

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO**

**CRIOPRESERVAÇÃO, GERMINAÇÃO E  
MORFOANATOMIA DE SEMENTES DE *Passiflora* spp.**

**Jailton de Jesus Silva**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2018**

# **CRIOPRESERVAÇÃO, GERMINAÇÃO E MORFOANATOMIA DE SEMENTES DE *Passiflora* spp.**

**Jailton de Jesus Silva**  
Engenheiro Florestal  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 2016

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>** Fernanda Vidigal Duarte Souza  
Coorientadora: **Dr.<sup>a</sup>** Tatiana Góes Junghans

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586	<p>Silva, Jailton de Jesus. Criopreservação, germinação e morfoanatomia de sementes de <i>Passiflora</i> spp. / Jailton de Jesus Silva. Cruz das Almas, BA, 2018. 95f.; il.</p> <p>Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vidigal Duarte Souza Co-Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Góes Junghans</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Mestrado em</p> <p>1.Maracujá. 2. Criopreservação. 3. Germinação de sementes I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas – CCAAB. II.Título.</p> <p>CDD: 634. 425</p>
------	---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS  
CURSO DE MESTRADO**

**CRIOPRESERVAÇÃO, GERMINAÇÃO E MORFOANATOMIA DE  
SEMENTES DE *Passiflora* spp.**

Comissão Organizadora da Defesa de Dissertação  
Jailton de Jesus Silva

Aprovado em: 21 de setembro de 2018

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Fernanda Vidigal Duarte Souza  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Orientadora)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Claudinéia Regina Pelacani Cruz  
Universidade Estadual de Feira de Santana  
(Examinador Externo)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Fabiane de Lima Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
(Examinador Interno)

## AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho só foi possível graças à contribuição de muitas pessoas. A elas dedico meu reconhecimento, e caso deixe de explicar o nome de alguém, me perdoem, pois sabemos que a memória é falha, mas não tenham dúvidas, que meu coração não o fará.

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de viver e poder realizar mais um sonho.

Um agradecimento a minha família e mais que especial a minha mãe Elizete e aos meus irmãos Bárbara, Jadson e Joise (I.M.) (eternamente em meu coração) ao amor dedicado a mim, que nos momentos de dificuldade souberam me alegrar e ensinar a superar cada etapa dessa vida. Agradeço a Daniele pelo apoio e incentivo em todos momentos.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e seus professores pelo conhecimento e fundamentação passada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade concedida para a realização da Pós-Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À Embrapa Mandioca e Fruticultura em especial a Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza e Dra. Tatiana Góes Junghans, minhas orientadoras, desde os estágios de iniciação científica até o Mestrado, pela compreensão, dedicação, confiança e por ter proporcionado os meios para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Everton Hilo de Souza pela dedicação, paciência, conselhos e orientações nas práticas dos experimentos e viagens acadêmicas que favoreceram ao desenvolvimento desse trabalho.

Agradecer ao Pesquisador Carlos Ledo pelo auxílio nas análises do trabalho.

Aos Técnicos Tatiane Amorim, Helder Carvalho, Honorato Pereira e Tânia Maria pelas orientações nos laboratórios, ensinamentos e por estarem sempre disponível quando da necessidade de utilização dos equipamentos dos laboratórios. Às analistas Fabiana Aud e Karen Cristina pela disponibilização dos laboratórios, reagentes e soluções para que a pesquisa fosse desenvolvida.

Às pessoas que me incentivaram e que nunca deixou que os momentos de dificuldade me fizessem desistir, em especial a Jucieny. Aos companheiros dos

Laboratórios de Tecnologia de sementes e Cultura de Tecidos, Michele, Jeanderson, Daniela Marques, Felipe, Igor, Laiz, Rafaele, Erison, Wagner, Taliane e Ronilze pela troca de experiência e momentos agradáveis durante o trabalho.

À bióloga Mônica Lanzoni Rossi pelo apoio técnico durante as atividades práticas na EsalQ-USP, pela obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura, pelo constante incentivo, amizade e convívio.

Aos funcionários do Centro de Energia Nuclear na Agricultura-CENA/USP que direta ou indiretamente colaboraram com a realização desse trabalho, à secretária Suzineide Manesco e a especialista em laboratório Cleusa Pereira Cabral.

A todos que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a concretização de mais esta etapa, **OBRIGADO.**

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	10
REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
CAPÍTULO I	
CRIOPRESERVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Passiflora</i> spp.....	34
CAPÍTULO II	
MORFOANATOMIA DE SEMENTES DE <i>Passiflora</i> spp.....	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	92

## **CRIOPRESERVAÇÃO, GERMINAÇÃO E MORFOANATOMIA DE SEMENTES DE *Passiflora* spp.**

**RESUMO:** Diante da importância de se conservar as espécies do gênero *Passiflora*, a criopreservação de suas sementes pode ser uma alternativa para longo prazo. O primeiro capítulo aborda a avaliação da germinação de sementes criopreservadas de *Passiflora* spp., utilizando ferramentas estatísticas tradicionais e análise multivariada. No segundo capítulo estão os resultados da biometria e anatomia das sementes dessas espécies a fim de gerar conhecimentos sobre sua morfologia e também para identificar possíveis crioinjúrias após o congelamento. Entre a criopreservação e a conservação no refrigerador os resultados mostraram que para a maioria das espécies não há diferença, ainda que para *P. suberosa*, a porcentagem de germinação, tempo médio e a sincronia obtiveram os melhores resultados em condições de refrigerador, enquanto para *P. tenuifila* o tempo de germinação, a velocidade média e a incerteza apresentaram resultados superiores nas sementes criopreservadas. A dessecação das sementes não gerou efeitos negativos na qualidade fisiológica, verificando alta germinabilidade das mesmas mesmo após a criopreservação. Para as espécies avaliadas, observou-se tolerância à dessecação, apresentando alta germinabilidade mesmo quando a umidade foi reduzida para 3,4%. Os resultados apresentados aqui deixam evidente que não há necessidade de dessecação das espécies para fins de criopreservação. As variáveis porcentagem de germinação, velocidade e sincronia apresentaram correlações positivas e estão diretamente relacionadas com a qualidade fisiológica, contribuindo para uma melhor avaliação do vigor das sementes. Foram observados seis tipos de ornamentações: reticulada para a espécie *P. coccinea*, finamente reticulada para *P. edulis*, reticulada foveolada para *P. gibertii* e *P. setacea*, reticulada alveolada para *P. maliformis* e *P. tenuifila*, grosseiramente reticulada para *P. morifolia* e reticulada falsifoveolada para *P. suberosa*. As sementes apresentaram grandes variações no comprimento (3,29 a 6,25 mm), largura (2,25 a 4,53 mm) e espessura (0,18 a 2,09 mm), com valores médios de 4,63 mm para comprimento, 3,28 mm para largura e 1,51 mm para espessura. O comprimento longitudinal do tegumento variou de 3520  $\mu\text{m}$  para *P. maliformis* a 5250  $\mu\text{m}$  para *P. gibertii*, com uma média de 4770  $\mu\text{m}$ . Foi possível verificar que algumas sementes sofreram rupturas no tegumento devido ao acondicionamento no nitrogênio líquido. Os resultados desse trabalho deixam evidente que as sementes das espécies estudadas de maracujazeiro podem ser crioconservadas sem a necessidade de dessecação, mantendo sua qualidade fisiológica após o congelamento. Também foi constatado que as fissuras nos tegumentos apresentaram profundidade limitada o que não provocou danos fisiológicos ao embrião e o endosperma.

**Palavras-chave:** Maracujá; Passifloraceae; Biometria; Anatomia



## CRYOPRESERVATION, GERMINATION AND MORPHANATOMY OF SEEDS OF *Passiflora* spp.

**ABSTRACT:** Cryopreservation of seeds may be an alternative for the long term, taking into account the importance of conserving these species. The first chapter of this work details the evaluation of the germination of cryopreserved seeds of *Passiflora* spp., using traditional statistical tools and multivariate analysis. In the second chapter, results of biometry and anatomy of the seeds of these species are shown, in order to know their morphology and to identify possible cryoinjury after freezing. Results showed that, for most species, there is no difference between cryopreservation and conservation in the refrigerator, although for *P. suberosa*, germination percentage, mean time and synchrony displayed the best results under refrigerator conditions, and for *P. tenuifila*, the germination time, mean velocity and uncertainty presented higher results on cryopreserved seeds. The desiccation of the seeds did not generate negative effects on the physiological quality, since high germinability was observed even after cryopreservation. For the evaluated species, tolerance to desiccation was observed, with high germinability even under the reduced humidity of 3.4%. The results presented here make it clear that there is no need for desiccation of the seeds of the species for cryopreservation purposes. The variables germination, speed and synchrony showed positive correlations and are directly related to the physiological quality, contributing to a better evaluation of seed vigor. Six types of seed ornamentation were observed: cross-linked to the species *P. coccinea*, finely crosslinked to *P. edulis*, crosslinked foveolate to *P. gibertii* and *P. setacea*, alveolate reticulated to *P. maliformis* and *P. tenuifila*, coarsely reticulated to *P. morifolia* and falsifoveolate reticulated for *P. suberosa*. Seeds presented large variations in length (3.29 to 6.25 mm), width (2.25 to 4.53 mm) and thickness (0.18 to 2.09 mm), with mean values of 4.63 mm for length, 3.28 mm for width and 1.51 for thickness. The longitudinal length of the tegument varied from 3520  $\mu\text{m}$  in *P. maliformis* to 5250  $\mu\text{m}$  in *P. gibertii*, with a mean of 4770  $\mu\text{m}$ . It was verified that some seeds suffered ruptures in the integument, due to the conditioning in liquid nitrogen. The results presented in this work bring evidence that seeds from the studied passion fruit species can be cryopreserved without the necessity of desiccation, maintaining its physiological quality after freezing. It was also observed that the fissures presented limited depth which did not induce physiological damage to the embryo and endosperm.

**Keywords:** Passion fruit; Passifloraceae; Biometry; Anatomy

## INTRODUÇÃO GERAL

Estratégias de conservação de germoplasma vêm sendo desenvolvidas e aplicadas para espécies vegetais de interesse econômico e conservacionista. O termo germoplasma é usado para descrever todo conjunto genético de uma espécie, ou ainda, como todo o patrimônio genético de uma espécie que pode ser transmitido de uma geração para outra, podendo possuir valor econômico ou cultural, atual ou potencial (BORÉM, 2009).

Para a conservação de germoplasma podem-se destacar duas estratégias: *in situ*, isto é, a manutenção de amostras em seu ecossistema natural, considerando suas populações naturais ou *ex situ*, quando é realizada fora das áreas de ocorrência natural.

A conservação de sementes é a forma mais comum, principalmente pelo fato de que a maioria das sementes das espécies cultivadas são ortodoxas, ou seja, toleram bem a redução de seu conteúdo de água, conservando-se bem em temperaturas baixas por tempos prolongados. Um banco de sementes pode ser um método prático e econômico para a conservação de germoplasma (SHIBLI et al., 2006). Entretanto, há um número significativo de espécies para as quais os bancos de sementes não são uma opção disponível (REED et al., 2011).

Para algumas espécies de maracujazeiro ocorre perda significativa da viabilidade das sementes durante o armazenamento o que pode ser influência do tempo de acondicionamento e condições de armazenamento (CATUNDA et al., 2003; ALVES et al., 2006).

Problemas de germinação devido ao armazenamento inadequado de sementes são muito comuns no gênero *Passiflora*, até mesmo no maracujá-azedo, o que é um fator limitante para os programas de melhoramento genético da cultura (MELETTI et al., 2002) e para os objetivos de conservação de germoplasma.

As instituições de pesquisa que mantêm Bancos de Germoplasma de *Passiflora* têm perdido acessos por falta de protocolos eficientes de armazenamento e de germinação de sementes. Desta forma, para viabilizar a utilização das diversas espécies de *Passiflora* no melhoramento genético e no uso como porta-enxertos é necessário o conhecimento prévio dos procedimentos adequados para germinação e conservação de sementes (JUNGHANS; JUNGHANS, 2016). As principais coleções

de *Passiflora* encontram-se na EMBRAPA, ESALQ, IAC, IAPAR, UNESP, UENF e UFRJ (FERREIRA, 2005).

Dentre as estratégias *ex situ* utilizadas para a conservação em longo prazo, a criopreservação tem sido uma opção importante. Essa técnica tem sido aplicada principalmente para as espécies que apresentam sementes recalcitrantes ou intermediárias (SANTOS, 2000). É caracterizada pela utilização de nitrogênio líquido em temperaturas ultrabaixas (-196°C) na conservação de estruturas vegetativas e reprodutivas (GONZÁLEZ-BENITO et al., 1998; SALOMÃO, 2002).

Para a maioria das sementes de plantas cultivadas e muitos de seus parentes silvestres, a criopreservação é uma estratégia interessante para a conservação de longo prazo. É uma estratégia alternativa ao banco de germoplasma tradicional, visto que a conservação das sementes em temperaturas ultrabaixas possibilita que seu metabolismo seja paralisado, impedindo a sua deterioração (GONZAGA et al., 2003) e prolongando seu tempo de armazenamento. Essa redução ou eliminação de danos causados ao DNA, além da possibilidade de o material ser armazenado em pequenos volumes faz da criopreservação uma alternativa promissora (ENGELMANN, 2011; PENCE, 2011).

Com isso, é importante conhecer a germinação das sementes a serem criopreservadas e se elas podem ser desidratadas a baixo grau de umidade e armazenadas em temperaturas ultrabaixas por longos períodos. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados com sementes de espécies de clima tropical (LIMA et al., 2008), onde se inclui o gênero *Passiflora*.

Por outro lado, como um estudo adicional, a morfoanatomia das sementes é importante para auxiliar o reconhecimento das espécies em estudos de regeneração natural, fornecendo informações na classificação taxonômica, considerações morfoevolutivas, além de ser fundamental no conhecimento dos processos fisiológicos das plantas (MELO et al., 2004; GARCIA et al. 2006).

Dentro desses estudos morfológicos pode-se citar a importância que o tegumento tem para o desenvolvimento das sementes e sua função em relação à germinação. O tegumento é um dos principais limitadores da absorção de água pelas sementes afetando a germinação e o vigor, sendo o estudo de sua estrutura e propriedades de grande valor para explicar a germinação das sementes sob diferentes condições ambientais (SOUZA; MARCOS-FILHO, 2001).

Além do aspecto morfológico, o conhecimento da anatomia das sementes também é de grande importância em estudos taxonômicos e para a compreensão de vários fenômenos ligados ao comportamento e adaptação das espécies vegetais nos diferentes ecossistemas (OLIVEIRA, 1999).

Assim, esse trabalho busca ajustar um protocolo de criopreservação de sementes de diferentes espécies de *Passiflora*, como também associar informações relevantes sobre o padrão de germinação e a caracterização morfoanatômica destas sementes a fim de contribuir para a conservação deste germoplasma e seu futuro resgate.

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Família Passifloraceae e o gênero *Passiflora*

A família Passifloraceae é composta por 630 espécies organizadas em 18 gêneros dentre as quais o gênero *Passiflora* é o mais importante devido ao número de espécies que possui valor econômico (VANDERPLANK, et al., 2003). Essas espécies são distribuídas ao longo das regiões tropical e subtropical, sendo aproximadamente 96% distribuídas nas Américas, embora haja registros na Índia, China, Austrália e ilhas do Pacífico (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014; SANTANA et al., 2015).

Aproximadamente 120 espécies do gênero *Passiflora* são encontrados no Brasil, fazendo com que o país seja considerado um dos principais centros de diversidade para este gênero (FALEIRO et al., 2005) juntamente com a Colômbia, Equador e Peru (PEREIRA et al., 2015).

O gênero *Passiflora* é numericamente e economicamente o mais importante da família Passifloraceae com espécies que representam interesse nutricional, ornamental e farmacêutico, além de que é o gênero mais comum da família na flora brasileira, podendo ser encontrado geralmente em bordas de floresta por todo o país (SOUZA; LORENZI, 2008).

Embora exista uma ampla diversidade genética representada pela biodiversidade nativa, apenas um pequeno número de espécies do gênero *Passiflora* participa da cadeia de abastecimento no mercado nacional e internacional de frutas com produção em larga escala, sendo elas: *Passiflora edulis* Sims f. *Flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo) e *Passiflora alata* (maracujá doce) (SANTANA et al., 2015).

O gênero exibe várias características florais únicas, como a presença de androginóforo bastante desenvolvido, uma corona complexa constituída por uma ou várias filas concêntricas de filamentos e uma impressionante variação interespecífica de tamanho, forma e cor (ULMER et al., 2004).

Souza e Lorenzi (2008) descreveram as espécies da família Passifloraceae composta por plantas trepadeiras, herbáceas, podendo apresentar hábitos arbustivos ou herbóreos, possuindo gavinhas originadas de transformações das inflorescências. Apresentam folhas alternas espiraladas simples ou raramente compostas, geralmente lobadas com nectários extraflorais no pecíolo ou lâmina, com ou sem estípula, podendo ter margem inteira ou serrada.

Suas flores são hermafroditas solitárias actinomorfas ou em inflorescências cimosas ou racemosas localizadas nas axilas das folhas, podendo ser diclamídeas ou raramente monoclamídeas, períginas, geralmente dialissépalo, prefloração imbricada, frequentemente petaloide, geralmente dialipétala, estames geralmente livres entre si, anteras rimosas, disco nectarífero por vezes presente ao redor do ovário ou do androginóforo, ovário súpero, estiletos no geral livres entre si apresentando fruto baga ou cápsula (OCAMPO et al., 2016).

A polinização é realizada principalmente por abelhas como a *Apis mellifera* e *Xylocopa* spp., aves e morcegos (KISHORE et al., 2010; ABRAHAMCZYK, 2014). As flores apresentam variedade de cores, são grandes, atraentes, perfumadas e produzem muito néctar e pólen, o que facilita a chegada de insetos para polinização cruzada (AMORIM et al., 2014). São geralmente alógamas e a polinização cruzada é favorecida pela posição das anteras abaixo do estigma, possuem grãos de pólen grandes e pesados e há frequente presença da autoincompatibilidade fisiológica (DARWIN, 1876; KISHORE et al., 2010).

### **Importância econômica do maracujazeiro: Usos e potencialidades**

De acordo com o IBGE (2016), o Brasil é o maior produtor de maracujá, gerando em 2016 aproximadamente 703 mil toneladas, com rendimento médio de 14.101 kg/ha. A Bahia é o estado que se destaca como maior produtor brasileiro (342.780 mil toneladas por ano), seguido do Ceará (98.122 mil toneladas por ano) e Minas Gerais (39.237 mil toneladas por ano). Ainda de acordo com o IBGE, a Bahia participou com 48% da produção nacional e apresentou um rendimento médio de 12.557 kg/ha (IBGE, 2016).

Apesar dos altos valores de produtividade dessa cultura, ainda persistem fatores que interferem para que esses números se tornem menores. Os principais fatores que ameaçam a expansão e a produtividade dos cultivos de maracujá azedo e maracujá doce são as pragas, que provocam prejuízos expressivos e levam os produtores a usarem defensivos agrícolas de forma indiscriminada (JUNQUEIRA et al., 2006).

Devido a esses problemas houve a necessidade de uma medida mais eficaz, econômica e ecológica de controle de doenças a partir do uso de cultivares resistentes, associada a outras técnicas de manejo integrado. Espécies silvestres do gênero *Passiflora* (*P. cincinnata*, *P. laurifolia*, *P. nitida*, *P. tenuifila*, *P. mucronata*, *P. gibertii*, *P. amethystina*, *P. quadrangularis*, *P. setacea*, *P. coccinea*, *P. caerulea*, entre outras) têm apresentado variabilidade e fontes de resistência às principais doenças do maracujazeiro e podem contribuir para o controle daquelas causadas por fungos e bactérias (SANTOS-FILHO; JUNQUEIRA, 2003).

Além disso, as espécies silvestres de *Passiflora* representam um recurso potencial para a melhoria das espécies cultivadas e para o desenvolvimento de novas variedades frutíferas ou voltadas para a produção de alimentos funcionais, fármacos e cosméticos, além de poderem ser utilizadas como ornamentais (COSTA et al., 2010).

Em algumas regiões de cultivo comercial de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), principalmente na região Centro-Norte do país, os patógenos de solo têm causado sérios prejuízos e até mesmo inviabilizado a cultura em determinadas áreas. Dessa forma, as espécies silvestres também poderiam ser testadas como porta-enxertos visando à resistência a fungos de solo e a morte precoce (SANTOS-FILHO; JUNQUEIRA, 2003).

Estruturas como as folhas, flores, raízes e frutos das espécies silvestres e comerciais são utilizadas por combater doenças como tumores gástricos e estresse além de ser um componente integral de muitas populações tradicionais (COSTA et al., 2005).

### **Conservação de Germoplasma**

Atualmente a perda da diversidade biológica e a redução das fontes naturais de germoplasma têm se tornado uma grande preocupação e atraído a atenção da

comunidade científica internacional. As causas estão relacionadas com ações antrópicas que levam à perda de habitats das espécies vegetais, qualidade do solo e à destruição de vários biomas, dentre outras perdas que atingem a biodiversidade vegetal.

As espécies cultivadas, relacionadas à alimentação e a outros usos, encontram em seus parentes silvestres a variabilidade genética necessária para enfrentar diversidades, sejam de origem biótica ou abiótica, como por exemplo, as mudanças climáticas. Dessa forma, a perda da variabilidade genética dessas espécies impacta diretamente na sua sobrevivência como espécie cultivada.

