. Vários crioprotetores tem sido utilizados, tais como o PVS₂, o gel de alginato de sódio, sacarose, álcoois, aminoácidos, dimetilsulfóxido (DMSO), etileno, metanol, glicerol e propileno glicol, porém, as pesquisas apontam como sendo mais eficientes e mais utilizados atualmente a sacarose o glicerol e o dimetilsulfóxido (Veiga et al., 2006; Santos e Salomão, 2010; Santos, 2011).

Sendo assim o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência de diferentes dosagens de crioprotetores, na criopreservação de sementes de genótipos de *Passiflora* spp., e inferir sobre a necessidade de crioproteção.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O experimento foi realizado no laboratório de Sementes e Plantas Ornamentais do *campus* Universitário de Cáceres – MT, da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT e em telado implantado em local aberto. A região de Cáceres apresenta clima Tropical (Aw), com inverno seco, verão chuvoso e temperatura média anual de 26 °C, podendo chegar a 41 °C. A pluviosidade anual é de aproximadamente 1.335 mm, concentrada principalmente nos meses de dezembro a março (Neves et al., 2011).

Objeto do estudo

As sementes de *Passiflora* spp. utilizadas nos experimentos foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) implantado no campo experimental situado na área adjacente ao *campus* Universitário de Cáceres. As espécies estudadas foram: *P. eichleriana*, *P. cristalina* e *P. nitida* como apresentado na Figura 1.



Figura 1. Flor, fruto e semente de *Passiflora eichleriana* (A); *Passiflora cristalina* (B); *Passiflora nitida* (C)

Preparação do experimento

Para obtenção das sementes utilizou-se frutos maduros, os quais depois de colhidos passaram por processo de extração e limpeza das sementes. Neste processo os frutos foram cortados para retirada da polpa juntamente com as sementes, sendo em seguida triturada sobre peneira com cal hidratada, seguindo de posterior lavagem em água corrente até a retirada completa da mucilagem das sementes. Após o processo de limpeza, a água aderida externamente às sementes foi eliminada por meio de secagem em bancada por 24 horas em temperatura ambiente, em seguida foram acondicionadas em vidros transparentes e armazenadas em câmara fria com temperatura de aproximadamente 7 °C até o momento da utilização.

Determinado o início do experimento as sementes passaram por processo de desinfestação, realizado primeiramente com imersão em solução de álcool 70% (v/v) durante 1 minuto, e em seguida hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 5 minutos e por fim lavadas com água destilada, sendo submetidas novamente à secagem (24 horas) e encaminhadas para determinação de teor de água.

A determinação do teor de água das sementes foi realizada através do método da estufa a 105 ± 3 °C, por 24 horas em estufa de convecção de circulação forçada conforme as recomendações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Para tal, utilizou-se duas repetições de 50 sementes e para pesagem balança de precisão de 0,1 mg. Posteriormente à determinação do teor de água as sementes foram submetidas à crioproteção.

Crioproteção das sementes

Anteriormente à criopreservação, para crioproteção das sementes foram utilizados três crioprotetores, para cada crioprotetor testou-se e avaliou a eficiência de quatro dosagens diferentes. Os crioprotetores e dosagens adotadas foram: glicerol a 1,73; 2,28; 2,60 e 2,71 M; sacarose a 0,37; 0,46; 0,54 e 0,61 M e Dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,37; 0,72; 1,04 e 1,35 M. Para tanto, as sementes ficaram imersas durante três horas nas soluções conforme Vendrame et al. (2007), sendo posteriormente retiradas e submetidas a secagem em bancada por 24 horas.

Além das sementes crioprotetidas foram também criopreservadas sementes sem crioproteção, e para fins de avaliação também utilizou-se sementes não crioprotetidas e nem criopreservadas denominadas de controle. Totalizando junto às dosagens, 14 tratamentos.

Criopreservação e descongelamento das sementes

Após crioproteção e secagem das sementes, realizou-se a criopreservação (vitificação) em nitrogênio líquido (-196 °C) pelo período de 168 horas (7 dias). As sementes foram embaladas em “pets” de alumínio, devidamente identificados quanto aos tratamentos, acondicionados nos “canisters” e realizada a imersão no botijão com nitrogênio líquido, enquanto que sementes do tratamento controle foram mantidas em câmara fria.

Após o tratamento criogênico, que durou cerca de 7 dias, as sementes de cada tratamento foram descongeladas em banho-maria, na temperatura de 37 °C durante cinco minutos (Araújo et al., 2016).

Superação de dormência

A superação de dormência foi realizada posteriormente ao descongelamento das sementes, utilizando os seguintes protocolos:

- a) *P. eichleriana*: as sementes foram embebidas em solução de KNO_3 (1%) por 24 horas em BOD com alternância de temperatura (20 °C /30 °C), baseando-se em resultados obtidos por Marostega (2014);
- b) *P. cristalina*: não foi realizada quebra de dormência para a espécie;
- c) *P. nitida*: as sementes foram embebidas em solução de GA_3 (ácido giberélico) na concentração de 1000 ppm (1000 mg L⁻¹) por 6 horas, a 25 °C, com ausência de luz, baseando-se nos resultados obtidos por Marostega (2014).

Descrição da obtenção das variáveis analisadas

Realizados os processos de crioproteção, subsequente processo de criopreservação em nitrogênio líquido a (- 196 °C), descongelamento e tratamento para superação de dormência as sementes provenientes de cada tratamento foram avaliadas para obtenção das variáveis a serem analisadas.

Os testes foram conduzidos em câmara tipo BOD em laboratório e em telado. Para os testes de germinação realizados em laboratório foram analisadas as seguintes variáveis: porcentagem de germinação (PG) e índice de velocidade de germinação (IVG). Para os testes em telado analisou-se as variáveis: porcentagem de emergência (PE), índice de velocidade de emergência (IVE), comprimento de parte aérea de plântula (cm), comprimento de raiz de plântula (cm), massa seca de parte aérea de plântula (g) e massa seca de comprimento de raiz de plântula (g).

Porcentagem e índice de velocidade de germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. As sementes foram dispostas em caixas de acrílico transparente tipo “Gerbox”, utilizando como substrato duas folhas de papel mata-borrão umedecido com água destilada, em uma proporção de duas vezes e meia a massa do papel seco, as caixas foram colocadas dentro de sacos de polietileno transparente e mantidas em câmara de germinação (BOD), com alternância de temperatura de 20 - 30 °C e

fotoperíodo de 12 horas por um período de 30 dias, conduzido segundo as Regras de Análise de Sementes (Brasil, 2009), seguindo metodologia para *P. edulis*.

Ao final dos 30 dias a porcentagem de sementes germinadas foi obtida considerando aquelas que apresentaram rompimento do tegumento e emissão de raiz primária com pelo menos 2 mm de comprimento (Haddas, 1976).

Para o cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG) os dados foram obtidos concomitantemente com o teste de germinação. As avaliações foram realizadas diariamente e no mesmo horário durante 30 dias, contabilizando-se as sementes germinadas. Para o cálculo do IVG utilizou-se a fórmula de Maguire (1962).

Porcentagem e índice de velocidade de emergência de plântulas

Os testes de emergência foram conduzidos em telado com temperatura ambiente (19,2 a 31,6 °C), utilizou-se potes plásticos contendo substrato para plantas Vivatto Plus[®] (composto por casca de pinus bio-estabilizada, vermiculita, moinha de carvão vegetal, água e espuma fenólica), onde a semeadura foi realizada utilizando delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes para cada tratamento. A umidade do substrato foi mantida com irrigação realizada por aspersores suspensos de 4 a 5 vezes ao dia. Para se obter a porcentagem de emergência de plântulas, foram realizadas avaliações diárias durante 30 dias após a semeadura, sendo contabilizadas as plântulas emergidas.

O índice de velocidade de emergência foi obtido simultaneamente ao teste de emergência. Onde ao fim dos 30 dias utilizou-se para obtenção do IVE, a fórmula de Maguire (1962), sendo consideradas para o cálculo as plântulas normais emergidas.

Comprimento de parte aérea e raiz de plântulas (cm)

As plântulas normais provenientes do teste de emergência, foram avaliadas no trigésimo (30) dia após a semeadura, utilizou-se para as avaliações no mínimo dez plântulas escolhidas aleatoriamente por cada repetição, pois algumas repetições não apresentaram número de plântulas superior a dez. A avaliação foi realizada com auxílio de uma régua milimétrica, medindo-se a parte aérea (PA) e o comprimento

da maior raiz (CR), de cada uma das plântulas. Para cálculo da média por repetição das variáveis PA e CR, dividiu-se a soma das medidas tomadas das subamostras pelo número de plântulas normais mensuradas por repetição. O resultado foi expresso em centímetro (cm) de parte aérea e comprimento da maior raiz/plântula.

Massa seca de parte aérea e comprimento de raiz das plântulas (g)

As plântulas normais avaliadas quanto ao comprimento de parte aérea e comprimento de raiz foram devidamente cortadas e acondicionadas em sacos de papel "kraft" para em seguida serem levadas para estufa de circulação de ar a 65 °C por aproximadamente 72 horas. Após secas foram pesadas, obtendo-se assim a massa seca de parte aérea e de comprimento de raiz de plântulas e seus dados expressos em gramas/ repetição.

Análise dos dados

A análise de dados foi realizada para cada uma das espécies isoladamente. Os dados referentes ao teste de germinação e testes de vigor (teste de emergência, comprimento de parte aérea e raiz, e massa seca de parte aérea e raiz) foram submetidos à análise de variância, sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT versão 7,7 beta (Silva e Azevedo, 2016), comparando-se todos os tratamentos com sementes criopreservadas sem crioproteção. Os dados obtidos em porcentagem foram transformados com as opções: $\sqrt{Y + 0,5}$ e $\arcsin \sqrt{(X\%/100)}$ para melhor ajuste e avaliação das variáveis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teores de água

As médias para a umidade inicial das sementes de *P. eichleriana*, *P. cristalina* e *P. nitida* foram 7,18; 6,00 e 7,42%. Esses teores encontram-se dentro do padrão adequado para espécies do gênero *Passiflora*, pois Araújo (2014), afirmou

que as sementes de *P. foetida*, *P. micropetala*, *P. suberosa*, *P. mucronata* e *P. edulis* mantêm o potencial fisiológico nos teores de 6 a 12% de umidade.

Passiflora eichleriana

A partir dos testes realizados com sementes de *P. eichleriana*, não houve diferença entre os tratamentos apenas para porcentagem de germinação.

Para o índice de velocidade de germinação, a maioria dos tratamentos foram iguais ao tratamento com sementes criopreservadas sem crioprotetor, apenas os tratamentos com crioprotetor glicerol e uma dosagem do crioprotetor DMSO foram diferentes, essa diferença deve-se as sementes destes tratamentos terem germinado mais devagar, mesmo a porcentagem de germinação tendo se equiparado com os demais tratamentos. Ou seja, o glicerol e DMSO prejudicaram a velocidade de germinação, mas não a germinação em si (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de Germinação (PG), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Porcentagem de Emergência (PE), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Comprimento de Parte Aérea (CPA), Comprimento de Raiz (CR), Massa Seca de Parte Aérea (MSPA) e Massa Seca de Comprimento de Raiz (MSCR) de sementes de *Passiflora eichleriana* submetidas a diferentes doses de crioprotetores.

Tratamento	Variáveis analisadas							
	PG ^{ns} (%)	IVG*	PE* (%)	IVE*	CPA* (cm)	CR* (cm)	MSPA* (g)	MSCR* (g)
S/ crioproteção	56,5	4,045 a	91,0 a	4,765 a	6,90 a	12,27 a	0,223 a	0,062 a
Controle	51,0	3,264 a	83,5 a	4,343 a	6,11 a	11,08 a	0,224 a	0,080 a
T1	54,5	1,974 b	2,0 b	0,073 b	0,62 b	1,98 b	0,018 b	0,008 b
T2	56,5	2,400 b	1,0 b	0,037 b	0,22 b	0,52 b	0,007 b	0,004 b
T3	47,5	1,708 b	4,0 b	0,170 b	1,03 b	2,95 b	0,044 b	0,021 b
T4	51,0	1,759 b	2,5 b	0,067 b	0,36 b	1,25 b	0,008 b	0,004 b
T5	67,5	5,288 a	85,0 a	4,354 a	6,19 a	12,58 a	0,203 a	0,093 a
T6	64,0	4,701 a	90,5 a	4,909 a	6,36 a	12,37 a	0,223 a	0,083 a
T7	64,5	4,457 a	86,5 a	4,604 a	6,95 a	12,80 a	0,243 a	0,103 a
T8	72,0	5,142 a	76,0 a	3,637 a	5,92 a	12,56 a	0,216 a	0,091 a
T9	66,5	3,936 a	82,5 a	4,252 a	6,73 a	12,12 a	0,240 a	0,101 a
T10	56,0	3,931 a	84,5 a	4,238 a	6,48 a	11,33 a	0,195 a	0,089 a
T11	37,0	2,286 b	85,5 a	4,322 a	6,12 a	11,28 a	0,176 a	0,087 a
T12	52,0	2,865 a	82,5 a	3,966 a	6,02 a	11,20 a	0,187 a	0,094 a
CV %	11,72	10,95	7,82	6,83	6,29	8,31	2,74	1,11

*Médias dentro da mesma coluna seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo. Legenda: Glicerol: T1-1,73; T2 - 2,28; T3 - 2,60 e T4 - 2,71 M; Sacarose: T5 - 0,37; T6 - 0,46; T7 - 0,54 e T8 - 0,61 M; DMSO: T9 - 0,37; T10 - 0,72; T11 - 1,04 e T12 - 1,35 M. Dados transformados em $\sqrt{Y + 0,5}$ e $\arcsin \sqrt{(X\%/100)}$ para dados em porcentagem

Para a variável porcentagem de emergência observa-se uma queda acentuada para tratamentos realizados com crioprotetor glicerol. As sementes de *P. eichleriana*, perderam vigor com a utilização do crioprotetor glicerol, o que demonstra toxidez desse tipo de crioprotetor. Os demais tratamentos foram iguais ao tratamento com sementes criopreservadas sem crioproteção (Tabela 1).

Mesmo padrão de resultados foi apresentado pelas variáveis, índice de velocidade de germinação, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz, massa seca de parte aérea e massa seca de comprimento de raiz, visto que estas variáveis derivam da porcentagem de emergência (Tabela 1).

Em estudo com sementes de cebola observou-se que sementes criopreservadas com o uso do crioprotetor glicerol a 50% (5,42 M) apresentaram um decréscimo acentuado na germinação, onde atribui-se ao glicerol a capacidade de aumentar o teor de água das sementes, e provavelmente, este alto teor de água contribuiu para a redução da qualidade fisiológica das sementes (Molina et al., 2006). No presente trabalho em concentrações menores de 1,73 a 2,71 M foram suficientes para causar esta toxicidade e prejudicar a velocidade de germinação e vigor das sementes.

O DMSO é indicado para explantes maiores ou estruturas mais complexas, como sementes, pois, tem maior poder de penetração, sendo geralmente mais eficiente (Santos & Salomão, 2010), para a espécie *P. eichleriana* os resultados corresponderam a afirmação.

Quanto a sacarose e sua capacidade de proteger as sementes satisfatoriamente pode-se explicar na capacidade que este composto tem de estabilizar membranas celulares durante o congelamento. Na natureza ou em condições experimentais, os açúcares mostram alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento e em situações de intensa desidratação. Em plantas de clima temperado, durante a aclimação ao frio, ocorre um acúmulo de carboidratos solúveis em seus tecidos e no período em que tais plantas são mais tolerantes ao congelamento, corresponde ao ponto de máximo acúmulo de açúcares (Imanishi et al., 1998; Sakai e Yoshida, 1968).

Em estruturas que são tolerantes a intensa desidratação, como esporos de fungos, leveduras, musgos, samambaias, sementes e pólen da maioria das

angiospermas, ocorre o acúmulo de grande quantidade de açúcares como sacarose, trealose e oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) (Hoekstra et al., 1994; Oliver, 1996).

Para *P. eichleriana* as sementes crioprotegidas com os crioprotetores sacarose e DMSO foram iguais estatisticamente às sementes criopreservadas sem crioprotetor, indicando ser o uso do crioprotetor desnecessário, já que sementes sem crioprotetor conseguem manter mesmo padrão de germinação, emergência e vigor das sementes crioprotegidas e sementes que não foram crioprotegidas e nem criopreservadas (controle), ou seja, o desempenho de sementes criopreservadas sem crioproteção não é prejudicado quando comparado com a germinação de sementes não criopreservadas.

O mesmo foi verificado por Araújo et al. (2016), onde a partir de ensaios com criopreservação de espécies de *Passiflora*, concluíram que a criopreservação pode ser utilizada para conservação a longo prazo de sementes de *P. mucronata*, *P. suberosa* e *P. edulis*, sem a utilização de crioprotetores, pois, os tratamentos sem crioproteção mantiveram-se semelhantes ou superiores aos controles.

Camillo et al. (2009), afirmaram que o uso de crioprotetor é desnecessário para criopreservação de embriões zigóticos desprovidos de tegumento, pois, o estudo anatômico comparativo dos embriões revelou que o tratamento com imersão em nitrogênio líquido não interferiu na diferenciação e no desenvolvimento de tecidos embrionários durante a germinação. Ferrari et al. (2016) verificaram também para a espécie *Encholirium spectabile* (Bromeliaceae) que suas sementes podem ser criopreservadas sem o uso de solução crioprotetora.

Pode-se observar na Tabela 1, que mesmo estatisticamente iguais, as sementes criopreservadas sem crioproteção apresentou médias discretamente maiores que as sementes não crioprotegidas nem criopreservadas (controle), este comportamento pode ser associados a uma superação de dormência em decorrência da exposição ao nitrogênio líquido.

Esse mesmo comportamento é demonstrado em outro trabalho de criopreservação de sementes de algodão realizado por Rocha et al. (2009), onde os autores concluíram que a conservação criogênica aumentou o percentual de germinação e vigor das sementes, isso em razão da temperatura promover quebra

de dormência pela ação do frio. Tarré et al. (2007) obteve germinações superiores ou similares ao controle para sementes de espécies dos gêneros *Encholirium* e *Dyckia* (Bromeliaceae) após o congelamento em nitrogênio líquido.

Passiflora cristalina

Para sementes de *P. cristalina*, verificou-se diferenças entre os tratamentos exceto para massa seca de parte aérea. Para a porcentagem de germinação e o índice de velocidade de germinação, apenas os tratamentos com sacarose como crioprotetor e sementes não crioprotegidas nem criopreservadas (controle), foram iguais ao tratamento com sementes criopreservadas sem crioproteção. Para a espécie *P. cristalina*, pôde-se verificar que DMSO e o glicerol prejudicam a germinação das sementes, sendo que quanto maiores as dosagens do crioprotetor DMSO, menor é a porcentagem de germinação (Tabela 2).

O crioprotetor glicerol foi ineficaz na crioproteção ou causou toxidez às sementes, impossibilitando a germinação. De acordo com Molina et al. (2006) em ensaios realizados na criopreservação de sementes de cebola o glicerol a 50% (5,42 M) foi prejudicial à qualidade fisiológica e alterou a composição química da sementes, já aquelas submetidas ao tratamento criogênico sem crioprotetor mantiveram a germinação e vigor das sementes. Miranda et al. (2009) também verificaram que o uso do crioprotetor glicerol na criopreservação de calos de sementes de arroz maduras não apresentaram resultados satisfatórios, evidenciando uma toxidez do crioprotetor glicerol.

Quanto ao crioprotetor DMSO ele apresentou resultados inferiores de germinação e IVG devido sua provável toxidez. Segundo Hubálek (2003), devido a sua alta solubilidade em água, o DMSO pode provocar alterações à membrana celular, as quais danificam e inviabilizam as células. Com isso, mesmo em concentrações muito baixas, pode ser tóxico a alguns sistemas biológicos.

O tratamento sementes criopreservadas sem crioproteção apresentou a maior porcentagem de germinação (66,5%), se igualando estatisticamente a testemunha padrão (60,5%), indicando a viabilidade de criopreservação sem crioproteção para esta espécie. A viabilidade de criopreservação sem crioprotetor também foi verificada para sementes de espécies de Amaryllidaceae, onde

Tombolato et al. (2009), concluíram que os agentes protetores alginato de sódio e PVS₂, não foram necessários para a criopreservação, pois, as sementes sem crioproteção tiveram melhores percentuais de germinação do que as crioprotetidas, indicando que as sementes podem ser criopreservadas sem crioprotetor.

Tabela 2. Porcentagem de Germinação (PG), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Porcentagem de Emergência (PE), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Comprimento de Parte Aérea (CPA), Comprimento de Raiz (CR), Massa Seca de Parte Aérea (MSPA) e Massa Seca de Comprimento de Raiz (MSCR) de sementes de *Passiflora cristalina* submetidas a diferentes doses de crioprotetores.