Muitas espécies vegetais têm sido ameaçadas de extinção ao redor do mundo por causa do desaparecimento de ecossistemas naturais provocado por ações antrópicas. Mais de 50% das espécies vegetais são oriundas de 34 *hotspots* globais, que já ocuparam 15,7% da superfície terrestre e ocupam cerca de 2,3% (REED et al., 2011).

No caso do gênero *Passiflora*, um fator importante que contribuiu significativamente para a perda de diversidade de espécies silvestres do gênero é o crescente uso de novas áreas nas regiões Centro-Norte para fins agrícolas, contribuindo para a erosão genética (FALEIRO et al., 2011) o que deixa ainda mais evidente a importância da conservação, seja para espécies cultivadas ou silvestres (CARVALHO; OTONI, 2010).

Essa conservação, para a maioria das espécies do gênero tem sido realizada de forma *ex situ*, em coleções de campo ou na forma de sementes em câmaras frias e secas (MELETTI et al., 2007). A conservação em campo mantém os genótipos em um mesmo local submetendo-os a ações abióticas e bióticas, o que requer aplicação de recursos (ENGELMANN, 2004; MELETTI et al., 2007; CASTRO et al., 2016).

A conservação *ex situ* considera a manutenção de espécies vegetais fora de seu ambiente natural, e encontra nos bancos e coleções de germoplasma as estruturas físicas onde são armazenados os acessos para a manutenção de sua variabilidade genética. É um conjunto de ações empregadas para manejar os recursos genéticos de diferentes espécies (NASCIMENTO et al., 2015) e que compreende uma gama de metodologias e formatos, podendo ser de curto, médio e longo prazo, além de poderem estar alocadas em condições de campo, laboratórios, câmaras frias ou criotânques.

Outra forma utilizada para conservação das espécies vegetais tem sido o estabelecimento de bancos *in vitro*, principalmente para as espécies propagadas vegetativamente. Contudo, esse método de conservação é pouco utilizado para o maracujá devido à falta de protocolos de regeneração e conservação. Entretanto, de uma maneira geral, apesar de todas as vantagens que a conservação *in vitro* apresenta, a necessidade de repetidos subcultivos, infraestrutura e mão-de-obra especializada, pode dificultar ainda mais seu estabelecimento (MELETTI et al., 2007).

A conservação *in situ*, apesar de inúmeras vantagens, como a preservação de seu habitat, a manutenção das interações entre os organismos e seus processos evolutivos (SIMON, 2010), tem sido muito dependente de políticas públicas, nem sempre direcionadas para esse objetivo. Adicionalmente, demanda um trabalho minucioso e criterioso acerca da diversidade e da representatividade que a área definida para ser conservada precisa ter.

Diante disso, a conservação de germoplasma por meio de sementes consiste em um método efetivo de armazenamento de espécies vegetais mantendo-se a diversidade biológica (BONNER, 1990). No entanto, devido ao alto índice de deterioração de sementes quando submetidas ao armazenamento em temperatura ambiente, aumentou-se os estudos direcionados para a conservação dessas sementes em longo prazo utilizando diferentes condições de armazenamento (GOLDFARB et al., 2010; GALLI et al., 2012). O objetivo é manter o máximo de viabilidade e vigor, minimizando os danos causados pelo processo de envelhecimento natural.

### **Criopreservação**

A criopreservação pode ser uma estratégia interessante, já que é de longo prazo e permite uma economia de espaço e redução das atividades de manutenção (GARCIA et al., 2014). As temperaturas ultrabaixas favorecem uma parada quase total do metabolismo, favorecendo a longevidade e viabilidade das mesmas (GARCIA et al., 2014).

Muitas espécies de importância econômica têm sido criopreservadas com sucesso com diferentes estruturas vegetal, dentre elas: a mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (MARIN et al., 1990), o milho (*Zea mays* L.) (DELVALLÉE et al.,



1989), a banana (*Musa spp.*) (PANIS et al., 1990), café (*Coffea arabica* L.) (ASSY-BAH; ENGELMANN, 1992).

A criopreservação bem-sucedida de tecidos vegetais requer a otimização de inúmeros fatores que vão desde o tamanho do material a ser criopreservado, o tempo de congelamento bem como o conteúdo de água que permanece na amostra (BEKHEET et al., 2007).

Um fator importante a ser considerado na criopreservação é a quantidade de água que contém o material a ser criopreservado, pois ela pode formar cristais de gelo intracelulares causando danos irreversíveis às membranas celulares e, impedindo dessa forma, a recuperação do material após a criopreservação (PANIS et al., 2005). Para que não ocorra formação de cristais de gelo intracelular, Panis et al. (2005) sugerem que alguns requisitos devem ser cumpridos, dentre eles: congelamento e descongelamento rápido e uma solução intracelular concentrada fazendo com que evite o acúmulo de água livre dentro da célula.

Desse modo, para a maioria das espécies e tipos de tecidos, os protocolos de criopreservação requerem uma adaptação individual à tolerância natural das plantas à dessecação, evitando a formação de cristais de gelo intracelular durante os estágios preliminares do processo de congelamento (PUKACKI; JUSZCZYK, 2015).

### **Métodos de criopreservação**

As técnicas de criopreservação são pesquisadas desde a década de 1970 usando diferentes órgãos, tecidos e células da planta onde o conteúdo de água sempre foi o fator mais crítico para definição de um protocolo eficiente, inclusive para sementes (OSPINA et al., 2000). Os trabalhos desenvolvidos nesse período utilizando material vegetal eram denominados de métodos clássicos, baseados no uso de crioprotetores químicos, desidratação e congelamento lento, seguidos da imersão em nitrogênio líquido, descongelamento, lavagem e recuperação do material (ENGELMANN, 1997).

Esses métodos de criopreservação envolviam a desidratação induzida pelo congelamento lento, enquanto que as novas técnicas são baseadas na vitrificação celular (SANTOS, 2000).

Nos primeiros protocolos de criopreservação, o congelamento era realizado em duas fases: uma em que o congelamento era lento com a temperatura reduzida a

uma velocidade definida ( $1 \text{ a } 10 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$ ) para valores próximos de  $-40 \text{ } ^\circ\text{C}$  usando um congelador programável; a segunda era constituída pelo congelamento rápido por meio da imersão direta do material em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 1997).

Com o surgimento do método da vitrificação que é o processo que elimina a necessidade do congelamento lento controlado e permite que os tecidos possam ser criopreservados por transferência direta para o nitrogênio líquido (BEKHEET, 2007) simplificou a operação de armazenamento (ENGELMANN, 1997).

Para a vitrificação dos tecidos, o uso de soluções altamente concentradas que penetrem nos tecidos antes de sua imersão no nitrogênio líquido é muito importante (ENGELMANN, 1997; SANTOS, 2001). Essa solução absorve água do interior das células contribuindo para a solidificação intracelular, formando um estado amorfo ou vítreo, quando colocada em nitrogênio líquido (WANG et al., 1998; SAKAI; ENGELMANN, 2007). Algumas misturas padrão são empregadas extensivamente, muitas das quais são chamadas PVS (plant vitrification solution). A mistura mais usada é PVS2, consistindo de sacarose, glicerol, etilenoglicol e DMSO (Dimetilsulfóxido) (SAKAI et al. 1990).

Crioprotetores, especialmente a sacarose, têm a capacidade de estabilizar a bicamada fosfolipídica, agindo como um agente osmótico externo. Além disso, na ausência de água, a sacarose mantém a capacidade de transportar cálcio através das membranas, além de inibir sua fusão, mantendo os lipídios em uma fase fluida, estabilizando as proteínas em condições de congelamento e livres de citotoxicidade mesmo quando sob altas concentrações (WOELDERS et al., 1997).

A desidratação é um ponto crítico do processo e acontece quando se coloca o material em contato com algumas substâncias químicas concentradas. No estado vítreo as reações químicas, que requerem difusão, ficam impedidas de acontecer e com isso garantem a estabilidade durante o período de acondicionamento no nitrogênio líquido. Após o descongelamento do material vegetal, a solução de vitrificação é retirada por meio de uma solução concentrada de sacarose visando a retirada da solução de vitrificação (PVS2) e o restabelecimento dos níveis normais de concentração da solução intracelular (WANG et al., 1998).

## Criopreservação de sementes

A criopreservação pode ser uma técnica importante para a conservação e manutenção da qualidade fisiológica de sementes (SILVA et al., 2016). Fatores como a tolerância à dessecação e sensibilidade à baixa temperatura do nitrogênio líquido são os pontos mais importantes durante o processo criogênico de sementes (OSPINA et al., 2000; SANTOS, 2000).

As sementes apresentam comportamento fisiológico diferente em relação ao armazenamento, sendo classificadas em ortodoxas, intermediárias e recalcitrantes, o que pode exigir uma diferenciação no protocolo a ser utilizado para a criopreservação (CARVALHO; OTONI, 2010). Portanto, observou-se que há um grau de umidade em equilíbrio nas sementes considerado como ideal para a criopreservação, que deve ser avaliado para cada espécie (HONG; ELLIS, 2003).

As sementes classificadas como ortodoxas devem ser armazenadas com baixo grau de umidade e são capazes de manter seu vigor em temperaturas abaixo de zero não perdendo sua viabilidade. Para as sementes classificadas como intermediárias, o grau de umidade crítico durante armazenamento pode variar consideravelmente com a espécie, grau de maturidade e método de extração de sementes e/ou manuseio (ARAUJO, 2015).

Por outro lado, as sementes recalcitrantes requerem elevado grau de umidade para manter sua viabilidade por um período mais longo (SCHORN et al., 2010). Além disso, a maioria das sementes recalcitrantes é caracterizada pelo tempo curto de viabilidade após colheita, estimado em dias ou meses, ou para algumas espécies de clima temperado, talvez um ano ou dois (BERJAK; PAMMENTER, 2008).

Muitas espécies de maracujazeiro apresentam sementes ortodoxas podendo ser regeneradas posteriormente sem perder a sua viabilidade como a *P. edulis*, *P. gibertii*, *P. suberosa*. No entanto, existem as sementes intermediárias que toleram dessecação em níveis relativamente baixos, mas são danificadas por temperaturas abaixo de zero quando não dessecadas (ELLIS et al., 1990). Além disso, existem as espécies recalcitrantes que não aceitam dessecação em um nível de umidade suficientemente baixo para permitir seu armazenamento a temperaturas negativas.

Para muitas sementes a capacidade de sobreviver à dessecação é o resultado de adaptações que impedem a destruição celular durante a perda de água. À medida que uma célula que não tolera a dessecação perde água podem ocorrer vários

eventos, dentre eles: os solutos tornam-se mais concentrados, há um aumento da taxa de produtos químicos destrutivos, ocorre a cristalização de alguns produtos, há alteração da força iônica e do pH da solução intracelular, as proteínas tornam-se desnaturadas propiciando o rompimento das membranas levando à perda de compartimentalização da célula (KOSTER, 1991).

Existem poucos trabalhos com criopreservação de sementes de espécies do gênero *Passiflora*, principalmente com espécies silvestres, embora Araújo et al. (2016) tenha conseguido obter respostas favoráveis à criopreservação para *P. mucronata*, *P. suberosa* e *P. edulis*. As sementes criopreservadas de *P. edulis* e *P. ligularis* mantiveram altas porcentagens de germinação quando dessecadas para 8% de grau de umidade (OSPINA et al., 2000).

González-Benito et al. (2009) trabalhando com germinação e resgate de embriões de sementes criopreservadas de espécies do gênero *Passiflora* encontrou os melhores resultados com os graus de umidade em torno de 4,5-4,8% para *P. pinnatistipula* e *P. mollissima* e 9% para *P. tarminiana* resultando em taxas de germinação de 84%, 73% e 63%, respectivamente.

Assim, apesar da existência de alguns trabalhos sobre a criopreservação de sementes de algumas espécies de maracujazeiro, deve ser ampliado os estudos buscando avaliar a criopreservação de mais espécies devido à grande variabilidade genética do gênero e sua importância.

### **Análise multivariada**

Para as análises envolvendo a criopreservação de sementes, que é monitorada por meio dos testes de germinação, geralmente são utilizadas técnicas estatísticas que envolvem apenas uma variável para avaliar a eficiência dos tratamentos. Contudo, o estudo das variáveis separadamente pode acarretar em informações insuficientes para modelar o fenômeno biológico, podendo obter resultados não condizentes com o modelo dos dados.

Sendo assim, o uso da análise multivariada para a avaliação de um grande número de variáveis simultaneamente faz-se necessário, pois permite avaliar ao mesmo tempo um conjunto de características, levando em consideração as correlações existentes entre elas (JOHNSON et al., 2014). Além de que é verificado na literatura que o uso de diferentes metodologias estatísticas pode auxiliar na seleção

mais precisa das características utilizadas tendo como destaque a análise de componentes principais (SANTOS et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2006). Essa análise é um complemento da análise multivariada e é sugerida para verificar a relação entre as variáveis de interesse no estudo e quais contribuem para uma maior diversidade dos dados (CRUZ; REGAZZI, 1994).

Observou-se na literatura que, para a cultura do maracujazeiro, a utilização da análise de componentes principais não foi muito explorada para avaliar características germinativas, no entanto, essa análise estatística tem sido utilizada para a seleção de descritores, como por exemplo na cultura do mamão, cupuaçu, quiabo, cacau e mandioca (ARAÚJO et al., 2002; ALVES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2012).

Consta na literatura que o uso de diferentes metodologias estatísticas pode auxiliar na interpretação mais precisa das avaliações realizadas, tendo como destaque a análise de componentes principais (SANTOS et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2006).

Para Cruz et al. (2004) a análise multivariada de componentes principais fornece informações para a identificação de características com maior conteúdo informativo para a descrição de germoplasma, além de indicar quais caracteres são poucos influentes para a variação total disponível. Essas premissas são perfeitamente adaptadas para o trabalho em questão. Ainda que a abordagem seja a conservação, a germinação de cada espécie pode ser o diferencial entre elas.

Nesse trabalho essa análise será aplicada considerando as variáveis utilizadas para a avaliação da germinação de sementes criopreservadas das diferentes espécies de *Passiflora*.

### **Morfoanatomia das sementes**

O estudo sobre morfoanatomia de frutos e sementes tem atraído a atenção de muitos autores para a ampliação de trabalhos nessa área por causa da pequena plasticidade fenotípica que as sementes apresentam em um mesmo grupo taxonômico.

Os trabalhos que abordam a morfologia de espécies auxiliam nos trabalhos de taxonomia, nas interpretações dos testes de laboratório e em bancos de sementes. Esses estudos ainda podem contribuir para o entendimento dos mecanismos de

dispersão das sementes, sucessão, regeneração natural e identificação botânica da espécie (PERÉZ-CORTÉZ et al., 2009).

Alguns autores relatam sobre a variação morfológica que existe nas estruturas superficiais das sementes de diversas espécies do gênero *Passiflora*, e que essas características poderiam ser utilizadas como ferramentas para identificação taxonômica do gênero (MACDOUGAL, 1994; PEREZ-CORTÉZ et al., 2002, 2005). No entanto, ainda são poucos os trabalhos relacionados à morfoanatomia das sementes de *Passiflora*, o que evidencia a necessidade de mais trabalhos a respeito desse órgão.

Os trabalhos encontrados sobre sementes de *Passiflora* geralmente são baseados na germinação e não sobre estudos de caracterização morfoanatômica. Assim como, não há registros de trabalhos para verificar as injúrias causadas no embrião e tegumento após um procedimento de criopreservação.

Devido à escassez desses trabalhos, evidencia-se a necessidade de estudos que abordem a morfologia externa e interna das sementes desse gênero (FERREIRA et al., 2002; ARAÚJO et al., 2009; PÉREZ-CORTÉZ et al., 2009).

## REFERÊNCIAS

ABRAHAMCZYK, S.; SOUTO-VILARÓS, D.; RENNER, S. S. Escape from extreme specialization: passionflowers, bats and the sword-billed hummingbird. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 281, n. 1795, 2014.

ALVES, C. Z.; SÁ, M. E.; CORRÊA, L. S.; BINOTTI, F. S. Efeito da temperatura de armazenamento e de fitorreguladores na germinação de sementes de maracujá doce e desenvolvimento inicial de mudas. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 28, n. 3, p. 441-448, 2006.

ALVES, R. M.; GARCIA, A. A. F.; CRUZ, E. D.; FIGUEIRA, A. Seleção de descritores botânico-agronômicos para caracterização de germoplasma de cupuaçuzeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 807-818, 2003.

AMORIM, S. J.; SOUZA, M. M.; VIANA, A. J. C.; CORRÊA, R. X.; ARAÚJO, I. S.; AHNERT, D. Cytogenetic, molecular and morphological characterization of *Passiflora capsularis* L. and *Passiflora rubra* L. **Plant Systematics and Evolution**, v. 300, n. 5, p. 1147-1162, 2014.

ARAÚJO, D. S. D.; LUZ, P. B. D.; NEVES, L. G.; PAIVA SOBRINHO, S. D. Seed cryopreservation of *Passiflora* species. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 3, p. 248-253, 2016.

ARAÚJO, D. G.; CARVALHO, S. P.; ALVES, R. M. Divergência genética entre clones de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Willd ex Spreng Schum). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 1, p.13-21, 2002.

ARAÚJO, E. C.; SILVA, R. F.; BARROSO, D. G.; CARVALHO, A. J. C. Efeito do armazenamento e do progenitor masculino sobre a qualidade e micromorfologia de sementes de maracujá. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, p. 110-119, 2009.

ASSY-BAH, B.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of immature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.). **CryoLetters**, v. 13, n. 2, p. 67-71, 1992.

BEKHEET, S. A.; TAHA, H. S.; SAKER, M. M.; SOLLIMAN, M. E. Application of cryopreservation technique for *in vitro* grown date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultures. **Journal Applied Sciences Research**, v. 3, n. 9, p. 859-866, 2007.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, v. 101, n. 2, p. 213-228, 2007.

BONNER, F. T. Storage of seeds: potential and limitations for germplasm conservation. **Forest Ecology and Management**, v. 35, n. 1-2, p. 35-43, 1990.

BORÉM, A. Melhoramento de Plantas. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 44- 73, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, p. 395, 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, p. 89-113, 2010.

CASTRO, J. A.; OLIVEIRA, E. J.; JESUS, O. N.; SOARES, T. L.; MARGARIDO, G. R. A. Molecular markers for conservation genetic resources of four *Passiflora* species. **Scientia Horticulturae**, v. 212, p. 251-261, 2016.

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**, v. 25, n. 1, p. 65-71, 2003.



CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; JESUS, O. N.; SANTOS, E. S.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 8, p. 14122-14152, 2014.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O. Maracujá e suas propriedades medicinais Estado da arte. In: **Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético**; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F., Eds.; Embrapa Cerrados: Planaltina, Brazil, 2005, p. 475–508, 2005.

COSTA, C. J.; SIMOES, C. O.; COSTA, A. M. **Escarificação mecânica e reguladores vegetais para superação da dormência de sementes de *Passiflora setacea* D.C.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 2010. 15 p. (Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa em Desenvolvimento, 271).

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, UFV, p. 394, 1994.

DARWIN, C. The effects of cross and self fertilisation in the vegetable Kingdom. John Murray, London, 1876. Disponível em: <<http://darwin-online.org.uk/contents.html>>. Acesso: 14 Nov. 2017.

DELVALLÉE, I. GUILLAUD, J.; BECKERT, M.; DUMAS, C. Cryopreservation of immature maize embryos after freeze-hardening in the ear and *in vitro*. **Plant Science**. v. 60, n. 1, p. 129-136, 1989.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, 1990.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetics Resources Newsletter**, n. 112, p. 9-18, 1997.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. ***In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant***, v. 40, n. 5, p. 427-433, 2004.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. ***In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant***, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro e Desafios da Pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.), **Maracuja: Germoplasma e Melhoramento Genético** Embrapa Cerrados, Planaltina, p. 187-210, 2005.

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, p. 36, 2011.

FERREIRA, C. M.; DAVIDE, A. C.; MENDES, R. G. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson). **Cerne**, v. 8, n. 2, p. 17-25, 2002.

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

GALLI, J. A.; SOARES, M. B. B.; MARTINS, A. L. M. Período de armazenamento e da massa na germinação de sementes de mangueira da variedade Carabao. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 129-133, 2012.

GARCIA, C.; COELHO, C. M. M.; MARASCHIN, M.; DE OLIVEIRA, L. M. Conservação da viabilidade e vigor de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze durante o armazenamento. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 4, p. 857-867, 2014.

GARCIA, L. C.; NOGUEIRA, A. C.; ALQUINI, Y. Aspectos morfo-anatômicos de sementes de *Podocarpus lambertii* Klotz.-Podocarpaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 129-134, 2006.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. C. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 27-33, 2010.

GONZAGA, T. W. C.; MATA, M. E. R. M. C.; SILVA, H.; DUARTE, M. E. M. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 5, n. 2, p. 145-154, 2003.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E. Cryopreservation as a tool for preserving genetic variability: its use with Spanish wild species with possible landscaping value. **Acta Horticulturae**, v. 457, p. 133-142, 1998.

GONZÁLEZ-BENITO, M. E.; AGUILAR, N.; ÁVILA, T. Germination and embryo rescue from *Passiflora* spp. seeds post-cryopreservation. **CryoLetters**, v. 30, n. 2, p. 142-147, 2009.

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

IBGE. Produção Agrícola Municipal, 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 14 Nov. 2017.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. Applied multivariate statistical analysis. New Jersey: Prentice-Hall, 2014.

JUNGHANS, T. G.; JUNGHANS, D. T. Conservação de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) para fins de manutenção de germoplasma. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2016. 17 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 81).

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; RAMOS, J. D.; BELLON, G.; DA SILVA PAULA, M.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Variabilidade genética de acessos de

maracujá-suspiro (*Passiflora nitida* Kunth.) com base em marcadores moleculares. **Science**, v. 76, p. 5269-5273, 2006.