Tratamento	Variáveis analisadas							
	PG* (%)	IVG*	PE* (%)	IVE*	CPA* (cm)	CR* (cm)	MSPA ^{ns} (g)	MSCR* (g)
S/ crioproteção	66,5 a	1,734 a	44,5 a	1,071 a	1,85 a	5,71 a	0,073	0,029 a
Controle	60,5 a	1,497 a	41,0 a	1,005 a	1,67 a	4,47 a	0,066	0,027 a
T1	0,0 b	0,000 b	0,0 b	0,000 b	0,00 b	0,00 b	0,000	0,000 b
T2	8,5 b	0,217 b	0,0 b	0,000 b	0,00 b	0,00 b	0,000	0,000 b
T3	0,0 b	0,000 b	0,0 b	0,000 b	0,00 b	0,00 b	0,000	0,000 b
T4	0,0 b	0,000 b	0,0 b	0,000 b	0,00 b	0,00 b	0,000	0,000 b
T5	57,5 a	1,408 a	32,5 a	0,810 a	1,61 a	4,78 a	0,081	0,034 a
T6	58,0 a	1,341 a	15,5 a	0,332 a	0,69 a	1,97 a	0,034	0,009 a
T7	57,5 a	1,468 a	41,5 a	1,015 a	1,79 a	5,57 a	0,074	0,029 a
T8	58,0 a	1,428 a	25,5 a	0,619 a	1,45 a	3,86 a	0,215	0,022 a
T9	45,0 b	0,921 b	38,5 a	0,940 a	1,86 a	5,24 a	0,078	0,034 a
T10	25,0 b	0,472 b	44,0 a	1,115 a	2,01 a	6,16 a	0,087	0,028 a
T11	10,0 b	0,205 b	46,0 a	1,118 a	2,04 a	6,88 a	0,092	0,040 a
T12	7,5 b	0,140 b	2,0 b	0,048 b	0,58 b	0,82 b	0,050	0,004 b
CV %	13,14	5,89	30,40	14,64	15,76	21,61	6,67	0,96

*Médias dentro da mesma coluna seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo. Legenda: Glicerol: T1-1,73; T2 - 2,28; T3 - 2,60 e T4 - 2,71 M; Sacarose: T5 - 0,37; T6 - 0,46; T7 - 0,54 e T8 - 0,61 M; DMSO: T9 - 0,37; T10 - 0,72; T11 - 1,04 e T12 - 1,35 M. Dados transformados em $\sqrt{Y + 0,5}$ e $\arcsin \sqrt{(X\%/100)}$ para dados em porcentagem

Na porcentagem de emergência tratamentos com o crioprotetor glicerol, não apresentaram emergência, reforçando o caráter de toxidez do glicerol para sementes desta espécie. Os demais tratamentos foram semelhantes ao tratamento com sementes criopreservadas sem crioproteção, exceto para a maior dosagem do crioprotetor DMSO, que apresentou resultados iguais ao glicerol. Os valores de índice de velocidade de emergência, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e massa seca de comprimento de raiz, seguiram o mesmo padrão apresentado na porcentagem de emergência (Tabela 2).

Para dados de germinação e vigor, os tratamentos com sacarose apresentaram resultados satisfatórios quanto a capacidade de proteção, uma vez que foram iguais ao tratamento com sementes criopreservadas sem crioproteção.

Não se conhece ainda o modo de ação dos açúcares na aquisição da tolerância à desidratação e ao congelamento, mas ele possivelmente envolve múltiplos componentes, onde várias hipóteses foram formuladas. Uma delas é a de que os açúcares agem como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular através de um gradiente osmótico (Dumet et al., 1993).

Podem agir também substituindo a água removida das biomoléculas, mantendo as estruturas hidrofílicas mesmo depois da remoção da água (Santos, 2000). Para substituição da água os açúcares solúveis dentro da célula, formam ligações de hidrogênio e, assim, substituem a água, mantendo as estruturas hidrofílicas em sua orientação quando hidratada (Koster, 1991).

As médias das sementes criopreservadas sem crioproteção foram ligeiramente maiores para todas as variáveis. Tal comportamento leva a inferir sobre uma possível superação de dormência causada pelo congelamento, pois como suposto por Goldfarb et al. (2008), em trabalho com criopreservação de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) a exposição a temperaturas ultrabaixas leva a uma modificação fisiológica na estrutura interna da semente, resultando em superação de dormência e resultando em aumento na taxa de germinação das sementes. Portanto em virtude do bom desempenho das sementes criopreservadas sem crioprotetor, pode-se inferir que não há necessidade de crioproteção para sementes de *P. cristalina*.

Passiflora nitida

Conforme é apresentado na Tabela 3, para as sementes da espécie *P. nitida*, verifica-se diferença entre os tratamentos para todas as variáveis. Apenas os tratamentos com os crioprotetores sacarose e sementes não criopreservadas e nem crioprotetidas (controle) foram iguais às sementes criopreservadas sem crioproteção. Os tratamentos com crioprotetores glicerol e DMSO, apresentaram as piores médias, podendo inferir que estes crioprotetores, afetam a germinação e vigor das sementes desta espécie negativamente, demonstrando serem tóxicos. O

crioprotetor DMSO em suas menor dosagem (0,37 M), que igualou-se as melhores média nas variáveis, porcentagem de emergência, índice de velocidade de emergência, comprimento de parte aérea, comprimento de raiz, massa seca de comprimento de parte aérea e massa seca de comprimento de raiz.

Quanto ao padrão apresentado por sementes tratadas com o crioprotetor glicerol, Ferrari (2016) apresentou a partir de seus experimentos, comportamento semelhante para sementes de *Cattleya labiata*, onde testando diferentes soluções crioprotetoras na criopreservação de sementes, observou que aquelas tratadas com solução de glicerol a 2,00 M não apresentaram bom desempenho. Araújo et al. (2016) verificaram o mesmo comportamento para germinação de sementes de *Passiflora micropetala* e *Passiflora edulis*, onde as sementes quando tratadas com o crioprotetor DMSO apresentaram quedas na porcentagem de germinação e IVG.

Tabela 3. Porcentagem de Germinação (PG), Índice de Velocidade de Germinação (IVG), Porcentagem de Emergência (PE), Índice de Velocidade de Emergência (IVE), Comprimento de Parte Aérea (CPA), Comprimento de Raiz (CR), Massa Seca de Parte Aérea (MSPA) e Massa Seca de Comprimento de Raiz (MSCR) de sementes de *Passiflora nitida* submetidas a diferentes doses de crioprotetores.

Tratamento	Variáveis analisadas							
	PG* (%)	IVG*	PE* (%)	IVE*	CPA* (cm)	CR* (cm)	MSPA* (g)	MSCR* (g)
S/ crioproteção	22,5 a	0,767 a	23,5 a	0,547 a	2,62 a	7,74 a	0,30 a	0,103 a
Controle	29,0 a	0,930 a	21,5 a	0,511 a	2,82 a	7,02 a	0,31 a	0,095 a
T1	0,5 b	0,010 b	0,0 b	0,000 b	0,00 b	0,00 b	0,000 b	0,000 b
T2	0,5 b	0,008 b	0,0 b	0,000 b	0,00 b	0,00 b	0,000 b	0,000 b
T3	1,0 b	0,017 b	0,0 b	0,000 b	0,00 b	0,00 b	0,000 b	0,000 b
T4	0,0 b	0,000 b	0,0 b	0,000 b	0,00 b	0,00 b	0,000 b	0,000 b
T5	23,0 a	0,777 a	16,0 a	0,385 a	1,90 a	5,47 a	0,253 a	0,074 a
T6	25,5 a	0,697 a	13,5 a	0,317 a	1,90 a	4,85 a	0,250 a	0,072 a
T7	22,0 a	0,682 a	11,0 a	0,259 a	1,61 b	4,42 a	0,211 a	0,061 a
T8	26,0 a	0,729 a	14,0 a	0,252 a	2,34 a	6,71 a	0,287 a	0,087 a
T9	17,5 b	0,507 b	13,0 a	0,304 a	1,94 a	4,66 a	0,231 a	0,074 a
T10	9,0 b	0,200 b	1,5 b	0,033 b	0,26 b	0,43 b	0,024 b	0,007 b
T11	1,0 b	0,019 b	0,0 b	0,000 b	0,00 b	0,00 b	0,000 b	0,000 b
T12	1,0 b	0,233 b	0,0 b	0,000 b	0,00 b	0,00 b	0,000 b	0,000 b
CV %	19,74	7,72	36,51	8,78	16,77	25,62	5,97	2,30

*Médias dentro da mesma coluna seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo. Legenda: Glicerol: T1-1,73; T2 - 2,28; T3 - 2,60 e T4 - 2,71 M; Sacarose: T5 - 0,37; T6 - 0,46; T7 - 0,54 e T8 - 0,61 M; DMSO: T9 - 0,37; T10 - 0,72; T11 - 1,04 e T12 - 1,35 M. Dados transformados em $\sqrt{Y + 0,5}$ e $\arcsen \sqrt{(X\%/100)}$ para dados em porcentagem

Quanto ao tratamento com DMSO na dose de 0,37, que se equiparou as melhores médias, tem-se que DMSO em menor dosagem é mais eficiente que em

concentrações maiores, o que pode ser explicado por um perfil de toxidez causado por este crioprotetor. Jaganathan et al. (2014), sugerem após trabalho realizado com crioproteção de sementes de alface, que o DMSO apresenta efeito tóxico quanto mais elevada a concentração, assim como já observado por Kaurin e Stushnoff (1985), em trabalho com mesma espécie ao analisar que DMSO a 20% (2,55 M) gerou efeito tóxico, visto a incapacidade de sobrevivência das sementes após o congelamento, enquanto que DMSO a 5% (0,63 M) foi apontado como ideal para a espécie.

O bom desempenho de tratamentos realizados com sacarose pode ser explicado, em função da sua capacidade de manter o estado líquido cristalino das bicamadas de membranas e estabilizar proteínas em condições de congelamento (Kendall et al, 1993). Açúcares como a sacarose e a trealose mostram alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante os processos de desidratação e congelamento, com grande potencial para serem utilizados como substâncias crioprotetoras porque eles são excelentes agentes vitrificadores e, além disto, não apresentam toxicidade para as células vegetais mesmo quando se acumulam em grande quantidade no citoplasma (Carvalho & Otoni, 2010).

De forma geral *P. nitida* expressou baixas porcentagens de germinação e emergência. Andrade et al. (2010) reforçam que esse comportamento se dá em função de problemas com dormência. Meletti et al. (2007) a partir de trabalhos realizados com esta espécie, apontam que as sementes se comportam como recalcitrantes, as quais não toleram umidade inferior a 20% para armazenamento a temperaturas ultrabaixas, visto terem observado danos às sementes. As sementes utilizadas neste trabalho apresentaram umidade de 7,42%, o que pode ter causado danos pelo baixo teor de água nas sementes, levando a uma baixa germinação.

Existem contradições quanto ao período de viabilidade das sementes de *P. nitida*, o que pode ser explicado em função da utilização de acessos provenientes de diferentes biomas (Andrade et al., 2010), sendo de fundamental importância que mais testes sejam realizados visando a superação da dormência em sementes de *P. nitida* a fim de garantir bons resultados após o processo de criopreservação.

No presente trabalho as sementes estavam armazenadas a menos de 12 meses sendo realizada para superação de dormência o tratamento com ácido

giberélico. Visto que em trabalhos realizados por Passos et al. (2004), obteve-se, aos 50 dias, 86% de germinação nas sementes de *P. nitida* utilizando 1.000 mg L⁻¹ de GA₃. Marostega (2014), com imersão das sementes em solução de GA₃ a 1000 mg L⁻¹, por 24h a 25 °C, também apresentou resultados eficientes para promover a germinação de sementes de *P. nitida*.