KAYA, E.; SOUZA, F. V. D. Comparison of two PVS2-based procedures for cryopreservation of commercial sugarcane (*Saccharum* spp.) germplasm and confirmation of genetic stability after cryopreservation using ISSR markers. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 53, n. 4, p. 410-417, 2017.

KISHORE, K.; PATHAK, K. A.; SHUKLA, R.; ANDRINKU, A. Studies on floral biology of passion fruit (*Passiflora* spp.). **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, n. 1, p. 21-29, 2010.

KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant physiology**, v. 96, n. 1, p. 302-304, 1991.

LIMA, V. V. F.; VIEIRA, D. L. M.; SEVILHA, A. C.; SALOMÃO, A. N. Germinação de espécies arbóreas de floresta estacional decidual do vale do rio Paranã em Goiás após três tipos de armazenamento por até 15 meses. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 3, p. 89-97, 2008.

MACDOUGAL, J. M. Revision of *Passiflora* subgenus *Decaloba* section *Pseudodysosmia* (Passifloraceae). **Systematic Botany Monographs**, v. 41, p. 1-146, 1994.

MARIN, M. L.; MAFLA, G.; ROCA, W. M.; WITHERS, L. A. Cryopreservation of *Cassava* zygotic embryos and whole seeds in liquid nitrogen. **CryoLetters**. v.11, n. 4, p. 257-264, 1990.

MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. A.; PIO, R. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 6, n. 2, p. 13-20, 2007.

MELETTI, L. M. M.; FULANI, P. R.; ÁLVARES, V.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; AZEVEDO FILHO, J. A. A. Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. **O Agrônômico**, v. 54, n. 1, p. 30-33, 2002.

MELO, M. G. G.; MENDONÇA, M. S.; MENDES, A. M. S. Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var. *adenotricha* (DUCKE) lee & lang.) (Leguminosae-caesalpinioideae). **Acta Amazônica**, v. 34, n. 1, p. 9-14, 2004.

NASCIMENTO, J. P. B.; VIEIRA, D. C. M.; MEIADO, M. V. *Ex situ* seed conservation of Brazilian cacti. **Gaia Scientia**, v. 9, n. 2, p. 111-116, 2015.

OCAMPO, J.; ARIAS, J. C.; URREA, R. Interspecific hybridization between cultivated and wild species of genus *Passiflora* L. **Euphytica**, v. 209, n. 2, p. 395-408, 2016.

OLIVEIRA, M. T. Morfo-anatomia do embrião de leguminosas arbóreas nativas. **Brazilian Journal of Botany**, v. 22, n. 3, p. 413-427, 1999.

OLIVEIRA, E. J.; DIAS, N. L. P.; DANTAS, J. L. L. Selection of morpho-agronomic descriptors for characterization of papaya cultivars. **Euphytica**, v. 185, n. 2, p. 253-265, 2012.

OLIVEIRA, M. S. P.; FERREIRA, D. F.; SANTOS, J. B. Seleção de descritores para caracterização de germoplasma de açaizeiro para produção de frutos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p.1133-1140, 2006.

OSPINA, J. A.; GUEVARA, C. L.; CAICEDO, L. E.; BARNEY, V. Effects of moisture on *Passiflora* seed viability after immersion in liquid nitrogen. In: ENGELMANN, F.; HIROKO, T. (Ed.). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current research progress and application Japan International Research Center for Agricultural Sciences. Tsukuba. p. 384-388. 2000.

PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, v. 168, n. 1, p. 45-55, 2005.

PANIS, B. J.; WITHERS, L. A.; LANGHE, E. A. L. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. **CryoLetters**, vol.11, n. 5, p. 337-350, 1990.

PENCE, V. C. Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered plants. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 176-187, 2011.

PEREIRA, D. A.; CORREA, R. X.; OLIVEIRA, A. C. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of 'somnus' passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC): implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 12-21, 2015.

PÉREZ-CORTÉZ, S.; ESCALA, M.; TILLET, S. Anatomía de la cubierta seminal en ocho especies de *Passiflora* L., subgénero *Passiflora*/Seed coat anatomy in eight species of *Passiflora* L., subgenus *Passiflora*. **Acta Botanica Venezuelica**, v. 28, n. 2, p. 337-348, 2005.

PERÉZ-CORTÉZ, S.; ESCALA, M.; TILLET, S. Morfoanatomía de la cubierta seminal en siete especies de *Passiflora* L., subgénero *Passiflora* (Passifloraceae). **Hoehnea**, v. 36, n. 1, p. 131-137, 2009.

PÉREZ-CORTÉZ, S.; TILLET, S.; ESCALA, M. Estudio morfológico de la semilla de 51 especies del género *Passiflora* L. **Acta Botanica Venezuelica**, v. 25, n. 1, p. 67-96, 2002.

PUKACKI, P. M.; JUSZCZYK, K. Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryonic axes of the seeds of two *Acer* species. **Trees**, v. 29, n. 2, p. 385-396, 2015.

RAJU, M. V. S. Embryology of the Passifloraceae: I. Gametogenesis and seed development of *Passiflora calcarata* Mast. **The Journal of The Indian Botanical Society**, v. 35, n. 1, p. 126-138, 1956.

REED, B. M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BUNN, E.; PENCE, V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 47, n. 1, p. 1-4, 2011.

SAKAI, A.; KOBAYASHI, S.; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v. 9, n. 1, p. 30-33, 1990.

SAKAI, A.; ENGELMANN, F. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. **Cryoletters**, v. 28, n. 3, p. 151-172, 2007.

SALOMÃO, A. N. Tropical seed species responses to liquid nitrogen exposure. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 14, n. 2, p. 133-138, 2002.

SANTANA, F. C.; SHINAGAWA, F. B.; ARAUJO, E. D. S.; COSTA, A. M.; MANCINI-FILHO, J. Chemical composition and antioxidant capacity of Brazilian *Passiflora* seed oils. **Journal of food science**, v. 80, n. 12, p. 2647-2654, 2015.

SANTOS FILHO, H. P.; JUNQUEIRA, N. T. V. (Ed.). Frutas do Brasil: maracujá fitossanidade. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 86, 2003.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, C. A. V., MENEZES, E. A. Seleção de descritores na caracterização e avaliação preliminar de germoplasma de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 971-975, 1995.

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

SCHORN, L. A.; SILVA, R. G. X.; MAGRO, B. A. Secagem e armazenamento de sementes de *Albizia niopoides* Benth. e *Bauhinia forficata* Link. **Revista Ciência Agrárias Ambiental**, v. 8, n. 2, p. 225-231, 2010.

SHIBLI, R. A.; SHATNAWI, N. A.; SUBAIH, W. S.; AJLOUNI, M. M. *In Vitro* Conservation and Cryopreservation of Plant Genetic Resources: A Review. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, n. 4, p. 372-382, 2006.

SILVA, L. M. M.; MATA, M. E. R. M. C.; DUARTE, M. E. M. Teor de água limite para criopreservação de sementes de romã. **Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 2, 2016.

SIMON, M. F. Manual de curadores de germoplasma-vegetal: conservação in situ. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2010.

SOUZA, F. H. D.; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed environment relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 4. p. 365-375, 2001.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2º Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M.; ULMER, B. *Passiflora*: passion flowers of the world. Portland, Or.: Timber Press 430p.-illus., col. illus.. ISBN, v. 881926485, 2004.

VANDERPLANK, J.; BLANCO, E. G.; FEUILLET, C.; FRANK, A.; KING, L.; KUGLER, E.; LAURENS, C.; MACDOUGAL, J.; SKIMINA, T. The international *Passiflora* register 2003. **Passiflora Society International**, v. 1, p. 1-36, 2003.

VEIGA-BARBOSA, L.; MIRA, S.; GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; SOUZA, M. M.; MELETTI, L. M. M.; PÉREZ-GARCÍA, F. Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of *Passiflora* species. **Seed Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 89-97, 2013.



VON TEICHMAN, I.; VAN WYK, A. E. Trends in the evolution of dicotyledonous seeds based on character associations, with special reference to pachychalazy and recalcitrance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 105, n. 3, p. 211-237, 1991.

WANG, J. H.; GE, J. G.; FENG, L.; BIAN, H. W.; HUANG, C. N. Cryopreservation of seeds and protocorms of *Dendrobium candidum*. **CryoLetters**, v. 19, n. 2, p. 123-128, 1998.

WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; ENGEL, B. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. **Cryobiology**, v. 35, n. 2, p. 93-105, 1997.

YONGJIE, W.; ENGELMANN, F.; FRATTARELLI, A.; DAMIANO, C.; WITHERS, L. A. Cryopreservation of strawberry cell suspension cultures. **CryoLetters**. v. 18, n. 5, p. 317-324, 1997.

## CAPÍTULO 1

# **CRIOPRESERVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Passiflora* spp.**

## CRIOPRESERVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Passiflora* spp.

**RESUMO:** Uma alternativa para a conservação a longo prazo de sementes de espécies do gênero *Passiflora* é a criopreservação, que consiste em armazenar o material vegetal a temperaturas ultrabaixas em nitrogênio líquido (-196 °C). Para a obtenção de resultados eficientes no uso dessa técnica é necessário estabelecer um conteúdo de umidade adequado das sementes e evitar danos celulares pela formação de cristais de gelo. Assim, objetivou-se com esse trabalho desenvolver uma estratégia de criopreservação de sementes de espécies de maracujazeiro e avaliar sua eficiência por meio da avaliação da germinação das sementes criopreservadas. Foram coletados frutos maduros de *Passiflora coccinea*, *P. edulis*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. morifolia*, *P. setacea*, *P. suberosa* e *P. tenuifila* no BAG da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foram consideradas sementes não dessecadas e dessecadas em sílica gel para posterior imersão em nitrogênio líquido. Os ensaios foram realizados em germinador e casa de vegetação para avaliação da germinação. O delineamento experimental inicial foi em esquema fatorial 2 (sementes dessecadas e não dessecadas) x 2 (temperatura de armazenamento) x 2 (ambiente de semeadura) x 8 (espécies), com 4 repetições, sendo cada repetição constituída de 25 sementes. Em um segundo momento realizou-se uma análise por espécie. Foi utilizada a técnica de componentes principais para entender a importância e a relação das variáveis entre si. O ambiente de semeadura (germinador ou casa de vegetação) foi o fator que mais influenciou todas as variáveis, seguido da temperatura e em escala ainda menor pelo conteúdo de umidade. As espécies que apresentaram os maiores valores de emergência após a criopreservação foram *P. edulis* ( $\bar{G}\%$ =95,0), *P. suberosa* ( $\bar{G}\%$ =92,0), *P. gibertii* ( $\bar{G}\%$ =90,5), *P. morifolia* ( $\bar{G}\%$ =88,5), *P. maliformis* ( $\bar{G}\%$ =83,5), *P. setacea* ( $\bar{G}\%$ =76,0), *P. coccinea* ( $\bar{G}\%$ =64,0) e *P. tenuifila* ( $\bar{G}\%$ =36,5). As variáveis porcentagem de germinação, velocidade de germinação e sincronia apresentaram correlações positivas e estão diretamente relacionadas com a qualidade fisiológica, contribuindo para uma melhor avaliação do vigor das sementes. Sendo assim, é possível criopreservar sementes das oito espécies estudadas sem a necessidade de dessecação e mantendo seu vigor fisiológico.

**Palavras-chave:** Conservação; Emergência; Nitrogênio; Maracujazeiro

## CRYOPRESERVATION AND SEEDS GERMINATION OF *Passiflora* spp.

**ABSTRACT:** An alternative for the long-term conservation of seeds of *Passiflora* species is cryopreservation, which consists in the storage of plant material at ultralow temperatures in liquid nitrogen (-196°C). In order to achieve efficient results with the use of this technique, it is necessary to establish a suitable moisture content of the seeds and avoid cellular damages by the formation of ice crystals during freezing. Thus, the objective of this work was to develop a strategy for cryopreservation of seeds of passion fruit species and to evaluate their efficiency by the analysis of the germination behavior of the cryopreserved seeds. Mature fruits of *Passiflora coccinea*, *P. edulis*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. morifolia*, *P. setacea*, *P. suberosa* and *P. tenuifila* were collected in the AGB of Embrapa Cassava and Fruits. Seeds not desiccated and seeds desiccated on silica gel were considered for subsequent immersion in liquid nitrogen. Germination tests were carried out in germinator and greenhouse to evaluate the germination behavior. The initial experimental design was a factorial scheme 2 (desiccated and not desiccated seeds) x 2 (storage temperatures) x 2 (sowing environment) x 8 (species), with 4 replicates, each repetition consisting of 25 seeds. In a second moment, one statistical analysis for species was performed. The principal component analysis technique was used to understand the importance and relation of the variables to each other. The sowing environment (germinator or greenhouse) was the factor that most influenced all variables, followed by temperature and, in a smaller scale, moisture content. The species that presented the highest values of emergence after cryopreservation were *P. edulis* ( $\bar{G}\% = 95.0$ ), *P. suberosa* ( $\bar{G}\% = 92.0$ ), *P. gibertii* ( $\bar{G}\% = 90.5$ ), *P. morifolia* ( $\bar{G}\% = 88.5$ ), *P. maliformis* ( $\bar{G}\% = 83.5$ ), *P. setacea* ( $\bar{G}\% = 76.0$ ), *P. coccinea* ( $\bar{G}\% = 64.0$ ) and *P. tenuifila* ( $\bar{G}\% = 36.5$ ). The variables germination percentage, germination velocity and synchrony presented positive correlations and are directly related to the physiological quality, contributing to a better evaluation of seed vigor. Thus, it is possible to cryopreserve seeds of the eight species studied without the need for desiccation and with maintenance of their physiological vigor.

**Keywords:** Conservation; Emergência; Nitrogen; Passifloraceae

## INTRODUÇÃO

São encontradas no Brasil aproximadamente 120 espécies desse gênero, o que permite que o país seja considerado um dos principais centros de diversidade de *Passiflora*, juntamente com a Colômbia, Equador e Peru (FALEIRO et al., 2005; PEREIRA et al., 2015). Algumas espécies apresentam potencial para serem usadas no melhoramento genético das espécies comerciais por possuírem características morfoagronômicas como longevidade, melhor adaptação às condições adversas, extensos períodos de floração, androginóforos mais curtos, uma maior concentração de componentes químicos de interesse medicinal, assim como resistência a doenças e pragas (MELETTI et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2006).

Devido a essas características de interesse agrônomo das espécies silvestres para o melhoramento das cultivares comerciais do gênero *Passiflora*, instituições de pesquisa de diferentes países vem desenvolvendo trabalhos com o objetivo de caracterizar e avaliar essas espécies para melhor direcionar seu uso. Por outro lado, devido à importância desse recurso genético, o desenvolvimento de estratégias de conservação também tem sido objeto de vários estudos buscando abordagens eficientes (CERQUEIRA-SILVA et al., 2016; PÉREZ; D'ECKENBRUGGE, 2017).

Uma técnica eficiente e que pode ser uma alternativa para a conservação de sementes de espécies do gênero *Passiflora* é a criopreservação ou criogenia que consiste em armazenar o material vegetal a temperaturas ultrabaixas em nitrogênio líquido (-150°C a -196°C), reduzindo substancialmente o metabolismo celular, os processos bioquímicos e a deterioração biológica.

Entretanto, para a obtenção de resultados eficientes no uso dessa técnica é necessário estabelecer um grau de umidade adequado, já que a água que está dentro da célula quando submetida a baixas temperaturas pode se expandir formando cristais de gelo e assim romper a compartimentalização celular, causando danos irreparáveis. Sendo assim, um dos passos determinantes na criopreservação de sementes é a desidratação do material vegetal a ser congelado a fim de garantir a integridade celular após o congelamento.

Já existem relatos de criopreservação com sementes de espécies do gênero *Passiflora* (MELETTI et al., 2007; VEIGA-BARBOSA et al., 2013), mas o grande número de espécies e a grande variabilidade existente em relação às várias

estratégias de conservação deixa evidente a necessidade de se ampliar esses estudos para as espécies silvestres da cultura consideradas repositórios de genes importantes para o melhoramento das espécies cultivadas.

Em vista disso, esse trabalho busca ajustar um protocolo de criopreservação para espécies que apresentam comportamento variado em relação a sua tolerância à dessecação. Por outro lado, para que um protocolo seja recomendado se faz necessário que a avaliação do trabalho que o gerou seja eficiente o suficiente para a corroboração dos resultados obtidos e as ferramentas estatísticas usadas, de forma geral, exploram pouco os resultados alcançados.

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo desenvolver uma estratégia de criopreservação de sementes de espécies de maracujazeiro, como também gerar informações relevantes sobre a germinação das mesmas após o congelamento. Adicionalmente, buscou-se discutir e avaliar as ferramentas estatísticas utilizadas e o uso da análise de componentes principais para entender a importância e a relação das variáveis entre si e qual das espécies apresentam comportamento semelhante em função do ambiente de germinação utilizado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Frutos maduros de *Passiflora coccinea* Aubl., *Passiflora edulis* Sims, *Passiflora gibertii* N.E.Br., *Passiflora maliformis* L., *Passiflora morifolia* Mast., *Passiflora setacea* DC., *Passiflora suberosa* L. e *Passiflora tenuifila* Killip foram coletados no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil (12° 40 12 S, 39° 06 07 W, 220 m).

Os experimentos de germinação das sementes e de emergência de plântulas foram realizados em câmara de germinação e em casa de vegetação, respectivamente.

### **Dessecação e determinação do grau de umidade das sementes**

Para os experimentos realizados foram considerados dois procedimentos para a obtenção do grau de umidade da semente:

- a) Em bancada (sementes não dessecadas): os frutos foram seccionados transversalmente e o arilo removido manualmente por meio de fricção em

peneira de malha fina e em tecido de algodão. Em seguida, as sementes foram secas em bancada à sombra sobre papel por 24 horas com temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , obtendo-se o primeiro valor do grau de umidade;

- b) Dessecador: o segundo valor do grau de umidade foi obtido quando um lote de sementes igual foi colocado em dessecador contendo 500 g de sílica gel por 24 horas.

O grau de umidade das sementes foi estimado a partir de três amostras de 10 sementes cada pelo método de estufa a  $105^\circ\text{C}$ , conforme as recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

A fórmula utilizada foi:

$$\text{Grau de Umidade (\%)} = \frac{100(P - p)}{P - t}$$

Em que:

P = peso inicial (g)

p = peso final (g)

t = peso da tara do recipiente (g)

### **Criopreservação**

Sementes de cada espécie (210 sementes/espécie), dessecadas em sílica gel e as não dessecadas, foram colocadas em criotubos de 1,5 ml e imersas diretamente no nitrogênio líquido (NL+). Após sete dias de acondicionamento no nitrogênio líquido a  $-196^\circ\text{C}$ , as amostras foram descongeladas naturalmente em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por uma hora em bancada no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Sementes dessecadas e não dessecadas e mantidas por sete dias em geladeira, foram usadas como controles (Figura 1).

### **Germinação de sementes**

A semeadura foi realizada em caixas de acrílico (“Gerbox”) transparentes (11x11 cm) desinfestadas previamente em álcool 70% contendo duas folhas de papel mata-borrão (esterilizado previamente em estufa a  $105 \pm 3^\circ\text{C}$  por 2 horas) foram umidificadas com água deionizada em quantidade igual à massa do papel seco multiplicada por 2,5. Em seguida, foram colocados em câmara de germinação com temperatura alternada de  $20^\circ\text{C}/30^\circ\text{C}$ , durante 16-8 horas, respectivamente, e no

escuro. As avaliações foram diárias, a partir da semeadura até o início da germinação, com novas avaliações a cada dois dias, até a estabilização da germinação.

Foram consideradas germinadas as sementes que apresentavam emissão da radícula com 2mm. Delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições de 25 sementes por caixa Gerbox.

### **Emergência de plântulas**

A semeadura foi realizada na casa de vegetação em tubetes de 280 cm<sup>3</sup> contendo substrato vegetal comercial. As avaliações foram diárias, a partir da semeadura até o início da emergência, com novas avaliações a cada dois dias, até a estabilização da emergência. Foram consideradas emergidas as plântulas com cotilédones acima do nível do substrato.

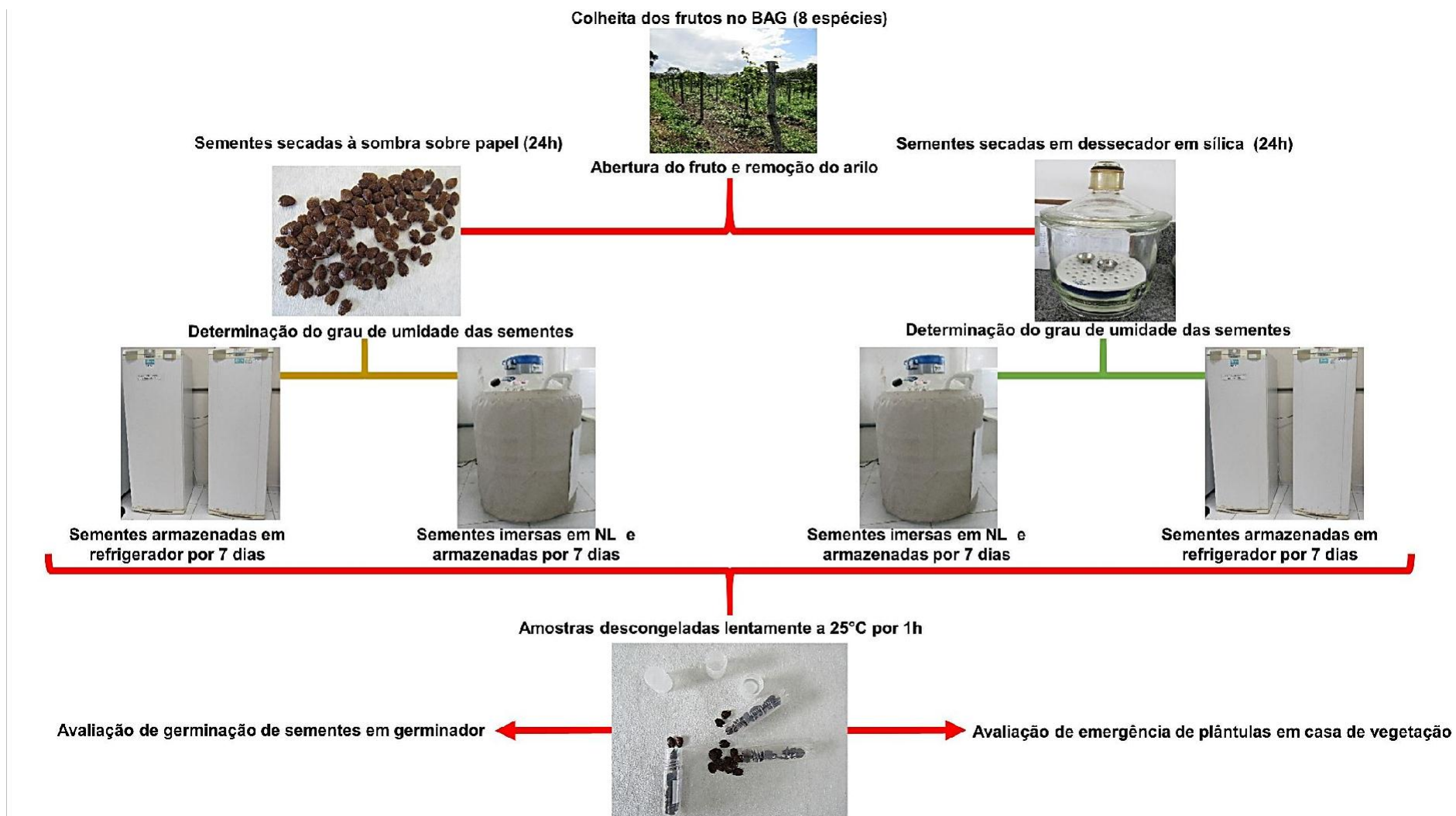
Após o procedimento do congelamento, descongelamento e emergência de plântulas, foi realizado o acompanhamento do desenvolvimento das plantas proveniente da criopreservação em casa de vegetação. Delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições de 25 sementes por parcela.

### **Delineamento experimental e Análise Estatística**

Inicialmente se utilizou o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 8 x 2 x 2 x 2, sendo o primeiro fator formado pelas espécies, o segundo fator pelo grau de umidade das sementes (dessecadas em sílica gel e não dessecadas), o terceiro pela temperatura de armazenamento (refrigerador e criopreservação) e o quarto pelo ambiente de semeadura (germinador e casa de vegetação), totalizando 64 tratamentos com 4 repetições de 25 sementes por parcela para cada espécie de *Passiflora* avaliada.

No entanto esse tipo de experimento dificultou a interpretação dos resultados pelo grande número de interações que foi gerado. Com isso foi feito o experimento fatorial triplo separado para cada espécie sendo o primeiro fator constituído pelo grau de umidade das sementes (dessecadas em sílica gel e não dessecadas), o segundo pela temperatura de armazenamento (refrigerador e criopreservação) e o terceiro pelo ambiente de semeadura (germinador e casa de vegetação), totalizando 8 tratamentos.





**Figura 1.** Figura esquemática da sequência metodológica desde a colheita dos frutos até as avaliações realizadas, considerando sementes dessecadas e não dessecadas.

Para avaliar a germinação das espécies, foram calculadas as seguintes medidas: a) Germinabilidade ( $\bar{G}$  %) ou porcentagem de germinação (LABOURIAU, 1983); b) Tempo médio de germinação ( $\bar{t}$  (dias)), calculado pela expressão proposta por Labouriau (1983); c) Velocidade média de germinação ( $\bar{v}$  (plântulas dia<sup>-1</sup>)) (LABOURIAU, 1970); d) Incerteza ( $I$  (bit)), proposta por Labouriau e Valadares (1976); e) Sincronia de germinação ( $Z$  (bit)) (RANAL; SANTANA, 2006). Essas mesmas medidas também foram calculadas para a emergência de plântulas.

Os dados de germinação de sementes e de emergência de plântulas foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade, e quando necessário os dados foram transformados para atingir as pressuposições da análise de variância. As médias dos tratamentos foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de significância.

Foi realizada análise multivariada pelo método dos Componentes Principais para avaliar a relação entre as variáveis estudadas e qual dessas contribuíam de forma eficiente para a variação total disponível entre as espécies.

As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2017) e software SAS® (Statistical Analysis System) (SAS, 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode-se observar na Tabela 1, que a espécie *P. suberosa* apresentou os graus de umidade mais elevados, tanto sem dessecar (10,8%), igual a *P. gibertii* (10,8%), quanto nas condições de dessecador (7,1%). Os menores valores encontrados em sementes sem dessecar foram registrados para *P. coccinea* (7,6%) seguido de *P. edulis* (8,1%), *P. setacea* (8,3%) e *P. maliformis* (8,5%).

A determinação do grau de umidade das sementes é de fundamental importância para a identificação da qualidade fisiológica ideal para a colheita, conservação ou comercialização (BARBEDO et al., 1998; SARMENTO et al., 2015), pois a água, quando no período de formação e maturação da semente, atua inicialmente na expansão e divisão celular e, posteriormente, como difusor para os produtos fotossintéticos que auxiliaram na composição dos tecidos da semente ou serão armazenados para futura utilização nas fases iniciais da germinação.

Para as sementes das diferentes espécies de *Passiflora* e com vistas à criopreservação, o grau de umidade da semente a ser congelada deve ser baixo o

suficiente para evitar os danos físicos pela formação de cristais, mas precisa garantir a posterior germinação pós-congelamento. Os resultados obtidos nas duas condições avaliadas neste trabalho, sementes dessecadas e sementes não dessecadas, mostraram diferenças significativas entre as duas condições, onde o uso da sílica foi capaz de promover uma retirada de água muito maior das sementes para todas as espécies avaliadas. Essa redução no grau de umidade variou em torno dos 40% a quase 70% a depender da espécie.

**Tabela 1.** Grau de umidade das sementes de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) submetidas à dessecação em sílica gel.

Espécie	Grau de umidade das sementes (%)	
	Não dessecadas	Dessecadas
<i>P. coccinea</i>	7,6 ± 0,15d	3,4 ± 0,40d
<i>P. edulis</i>	8,1 ± 0,08c	3,6 ± 0,08d
<i>P. gibertii</i>	10,8 ± 0,1a	6,4 ± 1,19b
<i>P. maliformis</i>	8,5 ± 0,20c	4,8 ± 0,15c
<i>P. morifolia</i>	10,7 ± 0,44b	5,4 ± 0,18c
<i>P. setacea</i>	8,3 ± 0,13c	3,9 ± 0,40d
<i>P. suberosa</i>	10,8 ± 0,17a	7,1 ± 0,38a
<i>P. tenuifila</i>	9,8 ± 0,12b	6,0 ± 0,14b

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de significância.

As espécies que apresentaram os graus de umidade mais baixos quando dessecadas por 24 h foram *P. coccinea* (3,4%), *P. edulis* (3,6%) e *P. setacea* (3,9%), e os maiores valores foram para *P. suberosa* (7,1%), seguida de *P. gibertii* (6,4%) e de *P. tenuifila* (6,0%). As sementes que foram dessecadas apresentaram menor grau de umidade quando comparadas com as não dessecadas.

Na Tabela 2 encontram-se as porcentagens de sobrevivência de sementes dessecadas e não dessecadas, nas duas formas de conservação avaliadas, a criopreservação e o refrigerador.

**Tabela 2.** Taxa de sobrevivência de sementes de maracujá (*Passiflora* spp.) submetidas a diferentes graus de umidade (dessecadas e não dessecadas) e temperaturas (criopreservação e refrigerador).

Espécies	Criopreservação		Refrigerador	
	Dessecada	Não dessecada	Dessecada	Não dessecada
<i>P. coccinea</i>	71 cA	72 bA	67 bA	67 bA
<i>P. edulis</i>	99 aA	95 aA	93 aA	94 aA
<i>P. gibertii</i>	95,5 aA	95,5 aA	98 aA	93 aA
<i>P. maliformis</i>	82,5 bA	77 bA	91 aA	88 aA
<i>P. morifolia</i>	81 bA	91 aA	76 bA	81 bA
<i>P. setacea</i>	80 bA	90 aA	90 aA	91 aA
<i>P. suberosa</i>	90,5 aA	97 aA	98 aA	97 aA
<i>P. tenuifila</i>	44 dB	79 bA	51 cB	77 bA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, para cada temperatura, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de significância.

Com exceção de *P. tenuifila*, que tolerou menos a dessecação, os graus de umidade das sementes para as espécies de maracujazeiro desse trabalho não afetaram o desempenho fisiológico das sementes após a criopreservação ou a conservação em refrigerador. Essa mesma espécie apresentou porcentagens de germinação/emergência mais baixas, tanto para criopreservação quanto para refrigerador, indicando a necessidade de ajustes para melhorar seu desempenho, considerando essas formas de conservação.

Todas as espécies suportaram bem o congelamento, deixando evidente com esses resultados, que a criopreservação é uma alternativa viável de conservação a longo prazo para elas. As melhores taxas de sobrevivência foram registradas para *P. edulis*, *P. gibertii* e *P. suberosa*.

Apesar dos resultados sugerirem que ambos os métodos são recomendados para essas espécies é preciso considerar que a criopreservação promove a parada quase total do metabolismo e por isso é considerada uma estratégia de conservação a longo prazo. O tempo de 7 dias estabelecido neste trabalho não é suficiente para permitir uma comparação entre as duas condições de conservação propostas, mas os resultados podem ser considerados promissores para a criopreservação, já que esse tempo estabelecido é suficiente para a obtenção do congelamento total dos tecidos.

## **Ensaio de germinação e de emergência das sementes criopreservadas**

Entender o comportamento dessas sementes após a criopreservação é relevante e gera informações importantes para os ensaios de regeneração, uma etapa fundamental na conservação de sementes, independente da estratégia a ser utilizada, além de gerar subsídios para melhorias no protocolo utilizado.

Inicialmente, realizou-se uma ANOVA preliminar para verificar a influência dos fatores avaliados a seguir: espécies, grau de umidade (sementes dessecadas e sementes não dessecadas), ambiente de semeadura (germinador e casa de vegetação) e temperatura de armazenamento (criopreservação e refrigerador) como também a existência de interação entre os mesmos (APÊNDICE A).

Pela análise de variância foi observado que os fatores isolados e suas interações apresentaram significância para a variável porcentagem de germinação. Notou-se interação significativa para os fatores espécies\*grau de umidade, espécies\*ambiente de semeadura e espécies\*temperatura de armazenamento, mostrando que as espécies de maracujazeiro estudadas nesse trabalho sofreram influência na germinação/emergência em função do grau de umidade das sementes, ambiente de semeadura e da temperatura de armazenamento em que foram acondicionadas. Por outro lado, notou-se interação tripla significativa apenas para espécies\*grau de umidade\*ambiente e interação quadrupla para espécies\*grau de umidade\*ambiente\*temperatura.

A constatação de que essas interações são significativas deixa evidente a relação de dependência entre os fatores, o que é uma informação de maior interesse do que a análise de um fator por vez, pois mostra a influência dessa relação sobre a variável que está sendo avaliada. No entanto, essas interações, quando tratamos de eventos biológicos e quando considera o desdobramento de três ou mais fatores, são de extrema complexidade e quase impossíveis de serem explicadas. Assim que, o detalhamento dessa interação com a finalidade de gerar informações aplicadas quase nunca é possível, principalmente na biologia celular.

Na análise fatorial os tratamentos são constituídos por todas as combinações entre os níveis dos fatores, e com isso tem-se um grande número de tratamento o que torna a análise mais trabalhosa. À medida que aumenta o número de níveis de cada fator aumenta também a dificuldade de interpretar os resultados.

Sendo assim, realizou-se uma ANOVA separada para cada espécie diminuindo o número de fatores e facilitando a interpretação e análise dos dados neste trabalho (APÊNDICE B).

A partir dessa análise e considerando as variáveis medidas, foi possível ver quais fatores influenciaram mais cada variável em cada uma das espécies estudadas, gerando informações importantes e aplicadas para o desenvolvimento do protocolo que se busca neste trabalho.

De uma forma geral o ambiente de semeadura (germinador ou casa de vegetação) foi o fator que mais influenciou as variáveis nas espécies, seguido da temperatura e em escala ainda menor pelo grau de umidade. Poucos casos de interação entre ambiente\*temperatura ou ambiente\*grau de umidade foram registrados.

Para a porcentagem de germinação ( $\bar{G}$  %) o ambiente foi significativo para *P. coccinea*, *P. gibertii*, *P. setacea*, *P. morifolia*, *P. suberosa* e *P. tenuifila*. O grau de umidade, ou seja, a semente estar dessecada ou não só foi significativo para a variável germinação em *P. tenuifila*.

O tempo médio de germinação ( $\bar{t}$ ) foi igualmente influenciado pelo ambiente nas mesmas espécies mencionadas acima e ainda para *P. edulis*. A temperatura influenciou para *P. suberosa* e *P. tenuifila*. A única interação detectada para essa variável foi entre o grau de umidade e ambiente em *P. tenuifila*. O tempo médio é calculado como a média ponderada de germinação, utilizando-se como pesos de ponderação o número de sementes germinadas nos intervalos de tempo estabelecido. Essa variável é importante, uma vez que se tem ideia do intervalo de tempo, após a instalação do experimento, em que se obteve o número máximo de sementes germinadas ou de plântulas emergidas. Corresponde à média necessária para um conjunto de sementes germinarem (RANAL et al., 2006).

A velocidade média de germinação ( $\bar{v}$ ) foi influenciada pelo ambiente em todas as espécies estudadas, pelo grau de umidade em *P. gibertii* e pela temperatura em *P. tenuifila*. Para essa variável a interação entre grau de umidade e ambiente foi registrada para *P. gibertii*, *P. setacea* e *P. tenuifila*.

A velocidade média de germinação que é um coeficiente que mensura a quantidade de sementes germinadas em um determinado tempo, uma vez que é o recíproco do tempo médio de germinação (CZABATOR, 1992), indica que quanto maior o tempo médio de germinação menor será o valor da velocidade média. De

acordo com Santana e Ranal (2000), tempo médio e a velocidade média são duas grandezas inversamente proporcionais.

No que se refere à incerteza ( $I$ ) e à sincronia ( $z$ ) o ambiente influenciou *P. coccinea*, *P. edulis*, *P. maliformis*, *P. morifolia*, *P. suberosa* e *P. tenuifila*. A temperatura foi significativa para a variável incerteza em *P. tenuifila* e influenciou a sincronia em *P. suberosa*. Considerando que a concentração máxima da germinação no tempo ocorreria quando ( $I$ ) for igual ou próximo de zero, as espécies *P. coccinea*, *P. maliformis* e *P. tenuifila* apresentaram elevados valores para a essa variável ( $1,103 \leq I \leq 2,368$  bits), mostrando que nessa escala de grandeza, a frequência de germinação foi baixa num mesmo intervalo de tempo, podendo-se inferir que o processo é assíncrono.

A incerteza depende da amplitude de variação do tempo entre a primeira e a última germinação ou emergência, quanto maior a amplitude de tempo necessária para que o processo ocorra, mais baixos serão os valores de frequência relativa de germinação ou emergência em cada observação e maior será o valor de ( $I$ ), indicando o espalhamento do processo no tempo e a menor chance de sincronia.

Esses resultados nos permitem fazer uma avaliação por espécie, identificando o que cada uma delas demanda para ser conservada, seja em condições de refrigerador ou em criopreservação.

O índice de sincronia avalia o grau de sobreposição de germinação/emergência entre indivíduos de uma população mostrando o quanto duas ou mais sementes germinam ao mesmo tempo, considerando valores próximos de 1 (sincrônico) e valores próximos de 0 assincrônico (RANAL et al., 2006). O valor da medida de sincronia só é produzido quando a germinação de sementes ou a emergência de plântulas são simultâneas. Valores baixos e mais próximos de zero, indicam falta de sobreposição da germinação das sementes e emergência de plântulas no tempo, ou seja, mostra assincronia dos processos.

As espécies que apresentaram alta sincronia em germinador foi *P. edulis* (1,000) e *P. suberosa* (0,686) evidenciando homogeneidade na germinação (Tabela 3). As espécies *P. coccinea* e *P. maliformis* tiveram baixa sincronia em casa de vegetação com valores  $Z= 0,041$ ,  $Z= 0,235$ , respectivamente.

Como mencionado acima, o fator ambiente foi o que mais influenciou os resultados e ficou evidente que o germinador promoveu os melhores resultados para todas as variáveis e em todas as espécies (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores médios de germinação ( $\bar{G}\%$ ), tempo médio ( $\bar{t}$ ), velocidade média ( $\bar{v}$ ), incerteza ( $I$ ) e sincronia ( $z$ ) para sementes de espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) em dois Ambientes (Germinador e Casa de Vegetação).

Variáveis	Ambientes	
	Germinador	Casa de Vegetação
<i>P. coccinea</i>		
$\bar{G}\%$	72,250 a	64,000 b
$\bar{t}$ (dias)	20,537 a	30,002 b
$\bar{v}$ (plântulas dia <sup>-1</sup> )	0,050 a	0,033 b
$I$	1,451 a	2,368 b
$z$	0,377 a	0,041 b
<i>P. edulis</i>		
$t$ (dias)	7,017 a	16,241 b
$\bar{v}$ (plântulas dia <sup>-1</sup> )	0,142 a	0,062 b
$I$	0,000 a	1,208 b
$z$	1,000 a	0,479 b
<i>P. maliformis</i>		
$\bar{v}$ (plântulas dia <sup>-1</sup> )	0,078 a	0,065 b
$I$	1,103 a	1,752 b
$z$	0,453 a	0,235 b
<i>P. suberosa</i>		
$G\%$	96,500 a	92,000 b
$\bar{t}$ (dias)	8,390 a	18,188 b
$\bar{v}$ (plântulas dia <sup>-1</sup> )	0,120 a	0,055 b
$I$	0,592 a	1,988 b
$z$	0,686 a	0,243 b

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de significância.  $\bar{G}\%$ : germinação de sementes;  $\bar{t}$ : tempo médio de germinação;  $\bar{v}$ : velocidade média de germinação;  $I$ : incerteza;  $Z$ : sincronia.

Entretanto é preciso avaliar melhor qual a implicação prática desse fator. O ambiente se refere ao que foi utilizado para germinar/emergir as sementes após terem sido submetidas, ou ao refrigerador (4°C) ou à criopreservação (-196°C), que se constituiu ou em uso de germinador, quando se mediu a porcentagem de germinação ou casa de vegetação, quando se mediu a emergência de plântulas.

A germinação em condições de germinador tem uma aplicação prática em ensaios experimentais, o que é relevante quando se pensa em estudos sobre o comportamento germinativo de espécies vegetais. Entretanto, o que vai ser o



indicativo da sobrevivência é a emergência em casa de vegetação, que simula de forma mais próxima ao real, as possibilidades germinativas da espécie após o procedimento de conservação.

Entre a criopreservação e a conservação no refrigerador (Tabela 4), os resultados mostraram que para a maioria das espécies não há diferença, ainda que para *P. suberosa*, a porcentagem de germinação, tempo médio e a sincronia obtiveram os melhores resultados no refrigerador, enquanto para *P. tenuifila* o tempo de germinação, a velocidade média e a incerteza apresentaram resultados superiores nas sementes criopreservadas. Entretanto esses resultados precisam ser avaliados considerando o tempo em que as sementes foram mantidas em refrigerador, que foi de apenas 7 dias.

**Tabela 4.** Valores médios de germinação ( $\bar{G}\%$ ), tempo médio ( $\bar{t}$ ), velocidade média ( $\bar{v}$ ), incerteza ( $I$ ) e sincronia ( $Z$ ) para sementes de espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) em diferentes temperaturas (Criopreservação e Refrigerador).

Variáveis	Temperaturas	
	Criopreservação	Refrigerador
	<i>P. suberosa</i>	
$\bar{G}\%$	92,500 b	96,000 a
$\bar{t}$ (dias)	13,750 b	12,828 a
Z	0,399 b	0,529 a
	<i>P. tenuifila</i>	
$t$ (dias)	25,969 a	31,665 b
$\bar{v}$ (plântulas dia <sup>-1</sup> )	0,044 a	0,036 b
$I$	1,533 a	2,043 b

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de significância.  $\bar{G}\%$ : germinação de sementes;  $\bar{t}$ : tempo médio de germinação;  $\bar{v}$ : velocidade média de germinação;  $I$ : incerteza;  $Z$ : sincronia.

Por outro lado, quando se avalia o efeito do grau de umidade para o comportamento dessas espécies após a conservação em refrigerador ou nitrogênio líquido (NL+) se tem uma informação de extrema relevância e que pode facilitar de forma significativa o protocolo de criopreservação. Os resultados apresentados aqui deixam evidente que não há necessidade de dessecação das espécies avaliadas, ainda que uma interação entre o grau de umidade e a temperatura foi observada para *P. edulis*, mas que indicou apenas que as sementes desseccadas tiveram um

desempenho menor no refrigerador, ainda que inexpressivo, já que foi acima de 90% (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores médios de germinação ( $\bar{G}$  %) de sementes de *P. edulis* em função do grau de umidade e temperatura.