Quanto a criopreservação melhorar os percentuais de germinação e emergência, diferente de outros trabalhos com espécies do mesmo gênero Meletti et al. (2007), observaram que a criopreservação não melhorou a qualidade fisiológica das sementes de *P. nitida*, pois estas não apresentaram germinação, assim como no presente trabalho.

CONCLUSÕES

- Sementes de *P. eichleriana*, *P. cristalina* e *P. nitida* podem ser criopreservadas sem utilização de crioprotetor;
- O crioprotetor glicerol compromete a viabilidade e o vigor de sementes de *P. eichleriana*, *P. cristalina* e *P. nitida*;
- O crioprotetor DMSO em altas dosagens diminui a viabilidade e o vigor de sementes de *P. cristalina* e *P. nitida*;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, D. C. A. **Bases fisiológicas para a conservação a longo prazo de sementes *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2009. 92p. Tese (Doutorado em Produção e Tecnologia de Sementes).

AGUIAR, A. V. M.; SILVA, R. M.; CARDOSO, E. A.; MARACAJÁ, P. B.; PIRES, H. G. Utilização de espécies de *Passiflora* spp. como portaenxertos no controle de doenças do maracujazeiro. **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, 06: 17-22, 2010.

ANDRADE, S. R. M.; ROSA, S. D.; ARAÚJO, C. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Estudos preliminares sobre a germinação de *Passiflora nitida***. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010. 13p.

ARAÚJO, D. S.; LUZ, P. B.; NEVES, L. G.; SOBRINHO, S. P. Seed Cryopreservation of Passiflora species. **Journal of Seed Science**. 3: 248-253, 2016.

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.; MELETTI, L. M.; OTONI, W. C.; JUNIOR, F. M. Z. Maracujazeiro. In: BRUCKNER, C. H. (ed). **Melhoramento de fruteiras tropicais**. Viçosa: UFV, 2002. p.373-410.

CAMILLO, J.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI - PEREIRA, J. E. Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 44: 211-215, 2009.

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.

D'EECKENBRUGGE, G. C. Exploração da diversidade genética de Passifloras. In: Simpósio Brasileiro Sobre a Cultura do Maracujazeiro, Campos de Goytacazes, RJ. 2003 **Anais...** Campos de Goytacazes: UENF, 2003. p.1-25.

DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**. 14: 243-250, 1993.

EMBRAPA . Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **A Cultura do Maracujá**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. v.13, 76p.

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.; PEIXOTO, J. R. **Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados e pesquisa 2005-2008**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 57p.

FERRARI, E. A. P. **Criopreservação de sementes de orquídeas brasileiras**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2016. 68p. Tese (Doutorado em Agronomia).

FERRARI, E. A. P.; COLOMBO, R. C.; FARIA, R. T.; TAKANE, R. J. Cryopreservation of seeds of *Encholirium spectabile* Martius ex Schultes f. by the vitrification method. **Revista Ciência Agronômica**. 1: 127-177, 2016

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.

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.

HOEKSTRA, F. A.; HAIGH, A. M.; TETTEROO, F. A. A.; ROEKEL, T. VAN. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. **Seed Science Research**. 4: 143-147, 1994.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**. v.46, p.205-229, 2003.

IMANISHI H. T.; SUZUKI, T.; MASUDA. K.; HARADA, T. Accumulation of raffinose and stachyose in shoot apices of *Lonicera caerulea* L. during cold acclimation. **Scientia Horticulturae**. 72: 255-263, 1998.

JAGANATHAN, G. K.; LIU, B. Effects of dimethyl sulfoxide concentration, pre-cooling and cooling rate on cryopreservation of hydrated lettuce seeds. **Seed Science. & Technology**. 42: 214-226, 2014.

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.

KAURIN, A.; STUSHNOFF, C. Influence of dimethyl sulfoxide on freezing resistance of lettuce seeds. **Cryobiology**. 22: 569–573, 1985.

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.

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

MAGUIRE, J. D. Seep of germination-aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**. 2: 176-177, 1962.

MAROSTEGA, T. N. **Variabilidade genética de acessos de maracujazeiro e avaliação de qualidade fisiológica de sementes**. Cáceres: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2014. 70p. (Dissertação - Mestrado em Genética e melhoramento de plantas).

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, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.;

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (ed). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 55-78.

MIRANDA , H. L. C.; BOBROWSKI, V. L.; DODE, L. B.; MENEGHELLO, G. E. Criopreservação de calos de arroz. **Scientia Agraria**. 2: 165-168, 2009.

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.

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: subsídios às atividades agropecuárias e turísticas municipais. **Boletim Goiano Geográfico**. 31: 55 – 68, 2011.

Oliver, M. J. (1996) Desiccation tolerance in vegetative plant cells. **Physiology Plant**. 97: 779-787, 1996.

PAIVA, C. L.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SILVA, R. N.; OLIVEIRA, E. J. Diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com o uso da estratégia Ward – MLM. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 2: 381-390, 2014.

PASSOS, I. R. S.; MATOS, G. V. C.; MELETTI, L, M. M.; SCOTT-SOARES, G.; BERNACCI, L. C.; VIEIRA, M. A. R. Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *Passiflora nitida* Kunth germinadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 2: 380-381, 2004.

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.

PIRES, M. V.; ALMEIDA, A. A. F.; FIGUEIREDE, A. L.; PINTO F. Germination and seedling growth of ornamental species of *Passiflora* under artificial shade. **Acta Scientiarum. Agronomy**. 1: 67-75, 2012

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.

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.; YOSHIDA. S. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. **Cryobiology**. 5: 160-174, 1968.

SALOMÃO, A. N. Respostas de sementes de espécies tropicais a exposição ao nitrogênio líquido. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. 2: 133-138, 2002.

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

SANTOS, C. H. B.; NETO, A. J. C.; JUNGHANS, T. G.; JESUS, O. N.; GIRARDI, E. A. Estádio de maturação de frutos e influência de ácido giberélico na emergência e crescimento de *Passiflora spp.* **Revista Ciência Agronômica**. 3: 481-490, 2016.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: A alternativa para a conservação a longo prazo. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 20: 60-65, 2011.

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

SILVA, D. R.; NARITA, N.; RÓS, A. B.; TAKATA, W. H. S.; HIRATA, A. C. S.; CAVICHIOLI, J. C. Produtividade de maracujazeiros sobre diferentes porta-enxertos e com raiz dupla. **Colloquium Agrariae**. n. esp: 18-23, 2012.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**. 11: 3733-3740, 2016.

TARRÉ, E.; PIRES, B. B. M.; GUIMARÃES, A. P. M.; CARNEIRO, L. A.; FORZZA, R. C.; MANSUR, E. Germinability after desiccation, storage and cryopreservation of seeds from endemic *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult. f. and *Dyckia* Schult. & Schult. f. species (Bromeliaceae). **Acta Botanica Brasilica**. 4: 777-783, 2007.

TOMBOLATO, A. F. C.; LUCON, T. N.; MOURA, M. F.; BARBOSA, W.; JÚNIOR, M. B. M.; SCHIAVINATO, Y.; VEIGA. R. F. A. Crioconservação de espécies de Amaryllidaceae. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**. 1: 77-82, 2009.

VEIGA, R. F. A. de.; MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; TOMBOLATO, A. F. C. A crioconservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto agrônomo (IAC). **O agrônomo**. 58: 19-21, 2006.

VENDRAME, W.A.; CARVALHO, V.S.; DIAS, J.M.M. In vitro germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. **Scientia Horticulturae**. v.114, p.188-193, 2007.

WETZEL, M. M.V.S.; REIS, R. B. RAMOS, K. R. Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas. **Circular técnica - Embrapa recursos genéticos e biotecnologia**. 26: 1-5, 2003.

CAPÍTULO 2 – Teste de raio-X na avaliação da qualidade de sementes de *Passiflora* spp. criopreservadas

RESUMO

FARIA, Ariane de; M. Sc; UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO; Dezembro de 2016. **Teste de raio-X na avaliação da qualidade de sementes de *Passiflora* spp. criopreservadas.** Orientador: Petterson Baptista da Luz.

As espécies de maracujá nativas possuem diversas características de interesse ao melhoramento genético, além da utilização para fins alimentícios, medicinais e ornamentais. Desta forma trabalhos visando a conservação destas espécies tornam-se estrategicamente importantes. A criopreservação é uma das formas mais efetiva de conservação, no entanto, este tipo de armazenamento pode trazer problemas como injúria mecânica, sendo o congelamento e descongelamento considerados os pontos críticos para que estas injúrias ocorram. Para minimizar este problema utilizam-se os chamados crioprotetores, os quais podem ser tóxicos principalmente se estas forem expostas a uma concentração muito alta desses agentes. Neste trabalho objetivou-se avaliar através de imagens de raio-X, a qualidade de sementes de *Passiflora* spp. criopreservadas e relacionar as imagens com os possíveis danos causados nas sementes em função da crioproteção e criopreservação. Foram avaliadas sementes das seguintes espécies: *Passiflora eichleriana*, *Passiflora nitida* e *Passiflora mucronata*. A primeira etapa consistiu na realização da crioproteção das sementes. Foram adotados 14 tratamentos (sementes criopreservadas com quatro diferentes dosagens de três crioprotetores, sementes criopreservadas sem crioprotetor e um controle): glicerol 1,73, 2,28, 2,60 e 2,71 M; sacarose 0,37, 0,46, 0,54 e 0,61 M; dimetilsulfóxido (DMSO) 0,37, 0,72, 1,04 e 1,35 M; sementes criopreservadas sem crioprotetor e sementes não crioprotetidas e nem criopreservadas (controle). Após a crioproteção realizou-se a criopreservação (vitrificação) em nitrogênio líquido (-196 °C) onde as sementes permaneceram por 7 dias. As sementes foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 5 minutos. Para a segunda etapa, referente a captura de imagens, foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, as quais após o descongelamento, foram fixadas em folhas de transparência com fita dupla-face e

submetidas a exposição em raio-X, por meio do equipamento Faxitron MX-20 DC 12, com ajuste automático do tempo de exposição e intensidade de radiação. As sementes foram classificadas em semente cheia, semente vazia, semente malformada e semente danificada. Em seguida os lotes de cada tratamento foram reconstituídos e submetidos ao teste de germinação. Os dados de porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação foram submetidos à análise de variância utilizando o teste Dunnett, através do programa estatístico ASSISTAT versão 7,7 beta, comparando-se todos os tratamentos com sementes não crioprotegidas e nem criopreservadas (controle). Na análise de imagens do teste de raio-X, não foram observadas rachaduras/trincas nas sementes de *P. eichleriana*, *P. nitida* e *P. mucronata*, assim sendo, sementes destas espécies não são danificadas pelos processos de crioproteção e criopreservação, quando comparadas com sementes não crioprotegidas e nem criopreservadas.

Palavras-chave: maracujá, criopreservação, imagem de semente, dano em semente, viabilidade.