Temperatura	Grau de umidade	
	Dessecada	Não dessecada
Criopreservação	99,0000 aA	93,5000 aB
Refrigerador	92,0000 bA	96,0000 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de significância.

Analisando a interação entre o grau de umidade e ambiente de semeadura na espécie *P. morifolia* para a variável germinação (Tabela 6), observou-se que as sementes dessecadas e em ambiente de casa de vegetação ( $\bar{G}$  %= 91,00) mostraram-se superiores às que vieram do ambiente germinador ( $\bar{G}$  %= 72,50). Por outro lado, não há diferença entre sementes não dessecadas quando comparadas nos dois ambientes de semeadura.

**Tabela 6.** Valores médios de germinação ( $\bar{G}$  %) de sementes de *P. morifolia* em função do grau de umidade e ambiente.

Ambiente	Grau de umidade	
	Dessecada	Não dessecada
Germinador	72,5000 bB	86,0000 aA
Casa de vegetação	91,0000 aA	88,5000 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de significância.

Considerando ainda a interação entre ambiente de semeadura e temperatura em *P. setacea*, não houve diferença estatística no germinador entre as duas temperaturas (Tabela 7). Já em casa de vegetação, as sementes em refrigerador obtiveram maiores valores de germinação do que as criopreservadas.

**Tabela 7.** Valores médios de germinação ( $\bar{G}$  %) de sementes de *P. setacea* em função de ambiente e temperatura.

Temperatura	Ambiente	
	Germinador	Casa de vegetação
Criopreservação	91,0000 aA	65,0000 bB

Refrigerador	90,5000 aA	76,0000 aB
Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de significância.		

Outra interação observada foi para a variável velocidade média de germinação entre os fatores grau de umidade\*ambiente para as espécies *P. gibertii*, *P. setacea* e *P. tenuifila* (Tabela 8). Observou-se para as sementes dessas três espécies, quando dessecadas, que o ambiente germinador mostrou os melhores valores quando comparadas com o ambiente de casa de vegetação. Para as sementes não dessecadas, do mesmo modo que as dessecadas, o ambiente germinador foi superior à casa de vegetação.

Para as sementes de *P. gibertii*, o ambiente germinador propiciou maior velocidade na germinação quando as sementes eram dessecadas ( $\bar{v} = 0,1026$ ). Contudo, em casa de vegetação não houve diferença estatística para o grau de umidade das sementes. Para as sementes da espécie *P. setacea* quando não dessecadas e em ambiente germinador, demonstrou as maiores velocidades de germinação ( $\bar{v} = 0,1034$ ) quando comparadas com as dessecadas ( $\bar{v} = 0,0925$ ). Em casa de vegetação não houve diferença estatística entre as sementes dessecadas e não dessecadas.

Por outro lado, a espécie *P. tenuifila* não demonstrou diferenças significativas para o grau de umidade em ambiente germinador, mas divergiram quando comparadas em casa de vegetação (Tabela 8).

**Tabela 8.** Valores médios de velocidade de germinação ( $\bar{v}$ ) para sementes de *P. gibertii*, *P. setacea* e *P. tenuifila* em função do grau de umidade e ambiente.

Ambiente	Grau de umidade	
	Dessecada	Não dessecada
<i>P. gibertii</i>		
Germinador	0,1026 aA	0,0808 aB
Casa de vegetação	0,0701 bA	0,0675 bA
<i>P. setacea</i>		
Germinador	0,0925 aB	0,1034 aA
Casa de vegetação	0,0337 bA	0,0333 bA
<i>P. tenuifila</i>		
Germinador	0,0517 aA	0,0543 aA
Casa de vegetação	0,0310 bA	0,0242 bB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, para cada espécie, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de significância.

Trabalhos realizados com espécies da família Passifloraceae analisaram algumas das variáveis abordadas aqui. Meletti et al. (2007) trabalhando com criopreservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro, praticamente não observou germinação aos sete dias após a semeadura para sementes de *P. edulis* dessecadas ou não, contrastando com os resultados obtidos neste trabalho, no qual essa espécie teve uma elevada germinação aos sete dias. Provavelmente essa diferença nos resultados deve-se às diferenças nas condições usadas no germinador, pois esses autores não especificaram quais foram essas condições. Esses autores obtiveram taxas de germinação que variaram de 44,2 a 100% com um grau de umidade de 20% para diferentes genótipos de *P. edulis* quando acondicionados em nitrogênio líquido por 10 dias e posteriormente avaliadas em germinador. Por outro lado, a emergência em viveiro para as sementes criopreservadas variaram de 12,3 a 16,6% para os diferentes genótipos de *P. edulis*.

Cardoso (2009), afirma que estudos da dependência térmica da germinação como também da ação de fatores ambientais, como luz e água, têm mostrado que em condições desfavoráveis a distribuição da germinação ao longo do tempo pode provocar desuniformidade, induzindo a germinação mais aleatória e menos sincronizada.

A determinação das condições adequadas à germinação de determinada espécie é importante devido à divergência de respostas que as sementes podem apresentar em detrimento do volume de água, luz, temperatura e oxigênio (PAIVA et al., 2017). Por isso, o conhecimento das condições ideais para a germinação é importante na padronização dos testes em diferentes laboratórios, evitando discrepâncias entre os resultados (MARCOS FILHO, 2015) e, como já comentado anteriormente, a importância dos resultados encontrados em condições de germinador nesse trabalho.

A dessecação das sementes não gerou efeitos negativos na qualidade fisiológica, já que se verificou alta germinabilidade das mesmas mesmo após a criopreservação. Para as espécies avaliadas, observou-se tolerância à dessecação, tendo uma alta germinabilidade mesmo quando a umidade foi reduzida para 3,4% (Tabela 1).

Martins et al. (2009) estudando a conservação de sementes de ipê-roxo em nitrogênio líquido observou que as sementes dessecadas a valores de grau de umidade de 12,5%, 8,4% e 4,2% mantiveram seu desempenho fisiológico após serem

imersas em nitrogênio líquido por 120, 240 e 360 dias. No entanto, sementes dessecadas a valores de grau de umidade de 18,3% provocou um declínio na germinação, indicando ação prejudicial à conservação das sementes.

Chandel et al. (1995), trabalhando com a dessecação e a sensibilidade ao congelamento de sementes das espécies *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, *Theobroma cacao* L. *Artocarpus heterophyllus* Lamk, afirmam que ocorre um decréscimo do percentual germinativo após a criopreservação devido à sensibilidade de algumas sementes ao frio, caracterizado por injúrias durante o período de armazenamento. Esse decréscimo não foi observado nesse trabalho com as espécies avaliadas. Para algumas espécies a taxa de germinação foi aumentada devido ao processo de dessecação e criopreservação das sementes (Tabela 5).

Houve interação significativa dos fatores grau de umidade\*ambiente para a variável tempo médio de germinação em *P. tenuifila*. Observou-se que as sementes dessecadas necessitaram de menos tempo para germinar ( $\bar{t} = 20$  dias) que em casa de vegetação ( $\bar{t} = 33$  dias) (Tabela 9). Do mesmo modo, as sementes não dessecadas germinaram com menos tempo ( $\bar{t} = 18$  dias) que em casa de vegetação ( $\bar{t} = 42$  dias).

**Tabela 9.** Valores médios de tempo médio de germinação ( $\bar{t}$ ) para as sementes de *P. tenuifila* em função do grau de umidade e ambiente.

Ambiente	Grau de umidade	
	Dessecada	Não dessecada
Germinador	20,0610 aA	18,7378 aA
Casa de vegetação	33,5872 bA	42,8848 bB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, para cada espécie, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de F a 5% de significância.

Finalmente, apesar das relevantes informações que foram obtidas por meio da análise de variância realizada por espécie, os resultados obtidos não foram suficientes para mostrar o comportamento de similaridade entre as espécies, como também não foi possível mostrar a relação entre as variáveis estudadas. Com base nisso, realizou-se uma análise multivariada para verificar a relação entre as espécies e as variáveis e quais variáveis são realmente relevantes nesse estudo.

### **Análise de Componentes Principais**

Como forma de complementar as análises que já foram realizadas, utilizou-se um estudo dos componentes principais, que foi avaliado pela porcentagem de

variância total explicada pelos componentes (MUNIZ et al., 2014) com o intuito de entender as relações entre as variáveis e as espécies dentro dos fatores.

As espécies foram distribuídas ao longo dos eixos dos componentes principais, sendo que quanto mais próxima as espécies das variáveis, maior é a relação existente entre elas. Ao passo que as espécies mais distantes das variáveis são as mais divergentes.

O componente principal 1 (PC1) está representado pelo eixo das abscissas e com isso as variáveis que se localizam na parte positiva do eixo são as mais associadas ao primeiro componente, isto é, são as variáveis que apresentam coordenada positiva em relação ao eixo das abscissas, enquanto as variáveis localizadas na parte negativa são as menos associadas a esse componente.

Na Figura 2A é possível observar, por meio do *biplot*, que os componentes PC1 (88,1%) e PC2 (9,93%) explicam 98,03% da variação dos dados para as sementes dessecadas, sendo as variáveis que mais contribuíram foram velocidade média, tempo médio e sincronia com 22,25, 21,19 e 20,2%, respectivamente. Já para as sementes não dessecadas (Figura 2B), os componentes PC1 (85,43%) e PC2 (12,35%) conseguiram explicar 97,78% da variação total dos dados, e as variáveis que mais conseguiram contribuir foram velocidade média, porcentagem de germinação e tempo médio com 21,89, 20,66 e 19,82%, respectivamente.

Cruz e Regazzi (1994) explicitam que em estudos dessa natureza, é desejável que a variância acumulada nos dois primeiros componentes principais exceda os 70 a 80%, o que foi observado nesse trabalho e mostra que nessa condição, a distorção das coordenadas no gráfico (Figuras 2, 3 e 4), cujos eixos são os componentes principais, foi considerada aceitável e as inferências no estudo podem ser consideradas satisfatórias (CRUZ; REGAZZI, 1994).

Observou-se que os vetores das variáveis porcentagem, velocidade média e sincronia apresentaram mesmo sentido, indicando que essas variáveis estão correlacionadas positivamente. Por outro lado, as variáveis incerteza e tempo médio apresentaram sentido contrário a essas variáveis, mostrando que são inversamente proporcionais a elas para todos os fatores analisados (Figuras 2, 3, 4). Assim, infere-se que à medida que a germinação apresenta maior sincronia, a incerteza tende a diminuir, assim como, quanto maior a velocidade de germinação, menor será o tempo médio para as sementes germinarem.

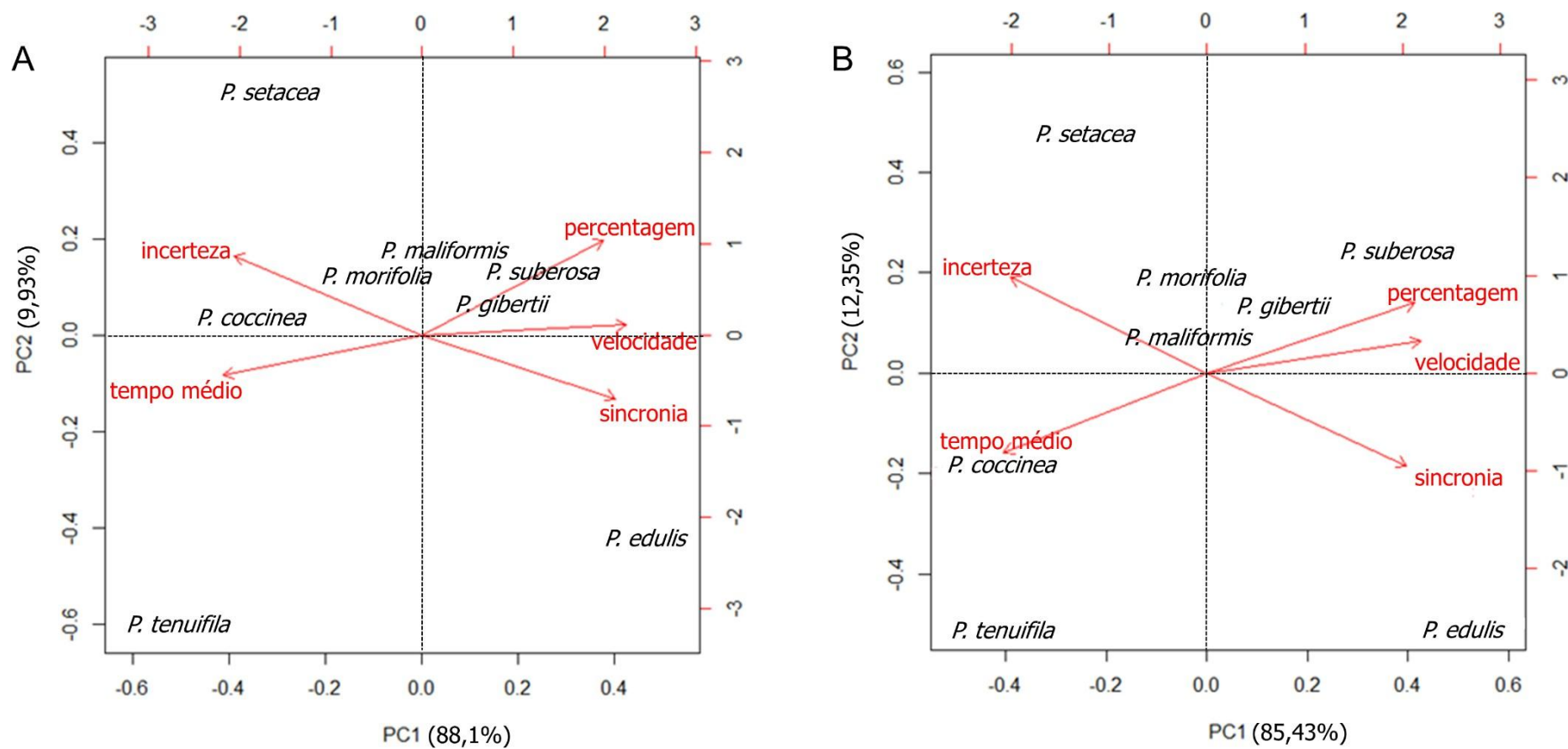
Considerando a temperatura de conservação, a variação total nos dois primeiros componentes principais para criopreservação (Figura 3A) explicam 97,17%, sendo que para o PC1 a variação foi de 84,28% e para o PC2 foi de 12,89%. As variáveis que mais contribuíram para essa variação foram velocidade média, tempo médio e sincronia contribuindo com 22,38, 21,19 e 19,24%, respectivamente. Por outro lado, a contribuição da temperatura do refrigerador para a variação dos dados nos dois primeiros componentes principais foi de 98,64%, onde o PC1 e PC2 contribuíram com 89,42 e 9,22%, respectivamente. As variáveis que tiveram uma maior contribuição para essa variabilidade dos dados foram as mesmas que em criopreservação (velocidade média, tempo médio e sincronia) contribuindo com 21,82, 20,19 e 19,87%, respectivamente.

Na Figura 4A encontra-se a análise de componentes principais para o fator ambiente de semeadura, onde a análise mostrou que o PC1 e PC2, no total, corresponderam a aproximadamente 96,99% da variação dos dados, com contribuições de 76,4 e 20,59%, respectivamente para ambiente germinador. As variáveis que mais contribuíram novamente foram velocidade média, tempo médio e sincronia com 24,86, 21,54, 18,98%, respectivamente.

Para casa de vegetação (Figura 4B) o PC1 (87,25%) e PC2 (11,05%) conseguiram explicar 98,3% da variação total dos dados, sendo as variáveis que mais contribuíram foram velocidade média (21,37%), tempo médio (21,30%) e incerteza (20,22%).

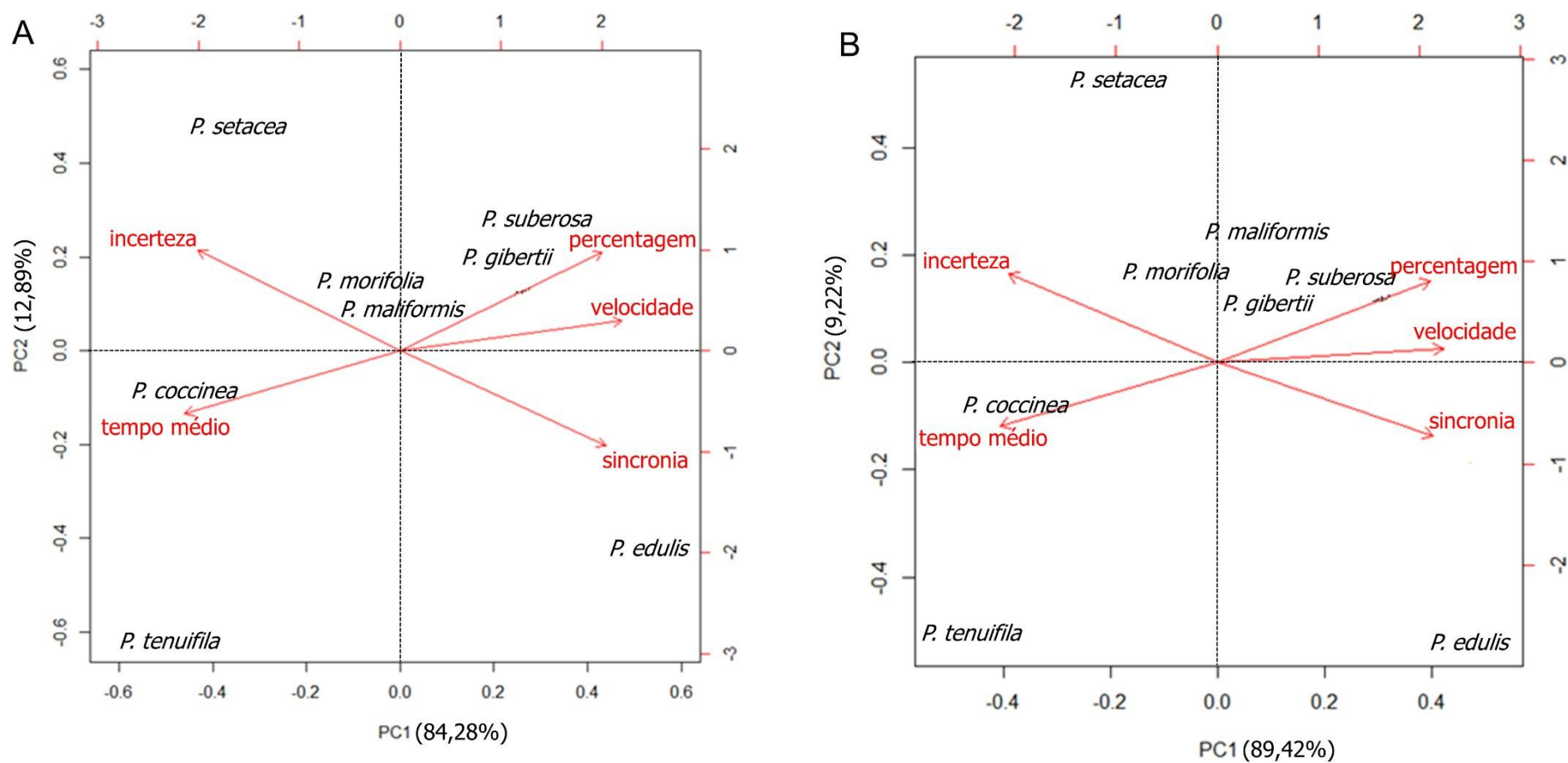
No caso específico desse trabalho, cujo objetivo final é criopreservar sementes dessas espécies de *Passiflora*, mantendo sua viabilidade, essas correlações obtidas com as percentagens de germinação são fundamentais para a consolidação de um protocolo que possa atender a várias espécies.

As análises de componentes principais permitiram destacar quais as variáveis forneceram mais informações para o entendimento da germinação das sementes das espécies estudadas, onde essa ferramenta demonstrou ser importante nos trabalhos que visam avaliação da germinação de sementes. Além disso, essas análises permitiram uma visão mais integrada do que foi avaliado, deixando evidente que é possível a obtenção de um protocolo básico de criopreservação para espécies do gênero *Passiflora*.

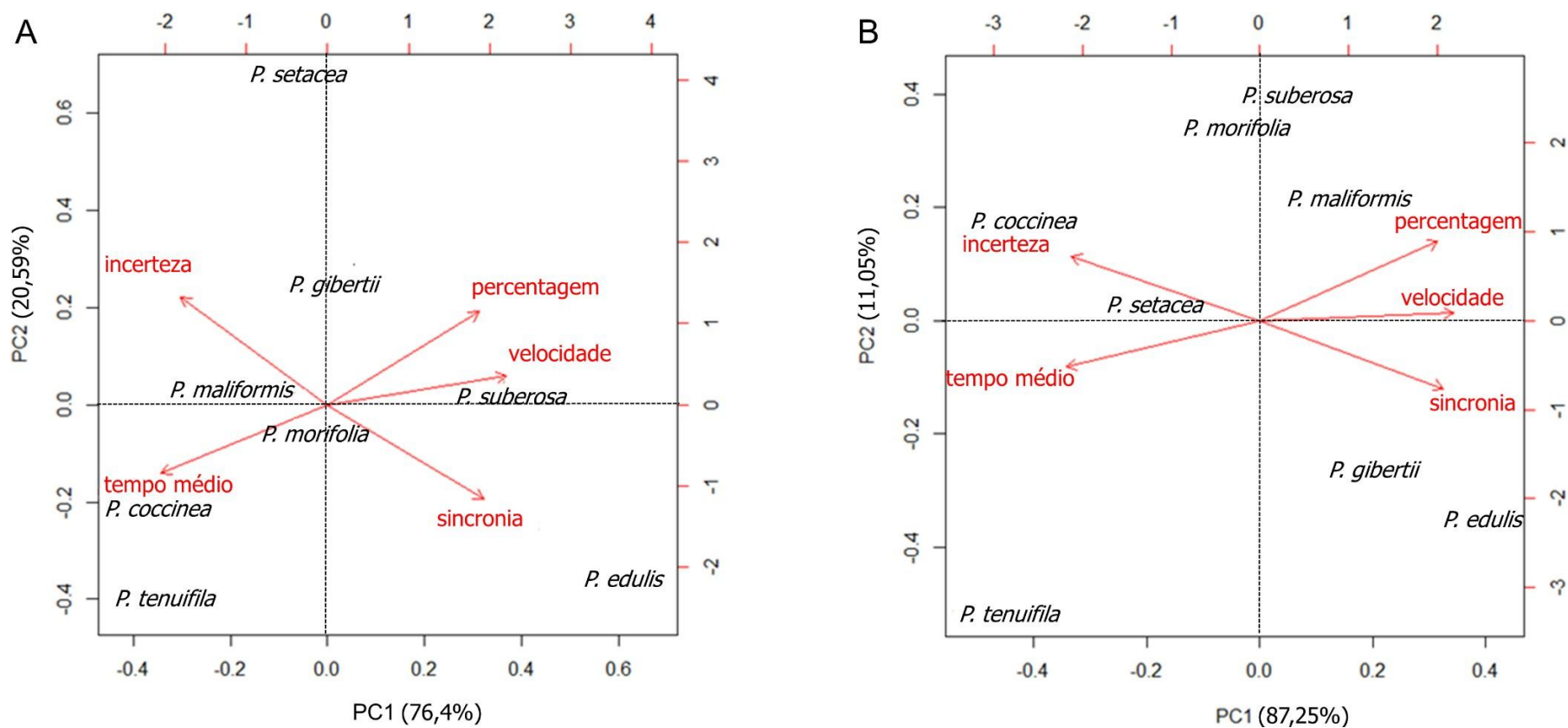


**Figura 2.** Gráfico *biplot* da análise de componentes principais. Peso das variáveis (“loadings”) e escores das espécies nos dois primeiros componentes principais para o fator grau de umidade. A) sementes dessecadas; B) sementes não dessecadas.





**Figura 3.** Gráfico *biplot* da análise de componentes principais. Peso das variáveis (“loadings”) e escores das espécies nos dois primeiros componentes principais para o fator temperatura. A) Criopreservação; B) Refrigerador.



**Figura 4.** Gráfico *biplot* da análise de componentes principais. Peso das variáveis (“loadings”) e escores das espécies nos dois primeiros componentes principais para o fator ambiente. A) Germinador; B) Casa de vegetação.

## CONCLUSÕES

Sementes de maracujazeiro das espécies estudadas são tolerantes à dessecação e mantêm sua viabilidade mesmo com grau de umidade reduzido abaixo de 4%;

As sementes das espécies estudadas de maracujazeiro podem ser criopreservadas sem a necessidade de dessecação e mantendo sua qualidade fisiológica após o congelamento;

O ambiente germinador proporcionou as maiores porcentagens de germinação, mas tem aplicação restrita às condições experimentais. Os resultados obtidos em casa de vegetação permitem de forma mais aplicada, uma previsão de emergência em condições naturais;

Considerando o conjunto de análises realizado, as espécies que apresentaram o melhor desempenho germinativo após a criopreservação foram *P. edulis*, *P. gibertii* e *P. suberosa*, *P. morifolia* e *P. maliformis*;

*P. tenuifila* apresentou a menor taxa de sobrevivência após a criopreservação e um comportamento de padrões diferentes, considerando os fatores e as variáveis avaliadas nesse trabalho;

As variáveis porcentagem, velocidade e sincronia apresentaram correlações positivas e estão diretamente relacionadas com a qualidade fisiológica, contribuindo para uma melhor avaliação do vigor das sementes;

A espécie *P. edulis* apresentou uma alta relação com as variáveis sincronia, velocidade e porcentagem para os diferentes fatores analisados, diferentemente de *P. tenuifila* que obteve uma relação com tempo médio e incerteza;

A análise de componentes principais proporcionou uma interpretação multivariada dos resultados, mostrando como as espécies estão relacionadas de acordo com as diferenças nas variáveis analisadas;

A análise de componentes principais auxiliou o entendimento das relações das variáveis e das espécies de maracujazeiro;

Os resultados obtidos demonstram a facilidade com que o sistema multivariado permite extrair informações relevantes a partir de uma matriz de dados, com discriminação das espécies e das variáveis.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, D. S.; LUZ, P. B., NEVES, L. G.; SOBRINHO, S. P. Criopreservação de sementes de espécies de *Passiflora*. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 3, p. 248-253, 2016.
- BARBEDO, C. J.; MARCOS, J. F. Tolerância à dessecação em sementes. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, n. 2, p. 145-164, 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, p. 395, 2009.
- CARDOSO, V. J. M. Uma análise termobiológica da germinação. **Naturalia**, v. 32, p. 35-52, 2009.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; FALEIRO, F. G.; JESUS, O. N.; SANTOS, E. S. L.; SOUZA, A. P. The genetic diversity, conservation, and use of passion fruit (*Passiflora* spp.). **Genetic Diversity and Erosion in Plants**, v. 8, p. 215-231, 2016.
- CHANDEL, K. P. S.; CHAUDHURY, R.; RADHAMANI, J.; MALIK, S. K. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit. **Annals of Botany**, v. 76, n. 5, p. 443-450, 1995.
- CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. **UFV**, p. 394, 1994.
- CZABATOR, F. J. Germination value: an index combining speed and completeness of pine seed germination. **Forest Science** v. 8, n. 4, p. 386-396, 1992.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 5, p. 653-657, 1991.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity, **Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2005. v. 1, p. 677.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. C. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 27-33, 2010.

JÚNIOR, W. A.; SOBREIRA, R. A.; NEGREIROS, J. R. S; PARIZZOTTO, A.; HORST, C. B. Influência da escarificação e do tempo de embebição das sementes sobre a germinação de maracujazeiro (*Passiflora edulis* ti. Flavicarpa Degener). **Revista Ceres**, v. 52, n. 301, p. 369-368, 2005.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; RAMOS, J. D.; BELLON, G.; DA SILVA PAULA, M.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro (*Passiflora nitida* Kunth.) com base em marcadores e moleculares. **Science**, v. 76, p. 5269-5273, 2006.

KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. **Cryopreservation of plant cells and organs**, p. 115-134, 1985.

LABOURIAU, L. G. On the physiology of seed germination in *Vicia graminea* Sm.1. **Anais Academia Brasileira de Ciencias**, v. 42, n. 2, p. 235-62, 1970.

LABOURIAU, L. G.; LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**, p. 139-174, 1983.

LABOURIAU, L. G.; VILADARES, M. E. B. On the germination of seeds of *Calotropis procera* (Ait.) Ait. f. **Anais**, 1976.

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Londrina: ABRATES, 2015.

MARTINS, L.; LAGO, A. A.; ANDRADE, A. C. S.; SALES, W. R. M. Conservação de sementes de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.) em nitrogênio líquido. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p. 71-76, 2009.

MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. A.; PIO, R. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 6, n. 2, p. 13-20, 2007.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. D. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Embrapa Cerrados, v. 1, p. 55-78, 2005.

MUNIZ, C. A. S. D.; QUEIROZ, S. A. D.; MASCIOLI, A. D. S.; ZADRA, L. E. F. Análise de componentes principais para características de crescimento em bovinos de corte. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p. 1569-1576, 2014.

PAIVA, E. P. Germinação e alterações fisiológicas em sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) sob condições abióticas. 2017. 112 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2017.

PENCE, V. C. The possibilities and challenges of *in vitro* methods for plant conservation. **Kew Bulletin**, v. 65, n. 4, p. 539-547, 2010.

PEREIRA, A. D.; CORRÊA, R. X.; OLIVEIRA, A. C. Molecular genetic diversity and differentiation of populations of 'somnus' passion fruit trees (*Passiflora setacea* DC.): implications for conservation and pre-breeding. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 12-21, 2015.

PÉREZ, J. O.; D'EECKENBRUGGE, G. C. Morphological characterization in the genus *Passiflora* L.: an approach to understanding its complex variability. **Plant Systematics and Evolution**, v. 303, n. 4, p. 531-558, 2017.

R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RANAL, M. A.; SANTANA, D. G. D. How and why to measure the germination process? **Brazilian Journal of Botany**, v. 29, n. 1, p. 1-11, 2006.

REED, B. M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008.

SANTANA, D. G. D.; RANAL, M. A. Análise estatística na germinação. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 4, p. 205-237, 2000.

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

SARMENTO, H. G. S.; DAVID, A. M. S. S.; BARBOSA, M. G.; NOBRE, D. A. C.; AMARO, H. T. R. Determinação do teor de água em sementes de milho, feijão e pinhão-mansão por métodos alternativos. **Energia na Agricultura**, v. 30, n. 3, p. 249-256, 2015.

SAS. Statistical Analysis System Institute Inc® 2003. Cary, NC, USA, Lic. UDESC: SAS Institute Inc, 2003.

VEIGA-BARBOSA, L.; MIRA, S.; GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; SOUZA, M. M.; MELETTI, L. M. M.; PÉREZ-GARCÍA, F. Seed germination, desiccation tolerance and cryopreservation of *Passiflora* species. **Seed Science & Technology**, v. 41, n. 1, p. 89-97, 2013.

## CAPÍTULO 2

### MORFOANATOMIA DE SEMENTES DE *Passiflora* spp.



## MORFOANATOMIA DE SEMENTES DE *Passiflora* spp.

**RESUMO:** Várias espécies de *Passiflora* têm sido objeto de estudos em função de sua importância econômica e nutricional, bem como suas propriedades farmacêuticas. Considerando-se que frutos e sementes exibem pequena plasticidade fenotípica, alguns pesquisadores têm se dedicado a ampliar os estudos sobre morfoanatomia desses órgãos. Aliado a esses estudos, a conservação desse germoplasma é fundamental para preservação dos recursos genéticos dessas espécies. Uma alternativa é a criopreservação, ainda que esse processo possa provocar crioinjúrias devido à imersão das sementes em temperaturas ultrabaixas (-196°C). Não há registros de trabalhos para verificar as injúrias causadas no embrião e tegumento após um procedimento de criopreservação em sementes de espécies desse gênero. Assim este trabalho teve como objetivo realizar a caracterização morfoanatômica das sementes de *Passiflora* spp. bem como, verificar as possíveis crioinjúrias nos tecidos após os procedimentos de criopreservação. Foram utilizadas sementes de frutos maduros das espécies: *P. coccinea*, *P. edulis*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. morifolia*, *P. setacea*, *P. suberosa* e *P. tenuifila* coletadas no BAG de Maracujá da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas. Foram avaliadas características biométricas: comprimento (mm), largura (mm) e espessura (mm), forma da base, ápice, esculturas presentes no corpo e margem. Lotes de sementes de cada espécie foram colocadas em criotubos e imersas diretamente no nitrogênio líquido, após sete dias de acondicionamento das sementes foi feita a microscopia eletrônica de varredura do tegumento e anatomia das estruturas internas. As sementes apresentaram grandes variações nas medidas biométricas com valores médios de 4,63 mm para comprimento, 3,28 mm para largura e 1,51 mm para espessura. As espécies que apresentaram as maiores sementes foram *P. edulis* com 5,83 mm de comprimento e 4,20 mm de largura e *P. morifolia* com 1,94 mm de espessura. Foram observados seis tipos de ornamentações: reticulada para a espécie *P. coccinea*, finamente reticulada para *P. edulis*, reticulada foveolada para *P. gibertii* e *P. setacea*, reticulada alveolada para *P. maliformis* e *P. tenuifila*, grosseiramente reticulada para *P. morifolia* e reticulada falsifoveolada para *P. suberosa*. Foi possível verificar que algumas sementes sofreram rupturas no tegumento devido ao acondicionamento no nitrogênio líquido, porém com profundidade limitada, não provocando danos fisiológicos ao embrião e endosperma. A criopreservação das sementes na presença do tegumento oferece uma proteção maior, reduzindo significativamente as crioinjúrias causadas ao embrião e até mesmo evitando contaminações externas e danos decorrentes da manipulação e exposição à temperatura extrema. A criopreservação pode ser promissora para a conservação de sementes a longo prazo.

**Palavras-chave:** Anatomia; Maracujá; Injúria; Tegumento.

## MORPHANATOMY OF SEEDS OF *Passiflora* spp.

**ABSTRACT:** Several species of *Passiflora* have been object of studies due to their economic and nutritional importance, as well as their pharmaceutical properties. Considering that fruits and seeds present little phenotypic plasticity, some researchers have dedicated themselves to expand the studies on morphanatomy of these organs. In addition to these studies, the conservation of this germplasm is fundamental for the preservation of the genetic resources. An alternative is cryopreservation, although this process may provoke cryoinjury due to the immersion of the seeds in ultralow temperatures (-196 ° C). There are no records of studies verifying the injuries caused in the embryo and integument after cryopreservation procedure in seeds of species of this genus. Thus, this work aimed to perform the morphological seed analysis of eight *Passiflora* species as well as to verify possible cryoinjuries in tissues after cryopreservation procedures. Seeds from mature fruits of the species: cryopreservation. We used seeds from mature fruits of the following species: *P. coccinea*, *P. edulis*, *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. morifolia*, *P. setacea*, *P. suberosa* and *P. tenuifila* collected in the Passion Fruit BAG of Embrapa Mandioca and Fruticultura, Cruz das Almas. Biometric characteristics were evaluated: length (mm), width (mm) and thickness (mm), shape of the base, apex, sculptures present in the body and margin. Lots of seeds from each species were placed in cryotubes and immersed directly in the liquid nitrogen, seven days after seed packing the electron microscopy was performed to scan the integument and anatomy of the seeds internal structures. The seeds presented large variations in biometric measurements with mean values of 4.63 mm for length, 3.28 mm for width and 1.51 mm for thickness. The species that presented the largest seeds were *P. edulis*, 5.83 mm long and 4.20 mm wide, and *P. morifolia*, 1.94 mm thick. Six types of ornamentation were observed: cross-linked to the species *P. coccinea*, finely cross-linked to *P. edulis*, foveolate cross-linked to *P. gibertii* and *P. setacea*, alveolate reticulated to *P. maliformis* and *P. tenuifila*, coarsely reticulated to *P. morifolia* and falsifvenolated reticulate for *P. suberosa*. It was possible to verify that some seeds suffered ruptures in the integument due to the packing in liquid nitrogen, but with limited depth, causing no physiological damage to the embryo and endosperm. The cryopreservation of the seeds in the presence of the integument offers a greater protection, significantly reducing cryoinjuries caused to the embryo and even avoiding external contaminations and damages resulting from the manipulation and exposure to extreme temperature. Cryopreservation may be promising for long-term seed conservation.

**Keywords:** Anatomy; Passion fruit; Injury; integument.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* L. é o mais diversificado da família Passifloraceae, compreendendo cerca de 75% das espécies da família, possui cerca de 630 espécies distribuídas entre lianas, árvores e arbustos, podendo ser encontradas no México, América Central e América do Sul, sendo que cerca de 120 espécies são nativas do Brasil (ORTIZ et al., 2012; KROSNICK, 2013; RAMÍREZ-BENAVIDES et al., 2018). O gênero é dividido em cinco subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast., *Decaloba* (DC.) Rchb. *Dedamioides* (Harms) Killip, *Passiflora* L. e *Tetrapathea* (DC). P.S. Green (KROSNICK et al., 2013).

Várias espécies do gênero *Passiflora* têm sido objeto de estudos em função de sua importância econômica, nutricional e ornamental, bem como suas propriedades farmacêuticas (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Os frutos de maracujazeiro podem variar no número, tamanho e formato das sementes, as quais podem ser alveoladas, foveoladas, reticuladas ou sulcadas transversalmente e envolvidas por um arilo mucilaginoso. Essas características podem auxiliar a identificação de espécies do gênero *Passiflora* (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Segundo Duke et al. (1981) e McDonald et al. (1988) o tegumento apresenta algumas funções que são essenciais ao desenvolvimento da semente, como por exemplo, proteção e regulação da embebição de água evitando a ruptura celular e a perda de substâncias intracelulares.

Considerando-se que frutos e sementes exibem pequena plasticidade fenotípica, alguns autores têm se dedicado em ampliar os estudos sobre morfoanatomia desses órgãos. Esses estudos têm gerado informações que auxiliam na identificação botânica da espécie, assim como, nos estudos dos mecanismos de dispersão, evolução e sucessão ecológica (VON TEICHMAN; VAN WYK, 1991; MARTINS et al., 2001; MELO et al., 2004).

Os trabalhos encontrados sobre sementes de *Passiflora*, geralmente são baseados na fisiologia e ontogenia e não sobre a morfoanatomia do tegumento e embrião.

Alguns trabalhos têm sido realizados para entender o comportamento das sementes da família Passifloraceae desde sua formação até a germinação, destacando-se os estudos de embriogênese de *P. calcarata* Mast. (RAJU, 1956), estrutura e desenvolvimento do óvulo e sementes de *P. foetida* (SINGH, 1962),

desenvolvimento do arilo em *P. suberosa* L. e em *Turnera ulmifolia* L. (KLOOS; BOUMAN, 1980), desenvolvimento do saco embrionário em *P. edulis* (SOUZA et al., 2002), megasporogênese e megagametogênese em *P. suberosa* (SILVÉRIO et al., 2009), anatomia do tegumento (PÉREZ-CORTÉZ et al., 2005; PÉREZ-CORTÉZ et al., 2009; CÁRDENAS-HERNANDÉZ et al., 2011) e ontogenia de frutos e sementes de cinco espécies do gênero *Passiflora*, subgênero Decaloba, seção Xerogona (MILANI, 2014).

Devido à escassez de trabalhos sobre a morfoanatomia de sementes de *Passiflora*, evidencia-se a necessidade de estudos que abordem a morfologia interna e externa das sementes desse gênero.

Dentre os métodos utilizados, a criopreservação é uma alternativa que consiste em conservar o material biológico em temperaturas ultrabaixas, em nitrogênio líquido, a -196 °C, pois a essa temperatura a divisão celular e os processos metabólicos são quase paralisados, podendo o material permanecer armazenado por tempo indefinido sem alterações em sua estrutura (GOLDFARB et al., 2010).

Outro fato importante é a escassez de estudo sobre as injúrias causadas em sementes desse gênero, tanto no embrião quanto no tegumento após criopreservação. Essas injúrias podem ser provocadas devido à dessecação excessiva ou à formação de gelo dentro das células, ou até mesmo devido a uma dessecação ineficiente que pode ter deixado excesso de água nos tecidos da semente.

Desse modo, este trabalho tem como objetivo caracterizar morfoanatomia das sementes de *Passiflora* spp. para subsidiar futuros estudos taxonômicos do gênero, bem como, verificar as possíveis injúrias nos tecidos após a criopreservação.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Foram utilizadas sementes de frutos maduros das espécies: *Passiflora coccinea* Sol. ex Benth., *P. edulis* Sims, *P. gibertii* N. E. Br., *P. maliformis* L., *P. morifolia* Mast. *P. setacea* DC., *P. suberosa* L. e *P. tenuifila* Killip, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma de Maracujá (BAG Maracujá) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. O município está localizado no

Recôncavo da Bahia e de acordo com a classificação de Köppen (KOPPEN,1936), o clima é uma transição entre as zonas Am e Aw (tropical subúmido a seco) com temperatura média anual de 24, 28 °C, precipitação anual média de 1.143 mm concentrada nos meses de março a agosto sendo o período de dezembro a fevereiro seco e quente com umidade média relativa do ar de 60,47%.

As sementes foram retiradas e lavadas manualmente por meio de fricção em peneira de malha fina para remoção do arilo. Em seguida, as sementes foram secadas em bancada à sombra sobre papel absorvente em temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

### **Biometria das sementes**

As características biométricas das sementes foram avaliadas quanto ao comprimento (mm), largura (mm) e espessura (mm), forma da base, ápice, esculturas presentes no corpo e margem. As medidas dessas variáveis foram obtidas com auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,05 mm. Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva sendo que para cada característica foram calculadas as amplitudes (valores máximos e mínimos), média, desvio padrão e coeficiente de variação. Foi utilizada uma amostra de 20 sementes por espécies.

A nomenclatura utilizada para a denominação das ornamentações e estruturas presente nas sementes basearam-se nos trabalhos de Pérez-Cortéz et al. (2002) e Mezzonato-Pires (2017).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e médias comparadas pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2017). Para a análise das medidas das micrografias, utilizou-se o programa ImageJ 1.46r (RASBAND, 2012).

### **Morfoanatomia das sementes**

Para a caracterização morfológica, as sementes foram montadas diretamente sobre suportes metálicos e metalizadas com ouro durante 150 segundos ao evaporador (Leica EM ACE 600). As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura de pressão variável JEOL JSM-IT300 LV (Jeol, Tokyo, Japão) a 20 kV

no Núcleo de Apoio à Pesquisa - Microscopia Eletrônica na Pesquisa Agropecuária NAP/ MEPA-ESALQ/ USP.

Para os estudos anatômicos, as sementes tiveram o tegumento retirado e as demais estruturas foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada [glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%), CaCl<sub>2</sub> (0,001 M), tampão cacodilato de sódio (0,05 M), em pH 7,2], por 48 horas, desidratadas em série etílica crescente (35-100%), com intervalos de 6 horas, infiltradas e emblocadas utilizando-se o kit Histo-resina (hidroxietilmetacrilato, Leica Heldelberg). A polimerização da resina foi feita à temperatura ambiente por 48 horas.