X-ray test in the evaluation of the quality of seeds cryopreserved of *Passiflora spp.*

ABSTRACT

FARIA, Ariane de; M. Sc. UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, Dezembro de 2016. **X-ray test in the evaluation of the quality of seeds cryopreserved of *Passiflora spp.*** Orientate: Peterson Baptist da Luz.

The native species of passion fruit have several characteristics of interest for genetic improvement, besides the use for food, medicinal and ornamental purposes. In this way works aiming at the conservation of these species become strategically important. Cryopreservation is one of the most effective forms of preservation, however, this type of storage can bring problems like mechanical injury, being the freezing and thawing considered the critical points for these injuries to occur. To minimize this problem the so-called cryoprotectants are used, which can be toxic especially if they are exposed to a very high concentration of these agents. The objective of this study was to evaluate the quality of seeds of *Passiflora spp.* cryopreserved seeds were collected from the following species: *Passiflora eichleriana*, *Passiflora nitida* and *Passiflora mucronata*. The first stage consisted of the seed cryoprotection. Fourteen treatments (cryopreserved seeds with four different dosages of three cryoprotectants, cryopreserved seeds without cryoprotectant and one control) were used: glycerol 1.73, 2.28, 2.60 and 2.71 M; Sucrose 0.37, 0.46, 0.54 and 0.61 M; Dimethylsulfoxide (DMSO) 0.37, 0.72, 1.04 and 1.35 M; Cryopreserved seeds without cryoprotectant and seeds not cryoprotected nor cryopreserved (control). After cryoprotection, cryopreservation (vitrification) was performed in liquid nitrogen (-196 ° C) where the seeds remained for 7 days. Seeds were thawed in a water bath at 37 ° C for 5 minutes. For the second stage, regarding image capture, four replicates of 25 seeds were used for each treatment, which after thawing were fixed on transparency sheets With double-sided tape and exposed to X-ray, using the Faxitron MX-20 DC 12 equipment, with automatic adjustment of exposure time and radiation intensity. The seeds were classified as full seed, empty seed, malformed seed and damaged seed. Then the lots of each treatment were reconstituted and submitted to germination rate. The germination percentage and

germination rate index data were submitted to the analysis of variance using the Dunnet test, using the statistical program ASSISTAT version 7.7 beta, comparing all the treatments with non-cryoprotect seeds and no cryopreserved seeds (control). In the analysis of X-ray test images, no cracks were observed in the seeds of *P. eichleriana*, *P. nitida* and *P. mucronata*, therefore, seeds of these species are not damaged by the cryoprotection and cryopreservation processes, when compared with non cryoprotected or cryopreserved seeds.

Key words: passion fruit, cryopreservation, seed image, seed damage, viability.

INTRODUÇÃO

O maracujazeiro possui grande variabilidade genética a ser conhecida, caracterizada, protegida, conservada e convenientemente utilizada em programas de melhoramento genético (Faleiro et al., 2005), sendo que estudos de caracterização, domesticação, documentação, divulgação e marketing são estratégicos e de grande importância para esta conservação (Ferreira, 2005). Várias espécies do gênero possuem características de resistência a fungos do solo, morte precoce e outras doenças que afetam a cultura (Faleiro et al., 2008; Andrade et al., 2010; Aguiar et al., 2010; Silva et al., 2012).

Como estratégia de conservação a colheita e o armazenamento adequado das sementes, mostram-se muito importantes, pois, os recursos genéticos podem ser preservados, garantindo a qualidade das sementes colhidas, especialmente no aspecto fisiológico (Abreu, 2009). A semente é a forma que proporciona maior tempo de sobrevivência às plantas, mantendo-se com atividade fisiológica mínima (Wetzel et al., 2003). Costa (2009) e Carvalho e Otoni (2010) destacam que existem várias formas de armazenamento das sementes, como por exemplo, a criopreservação. A técnica de criopreservação é tida por muitos como o método ideal para a preservação de sementes (Santos, 2000; Wetzel et al., 2003; Veiga et al., 2006; Camillo et al., 2009; Carvalho e Otoni, 2010; Santos, 2011).

No entanto o processo de criopreservação traz consigo problemas de ordem fisiológica, onde as sementes podem sofrer injúrias mecânicas, durante o congelamento e descongelamento, comprometendo a viabilidade (Santos, 2000; Carvalho e Otoni, 2010). Para minimizar as injúrias sofridas pelas células das sementes, faz-se necessário a utilização de técnicas de proteção antes da criopreservação, utilizando-se os chamados crioprotetores (Veiga et al., 2006).

Crioprotetores devem manter a viabilidade dos materiais biológicos (Zeliang e Pattanayak, 2012), protegendo membranas (Engelmann, 1991) dos efeitos danosos causados pelos cristais de gelo, formados dentro e fora da célula (Carvalho e Otoni, 2010). No entanto os crioprotetores podem causar toxidez ou estresse osmótico nas células refletindo em efeitos fisiológicos deletérios ou modificando a resposta morfogênica (Sakai, 1985; Carvalho e Otoni, 2010).

Sendo assim, além dos testes de germinação e vigor faz-se necessária a utilização de técnicas que permitam com mais precisão inferir sobre a qualidade das sementes criopreservadas. A literatura tem documentado vários estudos envolvendo a análise de imagens, a fim de estabelecer uma relação das imagens com o vigor de sementes (Marcos Filho et al., 2009).

Entre os métodos para análise de imagens destaca-se o teste de raio-X, indicado pela ISTA – “International Seed Testing Association” (ISTA, 1995). É considerado um método rápido, simples e não destrutivo. O teste de raio-X tem como objetivo detectar sementes vazias, cheias, ocorrência de sementes mal formadas, presença de danos internos causados por insetos ou danos mecânicos e anormalidades no embrião, características estas que podem influenciar os resultados de germinação. Possibilita ainda a visualização da posição, forma e danificações que ocorrem no eixo embrionário das sementes (Cícero et al., 1998; Carvalho et al., 1999; Battisti et al., 2000; Machado e Cícero, 2002). O teste permite ainda verificar a evolução do desenvolvimento das sementes, avaliando o grau de normalidade no processo de diferenciação dos tecidos embrionários e de suas relações com os tecidos de reserva (Craviotto et al., 2002; Nery, 2005).

Este teste tem sido empregado em avaliações de sementes desde a década de 1950, quando Simak e Gustafsson (1953) demonstraram sua viabilidade para a avaliação da qualidade de sementes de *Pinus sylvestris* L. Para as espécies nativas, a técnica se aplica na avaliação da qualidade de sementes (Carvalho et al., 2009^b), com grande importância em bancos de sementes para a conservação *ex situ* de germoplasma (Terry et al., 2003), permitindo a seleção de sementes sem danos.

O princípio da técnica consiste na absorção de raio-X em diferentes quantidades pelos diferentes tecidos das sementes, o que depende da espessura, da densidade e da composição desses tecidos, além do comprimento de onda da radiação (Simak, 1991; Bino et al., 1993). Para captura das imagens as sementes são colocadas entre uma fonte de baixa energia de raio-X e um filme fotossensível, ao atravessarem a semente, o raio-X atinge o filme, ficando a impressão em forma de imagem. As áreas mais claras representam partes mais densas da semente, enquanto que as mais escuras da radiografia correspondem àquelas partes em que o raio-X penetram mais facilmente, sendo menos densas (Simak, 1991).

Desta forma o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar através de imagens de raio-X, a qualidade de sementes de *Passiflora* spp. criopreservadas e relacionar as imagens com os possíveis danos causados nas sementes em função da crioproteção e criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O experimento foi realizado no laboratório de Sementes e Plantas Ornamentais do Campus Universitário de Cáceres/ MT, da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT e no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras/ MG.

Objeto do estudo

As sementes de *Passiflora* spp. utilizadas nos experimentos foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) implantado no campo experimental em área adjacente ao *campus* Universitário de Cáceres. A região onde as sementes foram coletadas apresenta clima Tropical (Aw), com inverno seco, verão chuvoso e temperatura média anual de 26 °C, podendo chegar a 41 °C. A pluviosidade anual é de aproximadamente 1.335 mm, concentrada principalmente nos meses de dezembro a março (Neves et al., 2011). As espécies estudadas foram: *P. eichleriana*, *P. nitida* e *P. mucronata*, representadas na Figura 1.



Figura 1. Flor, fruto e semente de *Passiflora eichleriana* (A); *Passiflora cristalina* (B); *Passiflora nitida* (C)

Preparação do experimento

As sementes foram obtidas de frutos maduros, os quais depois de colhidos passaram por processo de extração e limpeza das sementes. Para completa remoção da mucilagem, polpa e sementes foram trituradas sobre peneira com cal hidratada, seguida de lavagem em água corrente até a retirada completa da mucilagem das sementes. Após o processo de limpeza, para secagem as sementes ficaram sobre bancada por 24 horas em temperatura ambiente e em seguida foram acondicionadas em vidros transparentes e armazenadas em câmara fria com temperatura de aproximadamente 7 °C até o momento da sua utilização.

Para início dos experimentos as sementes passaram por processo de desinfestação, realizado primeiramente com imersão em solução de álcool 70% (v/v) durante 1 minuto, e em seguida em hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 5 minutos e por fim lavadas com água destilada, secas por 24 horas e determinado o teor de água.

A determinação do teor de água das sementes foi realizada através do método da estufa a $105 \pm 3^\circ \text{C}$, conforme as recomendações das Regras Para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Utilizando-se duas repetições de 50 sementes.

Crioproteção das sementes

Para crioproteção das sementes foram utilizados três crioprotetores, para cada crioprotetor testou-se e avaliou a eficiência de quatro dosagens diferentes. Os crioprotetores e dosagens adotadas foram: glicerol a 1,73; 2,28; 2,60 e 2,71 M; sacarose a 0,37; 0,46; 0,54 e 0,61 M e Dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,37; 0,72; 1,04 e 1,35 M. Para tanto, as sementes ficaram imersas durante três horas nas soluções conforme Vendrame et al. (2007), sendo posteriormente retiradas e submetidas à secagem em bancada por 24 horas.

Além das sementes crioprotegidas foram também criopreservadas sementes sem crioproteção, e para fins de avaliação também utilizou-se sementes não crioprotegidas e nem criopreservadas denominadas de controle. Totalizando junto às dosagens, 14 tratamentos.

Criopreservação e descongelamento das sementes

Após a crioproteção das sementes procedeu-se com a criopreservação (vitricificação) em nitrogênio líquido (-196 °C) pelo período de 168 horas (7 dias). Para tal as sementes foram embaladas em “pets” de alumínio, acondicionadas nos “canisters” e realizada a imersão em botijão com nitrogênio líquido. As sementes do tratamento controle foram mantidas em câmara fria.

Após o período de criopreservação as sementes de cada tratamento foram descongeladas em banho-maria, na temperatura de 37° C durante cinco minutos (Araújo et al., 2016).