Cortes histológicos seriados (5 µm) foram obtidos em micrótomo rotativo Leica Modelo 1516 (Leica, Nussloch, Germany), dispostos em lâminas histológicas e corados com fucsina ácida (0,1% p/v), seguido de azul de toluidina (0,05% p/v) (FEDER; O'BRIEN, 1968). Os cortes histológicos foram analisados em microscópio Olympus DM1000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) acoplado com fotodocumentação Sony (Sony, Tokyo, Japão) e programa ImageJ Pro-plus 3.0 para Windows (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MS, EUA).

### **Criopreservação**

Amostras de sementes de cada espécie, após secadas em bancada por 24 h, foram colocadas em criotubos e imersas diretamente no nitrogênio líquido (-196°C) sem nenhum processo de desidratação. Após sete dias de acondicionamento, as sementes foram descongeladas naturalmente em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), por uma hora em bancada. As avaliações das crioinjúrias foram feitas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz, conforme protocolo descrito anteriormente.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Biometria das sementes**

Pelos resultados da análise de variância pode-se observar que houve diferença significativa ( $p < 0,001$ ) entre as espécies para as variáveis comprimento, largura e espessura (Tabela 1).

**Tabela 1.** Biometria das sementes com tegumento de maracujazeiros (*Passiflora* spp.).

Espécies	Variáveis		
	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)
<i>P. coccinea</i>	4,91 b	3,00 d	1,17 c
<i>P. edulis</i>	5,83 a	4,20 a	1,70 b
<i>P. gibertii</i>	4,81 b	3,69 b	1,65 b
<i>P. maliformis</i>	4,42 d	3,62 b	1,37 c
<i>P. morifolia</i>	4,58 c	3,55 b	1,94 a
<i>P. setacea</i>	5,07 b	3,22 c	1,25 c
<i>P. suberosa</i>	3,60 f	2,37 f	1,36 c
<i>P. tenuifila</i>	3,86 e	2,65 e	1,62 b
Mínimo	3,29	2,25	0,18
Máximo	6,25	4,53	2,09
Média	4,63	3,28	1,51
Desvio Padrão	0,69	0,59	0,32
CV (%)	14,99	18,02	21,51
F <sub>c</sub>	4,93**	3,60**	0,68**

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-knott a 5% de significância. \*\*=significativo ao nível de 1 % de probabilidade, respectivamente pelo teste F da ANAVA.

Os resultados da caracterização do comprimento, largura e espessura das sementes de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) mostraram de forma geral que as sementes possuem formato variado contribuindo para uma maior diferenciação entre as espécies. As sementes apresentaram grandes variações no comprimento (3,29 a 6,25 mm), largura (2,25 a 4,53 mm) e espessura (0,18 a 2,09 mm), com valores médios de 4,63 mm para comprimento, 3,28 mm para largura e 1,51 mm para espessura (Tabela 1). A maior diferenciação entre as três características foi para a variável espessura (CV% = 21,51), enquanto a menor variação foi para o comprimento da semente (CV% = 14,99).

Observou-se que as espécies que apresentaram as maiores sementes foram *P. edulis* com 5,83 mm de comprimento e 4,20 mm de largura, e *P. morifolia* apresentou a maior espessura (1,94 mm). Por outro lado, as sementes de *P. suberosa* apresentaram as menores médias de comprimento (3,60 mm), largura (2,37 mm) e espessura das sementes (1,36 mm) (Tabela 1).

O estudo biométrico pode indicar que sementes de maior tamanho, são as mais nutridas durante o seu desenvolvimento e possui maior aporte de nutrientes de reserva, e conseqüentemente maior qualidade fisiológica. Muitos trabalhos vêm

demonstrando a importância do tamanho das sementes com relação à germinação e aporte nutricional (HUMARA et al., 2002; GREEN; JUNIPER, 2004). Esses autores relatam em seus trabalhos que sementes maiores tendem a ter um melhor potencial de germinação e desenvolvimento inicial das plântulas quando comparadas com as sementes de menor tamanho.

Dados biométricos das sementes podem ser um indicativo para trabalhos taxonômicos, pois fornecem dados importantes para identificação e conhecimento do comportamento das espécies nas diferentes regiões ecológicas e na determinação da variabilidade da espécie, assim como nos trabalhos envolvendo tipo de dispersão e agentes dispersores (ALMEIDA JÚNIOR et al., 2010).

### **Morfoanatomia das sementes**

As espécies apresentaram diferenças na escultura do tegumento das sementes, na forma, margem, ápice, base e ornamentação (Tabela 2). As ornamentações do tegumento da semente possuem grande variabilidade entre as espécies, possuindo uma saliência proeminente em sua região centro-apical (Figura 1).

Foram observados seis tipos de ornamentações: reticulada para a espécie *P. coccinea* (Figura 1A; I), finamente reticulada para *P. edulis* (Figura 1B; J), reticulada foveolada para *P. gibertii* (Figura 1C; K) e *P. setacea* (Figura 1F; N), reticulada alveolada para *P. maliformis* (Figura 1D; L) e *P. tenuifila* (Figura 1H; P), grosseiramente reticulada para *P. morifolia* (Figura 1E; M) e reticulada falsifoveolada para *P. suberosa* (Figura 1G; O) (Tabela 2).

A forma das sementes variou de obovado para *P. coccinea*, *P. setacea*, *P. suberosa* e *P. tenuifila* (Figura 1A; F; G; H), oblongo para *P. edulis* (Figura 1B), codiforme para *P. gibertii*, *P. maliformis* e *P. morifolia* (Figura 1C-E). As margens das sementes variaram de inteira para *P. edulis*, *P. gibertii*, *P. morifolia*, *P. setacea* e *P. tenuifila* (Figura 1B; C; E; F; H), dentada para *P. coccinea*, *P. maliformis* e *P. suberosa* (Figura 1A; D; G). Formato de apêndice com variação entre agudo para *P. gibertii*, *P. maliformis*, *P. morifolia*, *P. setacea* e *P. suberosa* (Figura 1C-G), ligeiramente proeminente para *P. coccinea*, *P. edulis* e *P. tenuifila* (Figura 1A; B; H). Por outro lado, as sementes apresentaram formato de base variando de agudo para *P. coccinea*, *P. setacea* e *P. suberosa* (Figura 1A; F; G), obtuso para *P. edulis*, *P. maliformis* e *P.*



*tenuifila* (Figura 1B; D; H), redondo para *P. gibertii* (Figura 1C) e ligeiramente agudo para *P. morifolia* (Figura 1E) (Tabela 2).

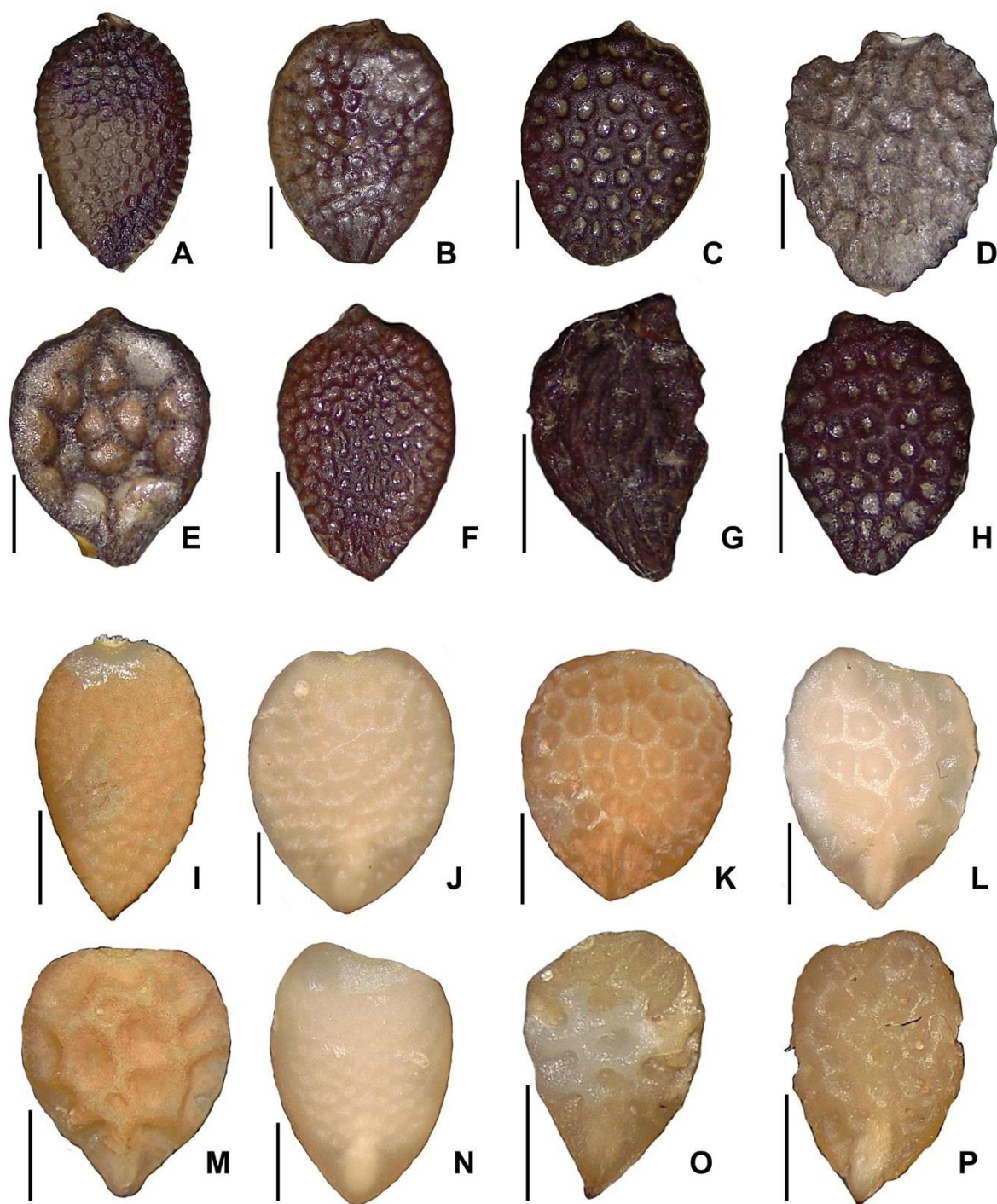
Observando somente as características externas das sementes, tornou-se evidente que há uma ampla variação morfológica dentro do gênero *Passiflora*. As características que mais apresentaram diferenças entre as espécies estudadas foram ornamentação superficial e a base das sementes. Alguns autores estudando as ornamentações na superfície do tegumento das sementes de espécies do gênero *Passiflora*, relataram que essa característica pode ser considerada de valor taxonômico auxiliando na identificação das espécies (MACDOUGAL, 1994).

Esses caracteres morfológicos como tamanho, fôveas na superfície das sementes, assim como, ápice e margem, permitem diferenciar as espécies desse gênero, evidenciando o valor diagnóstico da superfície das sementes de *Passiflora*. Isso já foi atestado em diversos trabalhos (RAJU, 1956; MACDOUGAL, 1994; PÉREZ-CORTÉZ et al., 1995; PÉREZ-CORTÉZ et al., 2002; PÉREZ-CORTÉZ et al., 2005).

Pérez-Cortéz et al. (2002) caracterizando a morfologia das sementes de 51 espécies de *Passiflora*, elaborou uma chave taxonômica a partir desses caracteres. Nesse trabalho os autores identificaram 48 espécies e concluíram que a ornamentação das sementes é de grande valor diagnóstico e útil para a caracterização das mesmas.

Em relação à coloração, as mesmas podem ser consideradas monocromáticas variando desde marrom, preto e castanho, considerando que essa coloração pode ser alterada de acordo com o grau de maturidade das sementes (Figura 1). A coloração é uma característica distintiva de muitas sementes, mas às vezes, não pode ser usada para fins taxonômicos, pois a cor pode mudar conforme as condições ambientais e genéticas durante o desenvolvimento (BEWELY, 1994).

Sementes de maracujá são classificadas como endospermáticas, que se caracteriza como uma massa homogênea e abundante, sólido, de coloração amarelo brilhante em sua região proximal e transparente na região centro-basal onde ocupa todo o espaço da semente (Figura 1).



**Figura 1.** Morfologia do tegumento (A-H) e endosperma (I-P) das sementes de *Passiflora*. A; I) *Passiflora coccinea*. B; J) *P. edulis*. C; K) *P. gibertii*. D; L) *P. maliformis*. E; M) *P. morifolia*. F; N) *P. setacea*. G; O) *P. suberosa*. H; P) *P. tenuifila*.

**Tabela 2.** Morfologia das sementes de *Passiflora* spp.

Espécies	Forma	Margem	Ápice	Base	Ornamentação
<i>P. coccinea</i>	obovado	dentada	ligeiramente proeminente	agudo	reticulada
<i>P. edulis</i>	oblongo	inteira	ligeiramente proeminente	obtuso	finamente reticulada
<i>P. gibertii</i>	codiforme	inteira	agudo	redondo	reticulada-foveolada
<i>P. maliformis</i>	codiforme	dentada	agudo	obtuso	reticulada-alveolada
<i>P. morifolia</i>	codiforme	inteira	agudo	ligeiramente agudo	grosseiramente-reticulada
<i>P. setacea</i>	obovado	inteira	agudo	agudo	reticulada-foveolada
<i>P. suberosa</i>	obovado	dentada	agudo	agudo	reticulada-falsivoveolada
<i>P. tenuifila</i>	obovado	inteira	ligeiramente proeminente	obtuso	reticulada-alveolada

## Caracterização do tegumento

Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) constatou-se que o comprimento longitudinal do tegumento variou de 3520  $\mu\text{m}$  para *P. maliformis* a 5250  $\mu\text{m}$  para *P. gibertii*, com uma média de 4770  $\mu\text{m}$  (Tabela 3). Já o comprimento transversal do tegumento apresentou uma média de 3300  $\mu\text{m}$ , sendo as espécies *P. maliformis* (2900  $\mu\text{m}$ ) com menor comprimento e *P. morifolia* (3980  $\mu\text{m}$ ) com o maior comprimento. A camada paliçádica apresentou comprimento médio de 2320  $\mu\text{m}$  com variações entre as espécies (mínimo de 1730  $\mu\text{m}$  e máximo 3330  $\mu\text{m}$ ).

A espessura do tegumento pode estar associada à qualidade fisiológica das sementes, pois o número de camadas de células que compõem essa estrutura pode influenciar na embebição de água para a germinação como também nas trocas gasosas (OLIVO et al., 2011).

O estudo dessas características morfoanatômicas do tegumento pode fornecer uma melhor compreensão e contribuir para explicar, ou até mesmo permitir a manipulação (por meio da escarificação, por exemplo) do desempenho de sementes sob certas condições ambientais (SOUZA et al., 2001).

**Tabela 3.** Biometria ( $\mu\text{m}$ ) das sementes de espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) criopreservadas obtidas a partir de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Espécies	CLT	CTT	ECP
<i>P. coccinea</i>	5130	3000	2070
<i>P. edulis</i>	4480	3220	1920
<i>P. gibertii</i>	5250	3940	3000
<i>P. maliformis</i>	3520	2900	1730
<i>P. morifolia</i>	5080	3980	3330
<i>P. setacea</i>	4890	3130	1930
<i>P. suberosa</i>	5150	3220	1970
<i>P. tenuifila</i>	4680	2990	2570

(CLT) = comprimento longitudinal do tegumento; (CTT) = comprimento transversal do tegumento; (ECP) = espessura média da camada paliçádica do tegumento.

A camada mais externa do tegumento é a cutícula, que apresenta cerosidade com espessura variável. Essa cerosidade é a primeira barreira à embebição de água pelas sementes (Figuras 2B, G; 3B, G; 4B, G e 5B, G). Logo abaixo da cutícula verificou-se uma epiderme composta de células radialmente alongadas de parede delgada em paliçada e fortemente unidas com células colunares denominada de

macroesclereídes, com o longo eixo orientado perpendicularmente à superfície. Foi verificado uma camada mais internamente com tecido esclerenquimático compacto (Figuras 2A, B, F, G; 3A, B, F, G; 4A, B, F, G; 5A, B, F, G).

A testa é de considerável importância para a semente porque muitas vezes é a única barreira protetora entre o embrião e o ambiente externo. Esse tecido, de revestimento da semente pode ser atribuído à presença de uma cutícula externa, frequentemente impregnada com ceras e gorduras e uma ou mais camadas de células protetoras de paredes espessas (BEWELY, 1994).

O endosperma apresenta característica multicelular para todas as espécies com células isodiamétricas de paredes celulares finas com numerosos grãos de amido. Na parte centro-basal observou-se o embrião na posição longitudinal em relação ao eixo principal da semente, com cotilédones levemente expandidos. Verificou-se um eixo linear bem definido do hipocótilo-radícula com o meristema fundamental e procâmbio. O comprimento do embrião pode variar de 1/3 a 1/5 do comprimento da semente, podendo divergir entre as espécies.

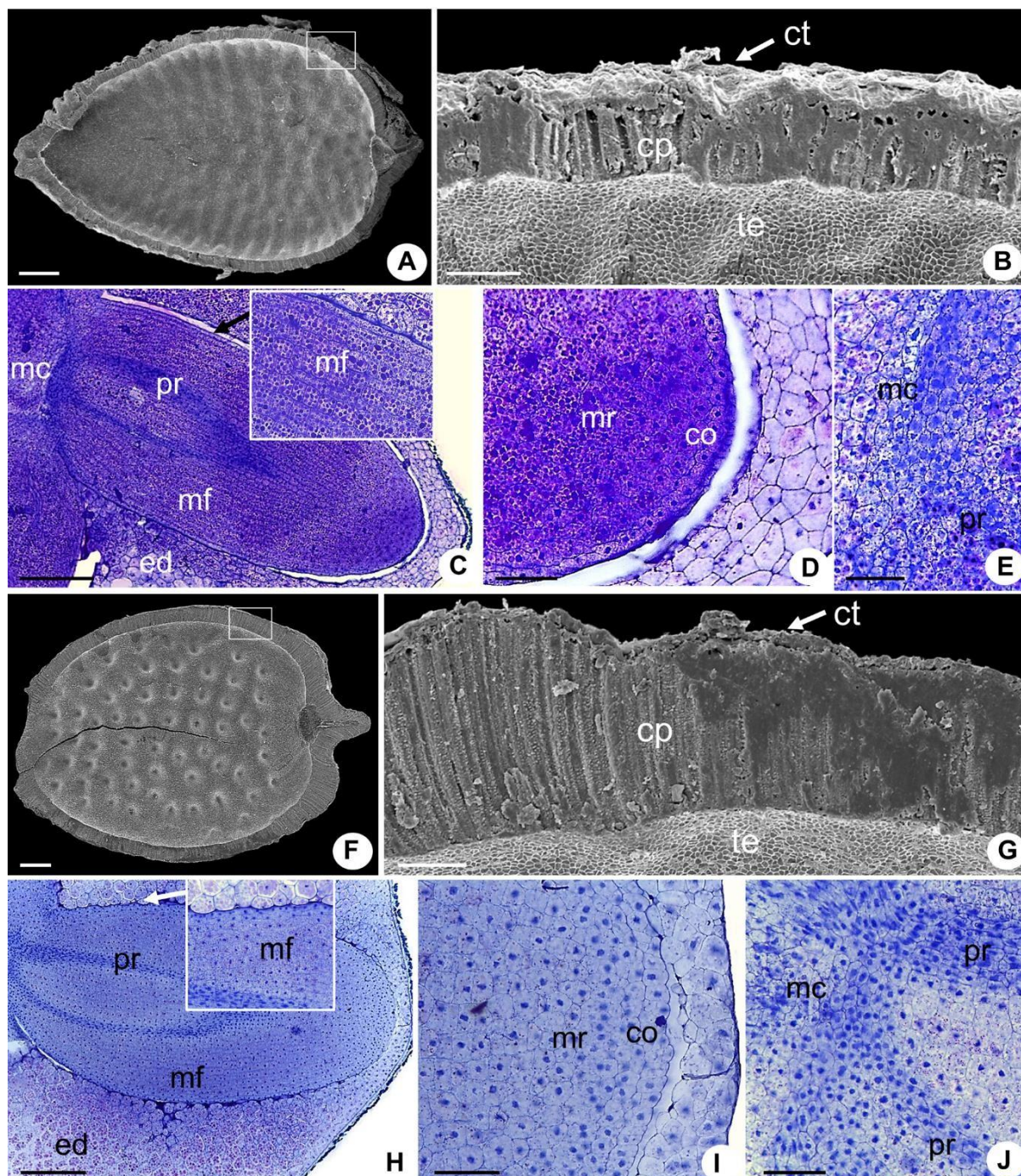
A forma, o tamanho e a posição do embrião podem ser distintos nos diferentes grupos de plantas, sendo utilizado com sucesso para a identificação das sementes em nível de família, gênero ou espécie (BRASIL, 2009). No caso de *Passiflora*, houve semelhanças entre todas as espécies para essas características estudadas.

É possível observar o procâmbio na região central do eixo embrionário, com suas células convergindo em direção ao polo radicular, próximo a um grupo de células isodiamétricas que darão origem à coifa (Figura 2C, D, H, I; 3C, D, H, I; 4C, D, H, I e 5C, D, H, I).

O meristema apical radicular é formado por células dispostas em fileiras radiais mais irregulares na porção distal entre o procâmbio e um conjunto de células de maior volume que dará origem à coifa.

Comparando-se as espécies estudadas, verifica-se que os caracteres anatômicos das sementes de *Passiflora* são bastante homogêneos e unificadores dentro do gênero, corroborando assim com os dados encontrados para a família. A diferença observada foi apenas no tamanho das estruturas.