Teste de raio-X

As sementes descongeladas foram fixadas em folhas de transparência sobre fita dupla-face. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento. Para obtenção das imagens radiográficas, as sementes dispostas nas folhas de transparências foram submetidas à exposição a raio-X, por meio do equipamento Faxitron MX-20 DC 12, com ajuste automático do tempo de exposição e intensidade de radiação.

Após obtenção das imagens as sementes foram classificadas em: semente cheia (SC), semente vazia (SV), semente malformada (SMF) e semente danificada (SD).

Superação de dormência

As sementes provenientes do teste de raio-X, foram utilizadas no teste de germinação, de forma que para esta análise os lotes referentes aos tratamentos foram reconstituídos, realizando-se em seguida a superação de dormência, como segue:

- a) *P. eichleriana* e *P. mucronata*: embebição em solução de KNO_3 (1%) por 24 horas em BOD a 25 °C, com ausência de luz;
- b) *P. nitida*: embebição em solução de GA_3 (ácido giberélico) na concentração de 1000 ppm (1000 mg L^{-1}) por 24 horas em BOD a 25° C, com ausência de luz;

Porcentagem e índice de velocidade de germinação

As sementes proveniente do teste de raio-x, foram dispostas em caixas de acrílico transparente “Gerbox”, utilizando como substrato duas folhas de papel mata-borrão umedecido com água destilada, em uma proporção de duas vezes e meia a massa do papel seco, após a sementeira as caixas foram acondicionadas em sacos de polietileno transparente e mantidas em câmara de germinação (BOD), com alternância de temperatura de 20/ 30 °C e fotoperíodo de 12 horas por 30 dias.

Procedeu-se com a avaliação do teste de germinação (TG, %), de acordo com as Regras de Análise de Sementes (Brasil, 2009). Durante os 30 dias de experimento anotou-se a quantidade de sementes que emitiram radícula, considerando semente germinada aquela que apresente rompimento de tegumento e emissão de radícula com pelo menos 2 mm de comprimento (Haddas, 1976). A partir do número total de sementes germinadas para cada repetição dos tratamentos, obteve-se a porcentagem de germinação (%), através da fórmula:

Para o índice de velocidade de germinação (IVG) as observações e tomada de dados são realizadas concomitantemente com o TG, as avaliações foram realizadas todos os dias e no mesmo horário durante 30 dias, contabilizando-se as sementes germinadas e por fim aplicado o cálculo do IVG conforme Maguire (1962).

Análise dos dados

Os dados de porcentagem de germinação (PG) e índice de velocidade de germinação (IVG) de todas as espécies foram submetidos à análise de variância utilizando o teste Dunnet, através do programa estatístico ASSISTAT versão 7,7 beta (Silva e Azevedo, 2016), comparando-se todos os tratamentos com o controle (sementes não crioprotegidas e nem criopreservadas). Os dados de índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (PG) foram transformados com as opções; $\sqrt{Y + 0,5}$ e $\text{arc sen } \sqrt{(X\%/100)}$ para dados em porcentagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teores de água

O teor de água inicial das sementes foram de 7,18, 7,42 e 11,50% para as espécies *P. eichleriana*, *P. nitida* e *P. mucronata* respectivamente. De acordo com Araújo (2014) as sementes de *P. foetida*, *P. micropetala*, *P. suberosa*, *P. mucronata* e *P. edulis* mantêm o potencial fisiológico com 6 a 12% de água.

As sementes utilizadas nos experimentos estavam em condições apropriadas para a técnica, por apresentarem um baixo grau de umidade, pois de acordo com Simak (1991), a umidade das sementes influencia na densidade ótica, onde sementes com menor umidade favorece a maior diferenciação das estruturas internas das sementes, pois possuem maior densidade ótica.

Classificação das sementes e teste de germinação

A partir do teste de raio-X, realizou-se a análise e classificação das sementes com posterior teste de germinação. Na Tabela 1 pode-se observar as porcentagens das sementes classificadas em cheias, vazias, malformadas ou danificadas. Os dados da porcentagem e índice de velocidade de germinação são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Porcentagens de sementes de *Passiflora* spp. criopreservadas e submetidas a teste de raio-x e classificadas em semente cheia (SC), sementes vazia (SV), semente malformada (SMF) e semente danificada (SD). Cáceres/ MT, 2016.

Espécie	Variáveis analisadas			
	SC (%)	SV (%)	SMF (%)	SD (%)
<i>P. eichleriana</i>	82,14	9,00	8,86	0,0
<i>P. nitida</i>	67,72	3,72	28,56	0,0
<i>P. mucronata</i>	14,77	0,0	85,23	0,0

Tabela 2. Porcentagem de germinação (PG) e Índice de velocidade de germinação (IVG) de sementes de *Passiflora* spp., crioprotetidas e criopreservadas.

Tratamentos	Variáveis analisadas					
	<i>Passiflora eichleriana</i>		<i>Passiflora nitida</i>		<i>Passiflora mucronata</i>	
	PG* ⁽¹⁾ (%)	IVG* ⁽²⁾	PG* ⁽¹⁾ (%)	IVG* ⁽²⁾	PG ^{NS(1)} (%)	IVG ^{NS(2)}
Controle	58,0 a	2,689 a	21,0 a	0,331 a	0,0	0,000
S/ crioproteção	51,0 a	1,876 a	25,0 a	0,394 a	1,0	0,019
T1	42,0 a	1,319 b	0,0 b	0,000 b	0,0	0,000
T2	48,0 a	1,466 b	0,0 b	0,000 b	0,0	0,000
T3	9,0 b	0,266 b	0,0 b	0,000 b	0,50	0,011
T4	18,0 b	0,617 b	0,0 b	0,000 b	0,5	0,010
T5	40,0 a	1,922 a	17,2 a	0,276 a	0,0	0,000
T6	68,0 a	2,668 a	15,0 a	0,196 a	0,5	0,008
T7	59,0 a	2,012 a	21,0 a	0,329 a	1,0	0,019
T8	66,0 a	3,025 a	14,5 a	0,216 a	0,0	0,000
T9	44,0 a	2,078 a	19,0 a	0,252 a	0,5	0,086
T10	26,0 b	1,055 b	3,0 a	0,028 a	0,0	0,000
T11	47,0 a	2,289 a	0,0 b	0,000 b	0,0	0,000
T12	38,4 a	1,370 b	0,0 b	0,000 b	0,0	0,000
CV %	15,8	10,40	41,38	6,20	41,18	1,55
Média (%)	43,88	1,7608	9,69	0,1444	0,28	0,0109

*Médias dentro da mesma coluna seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo. Legenda: Glicerol: T1-1,73; T2 - 2,28; T3 - 2,60 e T4 - 2,71 M; Sacarose: T5 - 0,37; T6 - 0,46; T7 - 0,54 e T8 - 0,61 M; DMSO: T9 - 0,37; T10 - 0,72; T11 - 1,04 e T12 - 1,35 M. Dados transformados em $\sqrt{Y + 0,5}$ (1) e $\arcsen(\sqrt{X\%/100})$ (2)

Do lote total de sementes de *P. eichleriana* expostas ao raio-X, após a criopreservação não foram observadas sementes danificadas (com rachaduras/trincas) (Figura 2) como pode ser observado da Tabela 1.

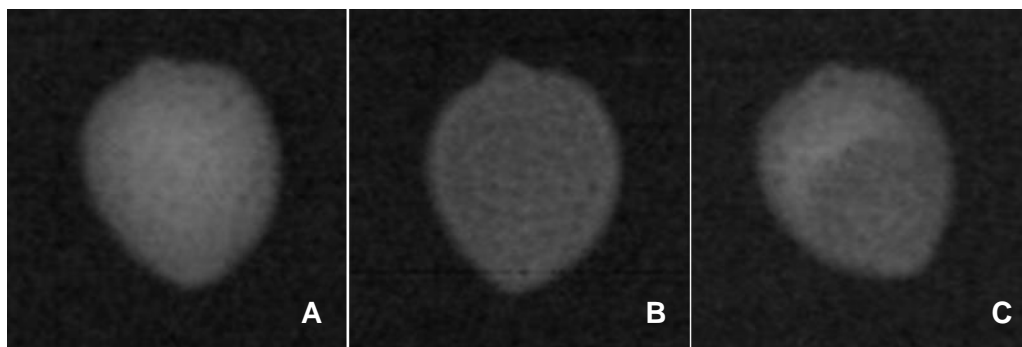


Figura 2. Imagem de raio-X de sementes de *P. eichleriana*, classificadas em semente cheia – SC (A) e semente vazia – SV (B) e semente malformada – SMF (C)

Na análise estatística para *P. eichleriana*, a variável porcentagem de germinação apresentou diferença apenas para os tratamentos com as duas maiores dosagens de glicerol e uma concentração de DMSO, os demais tratamentos igualaram-se às sementes que não foram crioprotegidas e nem criopreservadas (controle). No índice de velocidade de germinação, todos os tratamentos com o crioprotetor glicerol e duas de DMSO apresentaram médias inferiores (Tabela 2). Esta diferença pode-se atribuir a um efeito de toxidez do crioprotetor glicerol, não sendo totalmente evidente para o crioprotetor DMSO, visto ter apresentado na porcentagem de germinação apenas um tratamento com média inferior.

A porcentagem média de germinação (43,88%) quando comparada a porcentagem de sementes cheias (SC), demonstra uma discrepância entre estas variáveis, pois sementes cheias representam teoricamente sementes viáveis, devendo a porcentagem de germinação, ficar ao menos próxima da porcentagem de sementes cheias, não se justificando nem mesmo pela influência das médias inferiores apresentadas pelos tratamentos com glicerol (T3 e T4) e DMSO (T10). Pois, a maior porcentagem de germinação foi de 68,0% para o tratamento com sacarose (T6), claramente bem menor que a porcentagem de sementes cheias de 82,14%.

Para *Passiflora eichleriana* a inferioridade da porcentagem média de germinação em relação a porcentagem de sementes cheias, se deve possivelmente a perda de viabilidade e/ou indução a dormência causada pelo armazenamento a baixa temperatura. Uma vez que as sementes utilizadas para o teste de raio-X possuíam um período de nove meses de armazenamento em câmara fria. Pádua et al. (2011) verificaram que as sementes de *P. setacea*, apresentaram redução da

taxa de germinação, após seis meses de armazenamento, atribuído a indução de dormência em virtude do armazenamento a baixa temperatura. Já Osipi e Nakagawa (2005), verificaram que as sementes de *P. alata*, demonstram a possibilidade de armazenamento em câmara fria, por mais de 12 meses sem prejuízo a viabilidade, o que não foi observado para *P. eichleriana*. Devendo-se então realizar ensaios específicos para verificar a tolerância e particularidades das sementes para manutenção da viabilidade.

A diferença na porcentagem de sementes cheias e sementes germinadas pode ser explicada de acordo com Burg et al., (1994), argumentam que algumas sementes não apresentam danos no teste de raio-X, mas podem não germinar devido a infecções invisíveis por microrganismos, danos fisiológicos ou dormência das sementes, tal situação pode explicar os resultados obtidos com sementes de *P. eichleriana*.

Em diversos trabalhos foi possível encontrar relação entre as imagens observadas a partir do teste de raio-X e o resultado do teste de germinação, como por exemplo em trabalho realizado com pimentão (*Capsicum annuum*), onde verificou-se uma redução progressiva da formação de plântulas normais a partir de sementes com área de espaços livres entre o embrião e o endosperma superior a 2,7% (Dell'Aquila, 2007).

Pupim et al. (2008) ao avaliarem sementes de embaúba (*Cecropia pachystachya*), detectaram que sementes totalmente formadas originaram 67% de plântulas normais no teste de germinação, em contrapartida 100% das sementes parcialmente formadas originaram plântulas anormais ou não germinaram.

Em ipê-de-jardim (*Tecoma stans*) Socolowski e Cícero (2008), observaram que sementes vazias ou com embriões malformados apresentaram massa menor em relação a sementes com embriões sem defeitos. Pinto et al. (2009), ao realizarem teste de raio-X em sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas*) afirmam que as sementes que apresentaram manchas escuras, como sinais de tecidos deteriorados, em mais de 50% do endosperma e, ou no embrião, não germinaram ou originaram plântulas anormais.

Para a espécie *P. nitida*, de acordo com a Tabela 1, após análise das imagens de raio-x, das sementes criopreservadas, não foram observadas sementes danificadas (com rachaduras/ trincas) (Figura 3).

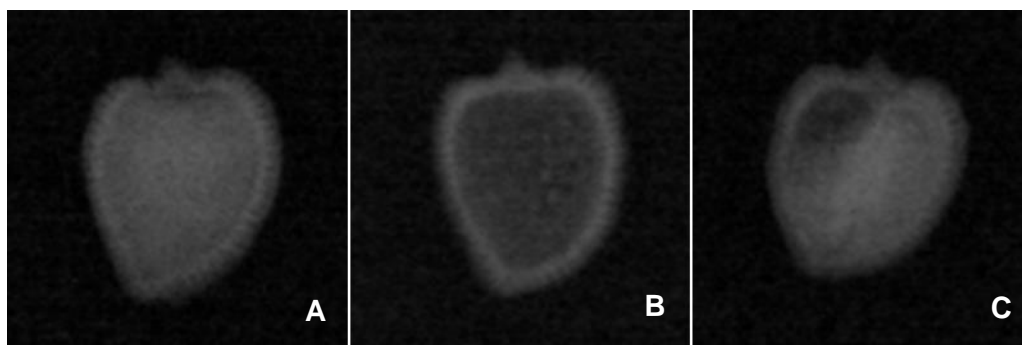


Figura 3. Imagem de raio-X de sementes de *P. nitida*, classificadas em semente cheia – SC (A), semente vazia – SV (B) e semente malformada – SMF (C)

Após aplicação de análise estatística, observa-se que houve diferença entre os tratamentos para as duas variáveis analisadas. Houve para todos os tratamentos com glicerol inexistência de germinação, assim como para as duas maiores dosagens de DMSO. Os demais tratamentos foram iguais às sementes não crioprotetidas e nem criopreservadas (controle). A inexistência de germinação de sementes tratadas com glicerol evidencia o perfil tóxico deste crioprotetor independentemente da dosagem, enquanto que DMSO é prejudicial em concentrações maiores.

Para *Passiflora nitida* também não se observa uma equivalência entre porcentagem de sementes cheias (SC) e porcentagem de germinação (PG). O que não se atribui totalmente a desuniformidade entre os tratamentos. Pois, nem os tratamentos com maiores taxas de germinações, foram próximos à porcentagem de sementes cheias (SC), onde a maior taxa de germinação apresentada foi de 25% para sementes criopreservadas sem crioprotetor, contrapondo-se a 67,72% de sementes cheias. Demonstrando uma baixa taxa de germinação para esta espécie.

Meletti et al. (2002) e Andrade et al. (2010) afirmam que esse comportamento de baixa germinação se dá em função de problemas com dormência, pois espécies silvestres como *P. nitida* apresentam longo período de dormência e, é provável que o tratamento empregado para a superação de dormência não surtiu o efeito esperado.

Carvalho et al. (2009^a) encontraram resultados concordantes entre o teste de germinação e o teste de raio-X, onde em estudo com espécies florestais de Lauraceae observaram que danos no embrião ou má-formação do tecido cotiledonar resultaram em sementes mortas no teste de germinação. Kikuti e Marcos-Filho (2010) verificaram em sementes de alface (*Lactuca sativa*) que a diferença entre o percentual de sementes com morfologia interna normal e o percentual de germinação não superou 3% para 11 lotes de sementes, demonstrando relação entre o teste de germinação e o teste de raio-X.

Quanto às sementes de *P. mucronata*, apresentaram apenas duas classes, sementes cheias e sementes malformadas (Figura 4), sendo esta última classe bem expressiva com 85,23% (Tabela 1) e inexistência de sementes vazias e sementes danificadas (com rachaduras/ trincas). Para *P. mucronata* não houve diferença entre os tratamentos avaliados quanto à porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação, com médias de 0,28% e 0,0109 respectivamente.

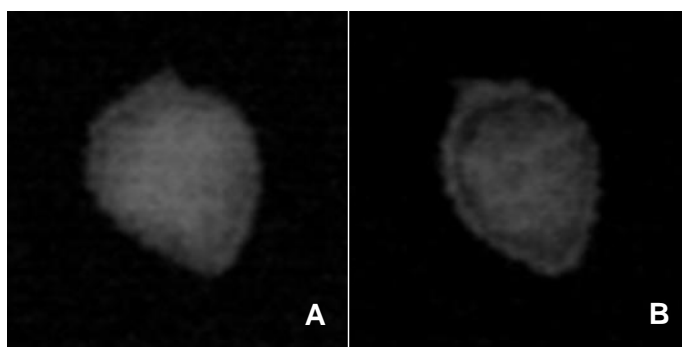


Figura 4. Imagem de raio-X de sementes de *P. mucronata*, classificadas em semente cheia – SC (A) e semente malformada – SMF (B)

É evidente que a espécie *P. mucronata* apresentou uma porcentagem significativa de sementes com má-formação, sendo que esta condição não foi decorrente do processo de criopreservação e sim por eventos anteriores, tais como, polinização, formação das sementes, maturação dos frutos entre outros. Socolowski e Cícero (2008) afirmam que ao trabalharem com sementes de *Tecoma stans* (ipê-de-jardim), e de *Tabebuia heptaphylla* (ipê-roxo), as imagens de raio-X permitiram visualizar o grau de desenvolvimento dos embriões, possibilitando detectar anomalias embrionárias, que provavelmente tiveram origem durante a maturação dos frutos, assim como observado para *P. mucronata*.

A alta porcentagem de sementes malformadas inviabiliza se obter uma alta porcentagem de germinação, o que foi efetivamente observado para esta espécie, de forma que os resultados do teste de germinação confirma que a morfologia interna pode ser um indicativo do potencial de viabilidade, onde sementes malformadas prejudicam o desempenho do lote. Ainda que, apresentando uma alta porcentagem de sementes malformadas, não houve correspondência entre a porcentagem de sementes cheias e a porcentagem de germinação que foram respectivamente 14,77% e 0,28%, sendo essa baixa germinação atribuída às sementes malformadas que impossibilitam o processo de germinação e formação de plântula, mas também a problemas de dormência, típico em sementes de espécies do gênero *Passiflora*. Por essa baixa germinação para todos os tratamentos, não foi possível observar os efeitos dos crioprotetores, que foram iguais entre si.

Em sementes de mamona (*Ricinus communis*) os tecidos que resultaram em imagens translúcidas, embriões deformados e tecidos com menos de 50% de endosperma ou manchados afetaram negativamente a germinação (Carvalho et al., 2010). Kobori et al. (2012), para a mesma espécie de mamona, verificaram diferenças entre o teste de raio-X realizados em sementes recém-colhidas com posterior armazenamento por seis meses, bem como diferenças em dados de germinação, onde os padrões para o teste de raio-X e de teste de germinação foram inferiores em sementes armazenadas por seis meses, demonstrando a eficiência do teste de raio-X para se verificar a qualidade fisiológica das sementes. Nakada et al. (2011) em trabalho com pepino (*Cucumis sativus* L.) também verificaram estreita relação entre o teste de raio-X e o teste de germinação.

O teste de raio-X é tido como altamente eficiente como apontado por Flor et al. (2004), que em trabalho com sementes de soja (*Glycine max*), concluíram que a utilização de raio-X para a avaliação de danos mecânicos mostrou-se como uma competente alternativa em relação a outros métodos utilizados para o mesmo fim, com a vantagem de se poder comprovar os efeitos dos danos por meio de testes fisiológicos, por se tratar de método não destrutivo. Isso permite ainda realizar análises impossíveis por outros métodos, como identificação de aquênios cheios, mal formados e vazios de arnica (*Lychnophora pinaster*) o que dificilmente seriam separados durante o beneficiamento (Melo et al., 2009).

Quanto ao crioprotetores e os resultados apresentados na análise de variância. Foram evidentes os resultados negativos apresentados pelos crioprotetores glicerol e DMSO, para DMSO principalmente em dosagens maiores. Enquanto que o crioprotetor sacarose, proporcionou de acordo com a análise de variância, uma boa proteção para manutenção da viabilidade equiparando-se às sementes não crioprotegidas e nem criopreservadas (controle).

Glicerol e DMSO apresentaram provável toxidez, pois de acordo com Sakai (1995) alguns crioprotetores podem ser tóxicos ou podem causar estresse osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogênética.

Atribui-se ao crioprotetor glicerol a capacidade de aumentar o teor de água das sementes levando a formação de cristais de gelo com conseqüente injúria mecânica, bem como prejuízo à qualidade fisiológica, com alterações na composição química da semente (Molina et al., 2006). O crioprotetor DMSO, como já apontado em outros estudos, apresenta efeito tóxico em concentrações mais elevadas (Kaurin e Stushnoff, 1985, Jaganathan et al., 2014).

A sacarose por sua vez é considerada um excelente agente vitrificador, por apresentar alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante os processos de desidratação e congelamento, e não ser tóxico para células vegetais mesmo quando se acumulam em grande quantidade no citoplasma (Santos, 2000; Carvalho & Otoni, 2010).

Acredita-se que os açúcares agem como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular através de um gradiente osmótico ou substituindo a água removida das biomoléculas, mantendo as estruturas hidrofílicas mesmo depois da remoção da água (Dumet et al., 1993; Santos, 2000). Os açúcares solúveis dentro da célula formam ligações de hidrogênio e, assim, substituem a água, mantendo as estruturas hidrofílicas em sua orientação quando hidratada (Crowe et al., 1988; Koster, 1991).

Para as três espécies estudadas não houve a presença de sementes danificadas nas imagens de raio-X. É importante salientar que não se realizou neste trabalho, teste de raio-X antes da crioproteção e criopreservação das sementes, portanto a inexistência de sementes danificadas assegura que os processos não causam danos, bem como estes danos não existiam antes da realização da técnica,

da mesma forma que não foram encontrados danos em sementes não crioprotegidas e nem criopreservadas (controle), utilizadas como parâmetro de comparação, para todos os tratamentos.

CONCLUSÕES

- As sementes de *Passiflora eichleriana*, *Passiflora nitida* e *Passiflora mucronata*, não são danificadas pelos processos de crioproteção e criopreservação, quando comparadas com sementes não crioprotegidas nem criopreservadas (controle).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, D. C. A. **Bases fisiológicas para a conservação a longo prazo de sementes *Cariniana legalis* (Mart.) O. Kuntze.** Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2009. 92p. Tese (Doutorado em Produção e Tecnologia de Sementes).

AGUIAR, A. V. M.; SILVA, R. M.; CARDOSO, E. A.; MARACAJÁ, P. B.; PIRES, H. G. Utilização de espécies de *Passiflora* spp. como portaenxertos no controle de doenças do maracujazeiro. **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, 06: 17-22, 2010.

ANDRADE, S. R. M.; ROSA, S. D.; ARAÚJO, C. S.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V. **Estudos preliminares sobre a germinação de *Passiflora nitida*.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2010. 13p.

ARAÚJO, D. S. **Criopreservação de espécies de *Passiflora*.** Cáceres: Universidade do Estado de Mato Grosso, 2014. 75p. (Dissertação - Mestrado em Genética e melhoramento de plantas).

ARAÚJO, D. S.; LUZ, P. B.; NEVES, L. G.; SOBRINHO, S. P. Seed Cryopreservation of *Passiflora* species. **Journal of Seed Science**. 3: 248-253, 2016.

BATTISTI, A.; CANTINI, R.; FECCI, E.; FRIGIMELICA, G.; GUIDO, M.; RAQUES, A. Detection and evaluation of seed damage of cypress, *Cupressus sempervirens* L. Italy. **Seed Science and Technology**. 3: 729-738, 2000.

BINO, R. J.; AARTSE, J. W.; BURG, W. J.; Non-destructive X-ray of Arabidopsis embryo mutants. **Seed Science Research**. 3: 167-170, 1993.

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

BURG. W. J. van der; AARTSE, J. W.; ZWORLD, R. A. van, JALINK, H.; BINO, R. J. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. **Journal American Society for Horticultural Science**. 2: 258-263, 1994.

CAMILLO, J.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI - PEREIRA, J. E. Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 44: 211-215, 2009

CARVALHO, L.R; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A.C. Utilização do teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de espécies florestais de Lauraceae. **Revista Brasileira de Sementes**. 4: 57-66, 2009b.

CARVALHO, M.L.M.; ALVES, R.A.; OLIVEIRA, L.M. Radiographic analysis in castor bean seeds (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**. 1: 170-175, 2010.

CARVALHO, M.L.M.; VAN AELST, A. C.; VAN ECK, J. W.; HOEKSTRA, F. A. Pre harvest stress cracks in maize (*Zea mays* L.) kels as characterized by visual, X-ray and low temperature scanning electron microscopical analysis: effect on kernel quality. **Seed Science Research**. 3: 227-236, 1999.

CARVALHO, M.L.M.; SILVA, C.D.; OLIVEIRA, L.M.; SILVA, D.G.; CALDEIRA, C.M. Teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de abóbora. **Revista Brasileira de Sementes**. 2: 221-227, 2009a.

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.

CICERO, S. M.; VAN DER HEIJDEN, G. W. A. M. ; VAN DER BURG, W. J.; BINO. R.J. Evaluation of mechanical damages in seeds of maize (*Zea mays* L.) by X-ray and digital imaging. **Seed Science and Technology**. 3: 603-612, 1998.

CRAVIOTTO, R. M.; YOLDJIAN, A. M.; SALINA, A. R; ARANGO, M. R; BISAROV; MATURO, H. Description of pure seed fraction of oat through usual evaluations and radiographic images. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 37: 1183-1188, 2002.

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

DELL'AQUILA, A. Pepper seed germination assessed by combined X-radiography and computer-aided imaging analysis. **Biologia Plantarum**. 51: 777-781, 2007.

DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**. 14: 243-250, 1993.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. **Euphytica**. 57: 227-243, 1991.

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.; PEIXOTO, J. R. **Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados e pesquisa 2005-2008**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 57p.

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.

FLOR, E.P.O.; CICERO, S.M.; FRANÇA NETO, J.B.; KRZYZANOWSKI, F.C. Avaliação de danos mecânicos em sementes de soja por meio da análise de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**. 1: 68-76, 2004.

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.

ISTA. INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International Rules for testing seed. **Seed Science and Technology**, 2: 300-520, 1995.

JAGANATHAN, G. K.; LIU, B. Effects of dimethyl sulfoxide concentration, pre-cooling and cooling rate on cryopreservation of hydrated lettuce seeds. **Seed Science. & Technology**. 42: 214-226, 2014.

KAURIN, A.; STUSHNOFF, C. Influence of dimethyl sulfoxide on freezing resistance of lettuce seeds. **Cryobiology**. 22: 569-573, 1985.

KIKUTI, A.L.P.; MARCOS FILHO, J. Evaluation of lettuce seed viability by combined X-ray and germination tests. In: ISTA CONGRESS, 2010, Cologne. **Seed Symposium Abstracts**. Bassersdorf: International Seed Testing Association, 2010. p.54-55.

KOBORI, N. N.; CÍCERO, S. M.; MEDINA, P. F. Teste de raios-X na avaliação da qualidade de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**. 1: 125-133, 2012.

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

MACHADO, C.F.; CÍCERO, M.S. Metodologia para a condução do teste de germinação e utilização de raios-X para a avaliação da qualidade de sementes de aroeira branca (*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.). **Informativo ABRATES**, 123: 28-34, 2002.

MAGUIRE, J. D. Seep of germination-aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**. 2: 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J.; KIKUTI, A. L. P.; LIMA, L. B. Métodos para avaliação do vigor de sementes de soja, incluindo análise computadorizada de imagens. **Revista Brasileira de Sementes**. 1: 102-112, 2009.

MELETTI, L. M. M.; FURLANI, V. A.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; FILHO, J. A. A. Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. **O Agrônômico**. 54: 30-33, 2002.

MELO, P.R.B.; OLIVEIRA, J.A.; CARVALHO, M.L.M.; GUIMARAES, R.M.; CARVALHO, B.O. Aplicação do teste de raios X no estudo da morfologia interna e da qualidade fisiológica de aquênios de arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**. 2: 146-154, 2009.

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.

NAKADA, P. G.; OLIVEIRA, J. A.; MELO, L. C.; GOMES, L. A.; PINHO, E. V. R. V. Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. **Revista Brasileira de Sementes**. 1: 022-030, 2011.

NERY, M. C. **Aspectos Morfológicos do Desenvolvimento de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich.** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2005. 95p. (Dissertação – Mestrado em Fitotecnia).

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: subsídios às atividades agropecuárias e turísticas municipais. **Boletim Goiano Geográfico**. 31: 55 – 68, 2011.

OSIPI, E. A. F., NAKAGAWA, J. Avaliação da potencialidade fisiológica de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander) submetidas ao armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 1: p. 52-54, 2005.

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.

PINTO, T.L.F.; MARCOS FILHO, J.; FORTI, V.A.; CARVALHO, C.; GOMES JUNIOR, F.G. Avaliação da viabilidade de sementes de pinhão manso pelo teste de tetrazólio e de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**. 2: 195-201, 2009.

PUPIM, T.L.; NOVENBRE, A.D.L.C.; CARVALHO, M.L.M.; CICERO, S.M. Adequação do teste de raios X para avaliação da qualidade de sementes de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec.). **Revista Brasileira de Sementes**. 2: 28-32, 2008.

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.

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

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: A alternativa para a conservação a longo prazo. **Biociência e Desenvolvimento**. 20: 60-65, 2011.

SILVA, D. R.; NARITA, N.; RÓS, A. B.; TAKATA, W. H. S.; HIRATA, A. C. S.; CAVICHIOLI, J. C. Produtividade de maracujazeiros sobre diferentes porta-enxertos e com raiz dupla. **Colloquium Agrariae**. n. esp: 18-23, 2012.

SIMAK, M. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. In: GORDON, A.G.; GOSLING, P.; WANG, B.S.P. (ed) **Tree and shrub seed handbook**. Zurich: ISTA, 1991. p.1-28.

SIMAK, M.; GUSTAFSSON, A. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. **Hereditas**. 39: 458-468, 1953.

SOCOLOWSKI, F.; CICERO, S.M. Caracterização morfológica de embriões por imagens de raios X e relação com a massa e a qualidade fisiológica de sementes de *Tecoma stans* L. Juss. ex Kunth (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Sementes**. 2: 200-208, 2008

TERRY, J.; PROBERT, R.J.; LININGTON, S.H. Processing and Maintenance of the Millennium Seed Bank Collections. In: SMITH, R. D.; LININGTON, S. H.; DICKIE, J. B.; LININGTON, S. H.; PRITCHARD, H. W.; PROBERT, R. J. Seed Conservation turning science into practice. Kew: **Royal Botanic Gardens**, 2003. p.307-325.

VEIGA, R. F. A. de.; MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; TOMBOLATO, A. F. C. A crioconservação de sementes de recursos genéticos hortícolas no Instituto agrônômico (IAC). **O agrônômico**. 58: 19-21, 2006.

VENDRAME, W.A.; CARVALHO, V.S.; DIAS, J.M.M. In vitro germination and seedling development of cryopreserved *Dendrobium* hybrid mature seeds. **Scientia Horticulturae**. v.114, p.188-193, 2007.

WETZEL, M. M.V.S.; REIS, R. B. RAMOS, K. R. Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas. **Circular técnica - Embrapa recursos genéticos e biotecnologia**. 26: 1-5, 2003.

ZELIANG,P. K.; PATTANAYAK, A. Fundamental Cryobiology and Basic Physical,

Thermodynamical and Chemical Aspects of Plant Tissue Cryopreservation. In: ABDURAKHMONOV, I. (ed). **Plant Breeding**. In teck: Hard Cover, 2012. p.41-56.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- Sementes de *P. eichleriana*, *P. cristalina* e *P. nitida* podem ser criopreservadas sem utilização de crioprotetor;
- O crioprotetor glicerol compromete a viabilidade e o vigor de sementes de *P. eichleriana*, *P. cristalina* e *P. nitida*;
- O crioprotetor DMSO em altas dosagens diminui a viabilidade e o vigor de sementes de *P. cristalina* e *P. nitida*;
- As sementes de *Passiflora eichleriana*, *Passiflora nitida* e *Passiflora mucronata*, não são danificadas pelos processos de crioproteção e criopreservação, quando comparadas com sementes não crioprotetidas nem criopreservadas (controle).