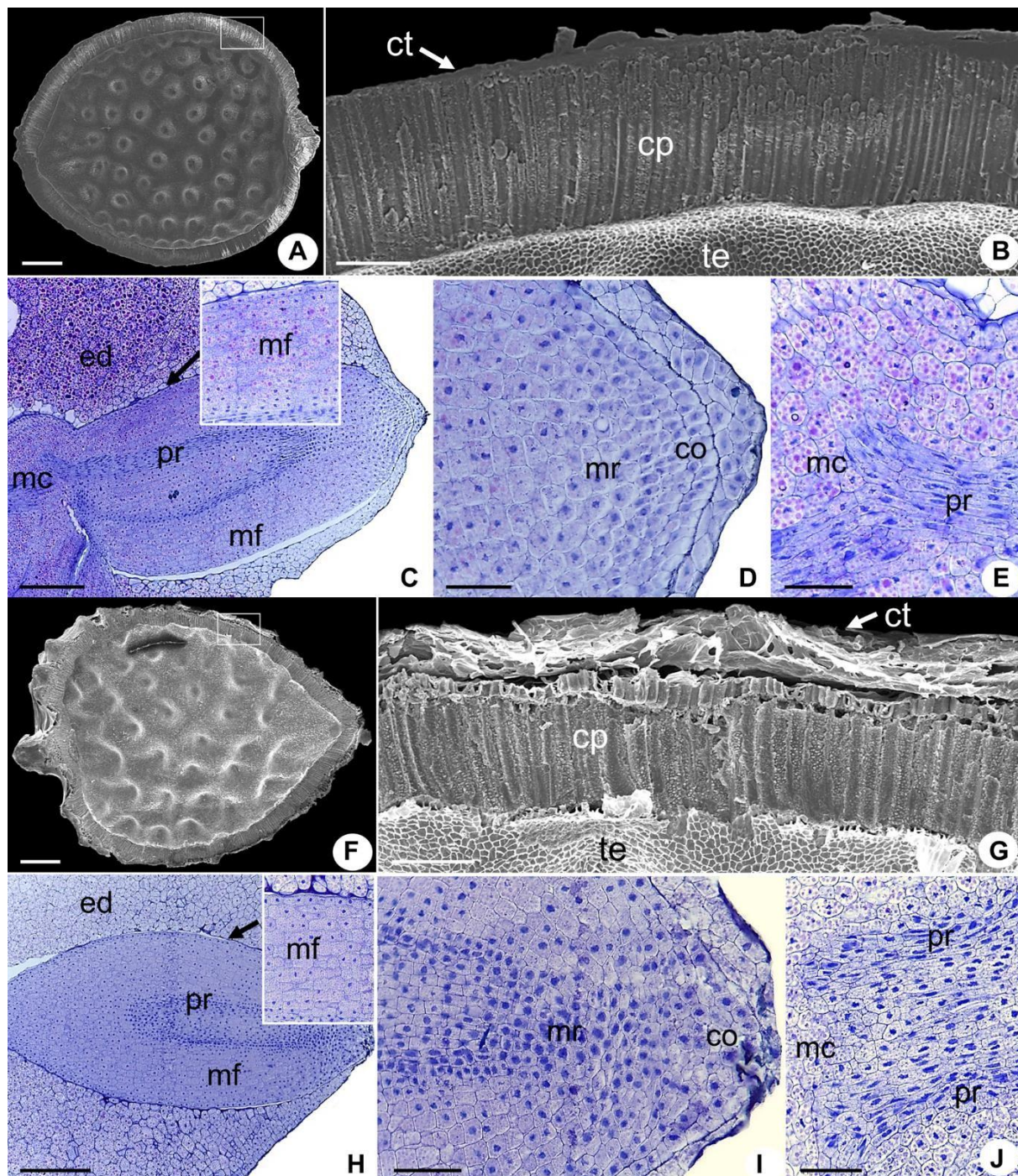




**Figura 2.** Morfoanatomia da semente de *P. coccinea* (A-E) e *P. edulis* (F-J). A, F) secção longitudinal obtidas por MEV evidenciando a região basal e distal com vista interna do tegumento onde pode-se observar o tecido esclerenquimático. B, G) secção do tegumento mostrando a camada paliçádica de macrosclereídes e tecido esclerenquimático. C, H) detalhe geral do embrião, evidenciando as zonas meristemáticas. D, I) detalhe região da coifa e meristema apical radicular. E, J) detalhes do meristema apical caulinar e do procâmbio. Legenda: ed = endosperma; mc = meristema apical caulinar; mr = meristema apical radicular; mf = meristema



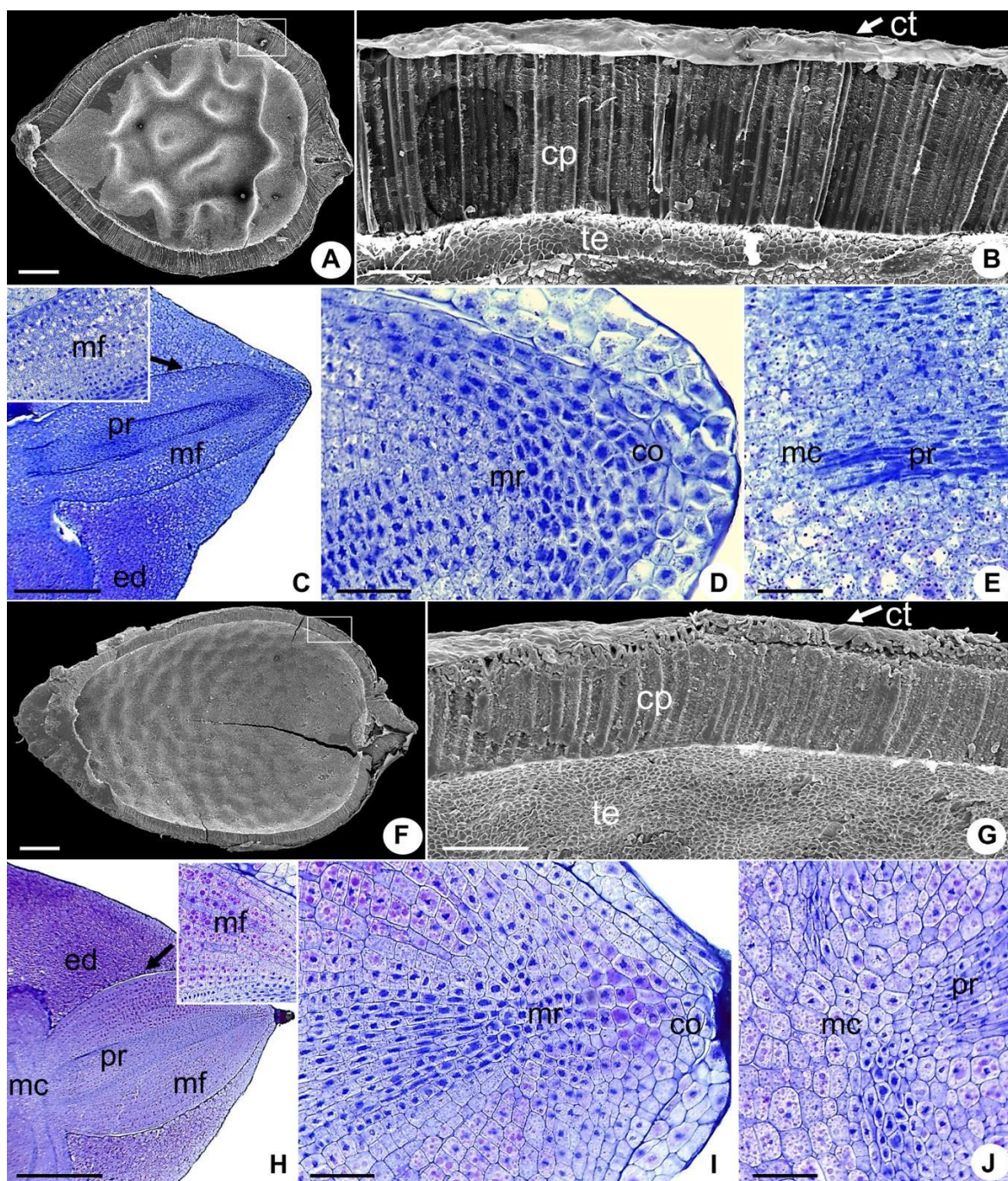
fundamental; pr = procâmbio; co = região da coifa; ct = cutícula; cp = camada paliçádica; te = tecido esclerenquimático. Barras: A = 500  $\mu$ m; B = 100  $\mu$ m; C = 0,2 mm; D e E = 0,05 mm; F = 500 $\mu$ m; G = 100 $\mu$ m.



**Figura 3.** Morfoanatomia da semente de *P. gibertii* (A-E) e *P. maliformis* (F-J). A, F) secção longitudinal obtidas por MEV evidenciando região basal e distal com vista interna do tegumento onde observa-se o tecido esclerenquimático. B, G) secção do tegumento mostrando a camada paliçádica de macrosclereídes e tecido

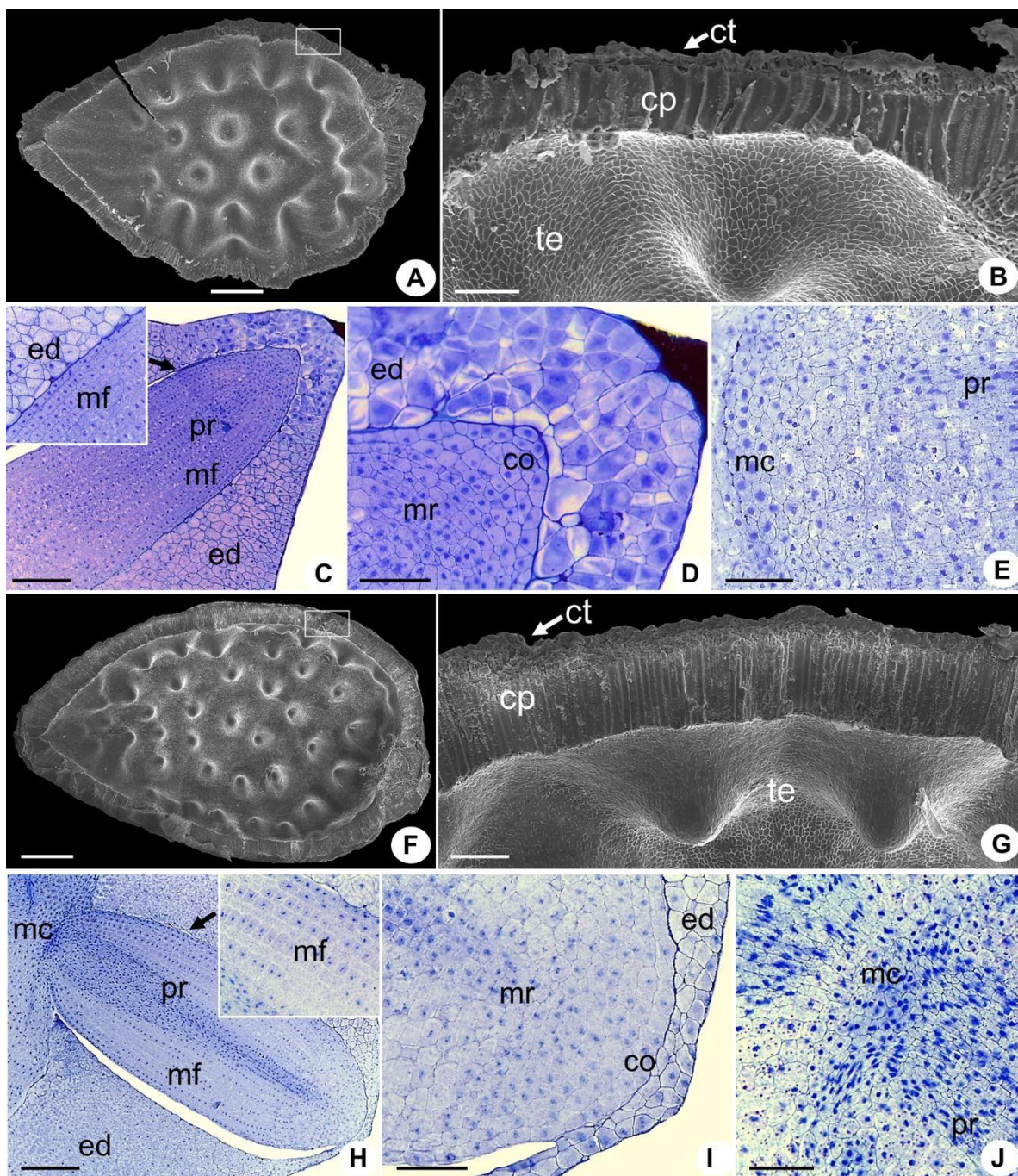


esclerenquimático. C, H) detalhe geral do embrião, evidenciando as zonas meristemáticas. D, I) detalhe região da coifa e meristema apical radicular. E, J) detalhes do meristema apical caulinar e do procâmbio. Legenda: ed = endosperma; mc = meristema apical caulinar; mr = meristema apical radicular; mf = meristema fundamental; pr = procâmbio; co = região da coifa; ct = cutícula; cp = camada paliçádica; te = tecido esclerenquimático. Barras: A = 500  $\mu$ m; B = 100  $\mu$ m; C = 0,2 mm; D e E = 0,05 mm; F = 500 $\mu$ m; G = 100 $\mu$ m.





**Figura 4.** Morfoanatomia da semente de *P. morifolia* (A-E) e *P. setacea* (F-J). A, F) secção longitudinal por MEV evidenciando região basal e distal com vista interna do tegumento onde pode-se observar o tecido esclerenquimático. B, G) secção do tegumento mostrando a camada paliçádica de macroesclereídes e tecido esclerenquimático. C, H) detalhe geral do embrião, evidenciando as zonas meristemáticas. D, I) detalhe da coifa e meristema apical radicular. E, J) detalhes do meristema apical caulinar e do procâmbio. Legenda: ed = endosperma; mc = meristema apical caulinar; mr = meristema apical radicular; mf = meristema fundamental; pr = procâmbio; co = região da coifa; ct = cutícula; cp = camada paliçádica; te = tecido esclerenquimático. Barras: A = 500  $\mu$ m; B = 100  $\mu$ m; C = 0,2 mm; D e E = 0,05 mm; F = 500 $\mu$ m; G = 100 $\mu$ m.



**Figura 5.** Morfoanatomia da semente de *P. suberosa* (A-E) e *P. tenuifila* (F-J). A, F) secção longitudinal obtidas por MEV evidenciando região basal e distal com vista interna do tegumento onde pode-se observar o tecido esclerenquimático. B, G) secção do tegumento mostrando a camada paliçada de macroesclereídes e tecido esclerenquimático. C, H) detalhe geral do embrião, evidenciando as zonas meristemáticas. D, I) detalhe região da coifa e meristema apical radicular. E, J) detalhes do meristema apical caulinar e do procâmbio. Legenda: ed = endosperma; mc = meristema apical caulinar; mr = meristema apical radicular; mf = meristema fundamental; pr = procâmbio; co = região da coifa; ct = cutícula; cp = camada

paliçada; te = tecido esclerenquimático Barras: A = 500  $\mu\text{m}$ ; B = 100  $\mu\text{m}$ ; C = 0,2 mm; D e E = 0,05 mm; F = 500 $\mu\text{m}$ ; G = 100 $\mu\text{m}$ .

### **Crioinjúrias nas sementes**

Por meio da análise por MEV foi possível verificar que algumas sementes sofreram rupturas no tegumento devido a exposição ao nitrogênio líquido (Figura 6). Essas fissuras podem favorecer a quebra de dormência quando a causa é física ou tegumentar, o que ocorre em algumas espécies e que pode ser comprovado com testes de embebição. As fissuras no tegumento facilitam a penetração de água e consequentemente permitem o desenvolvimento da plântula.

Foi constatado nesse trabalho que essas fissuras tiveram a sua profundidade limitada o que não provocou danos fisiológicos ao embrião e endosperma.

A injúria pode ser causada por cristais de gelo que rompem as membranas por um aumento da concentração de soluto no citoplasma a níveis tóxicos ou por desnaturação de membranas e ácidos nucleicos (ALMEIDA et al., 2010). Essas injúrias podem acontecer de forma diferente a depender da espécie, tolerância à dessecação ou às próprias condições de congelamento (ALMEIDA et al., 2010; SOUZA et al., 2015).

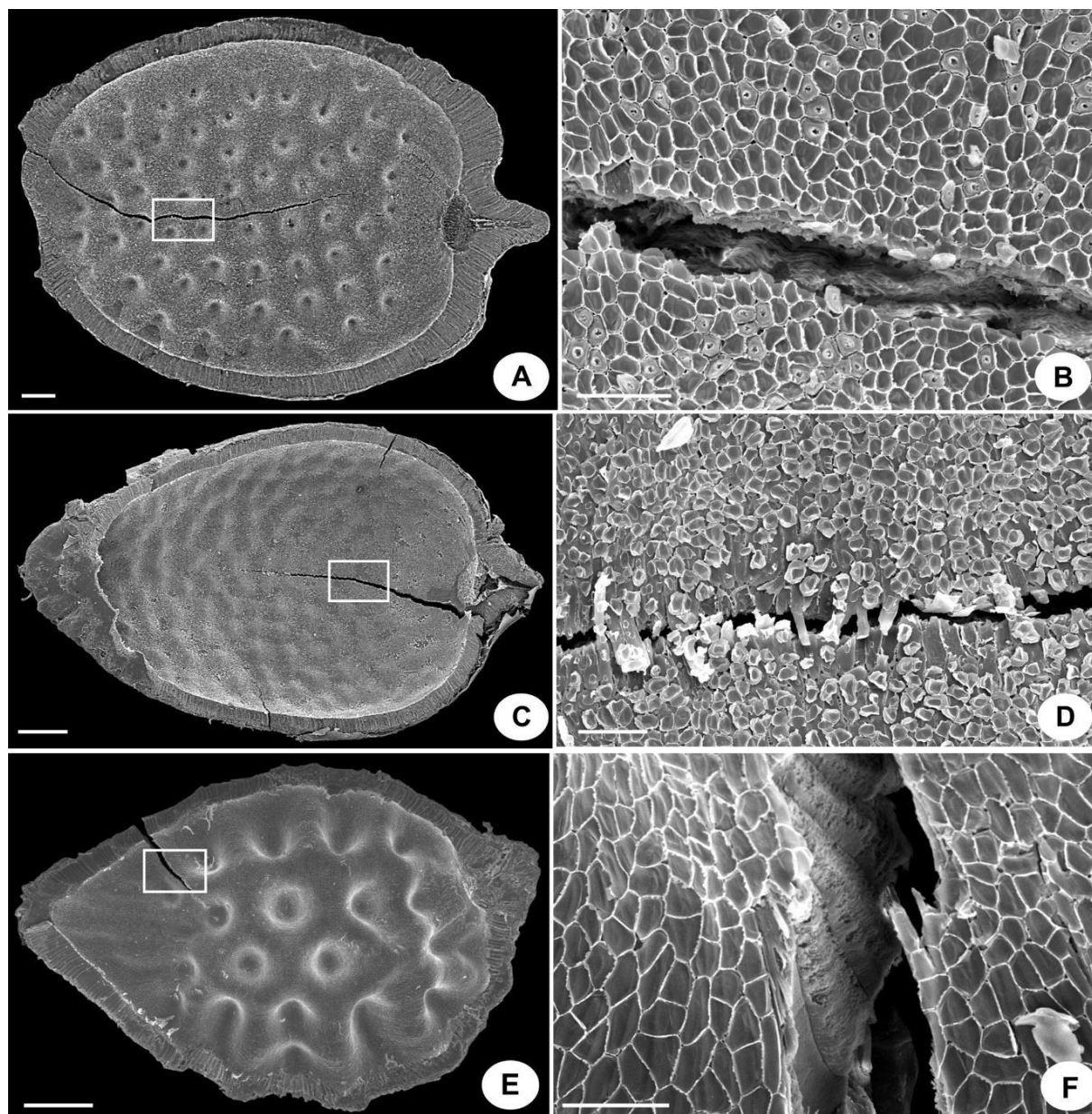
Chandel et al. (1995) trabalhando com dessecação e sensibilidade à criopreservação em sementes recalcitrantes de cacau (*Theobroma cacao* L.), observaram redução na sua viabilidade, e isso foi comprovado por estudos ultraestruturas que indicaram rompimento das membranas celulares durante a dessecação e o congelamento das sementes.

Os estudos anatômicos do embrião e endosperma comprovaram que a imersão em nitrogênio líquido não interferiu na diferenciação e nem no desenvolvimento dos tecidos embrionários durante a germinação já que não foram observadas crioinjúrias nesses tecidos (Figuras 6).

Castro et al. (2017) estudando a caracterização da testa de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. após superação de dormência, encontraram fissuras no tegumento das sementes e apesar dessas fissuras serem limitadas não alcançando o embrião, o tegumento não foi eficiente para evitar os danos ocasionados nas células e isso provocou a perda de compartimentalização celular e consequentemente a morte dos tecidos.



Camillo et al. (2010) estudando a tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação, verificou que na presença do tegumento as sementes têm uma proteção maior, uma vez que reduz significativamente os danos causados ao embrião por contaminações externas e por danos decorrentes da manipulação e exposição à temperatura ultrabaixa.



**Figura 6.** Crioinjúrias nos tegumentos das sementes de *Passiflora* após acondicionamento em nitrogênio líquido. *P. edulis* (A-B), *P. setacea* (C-D) e *P. suberosa* (E-F). A, C e E) secção longitudinal obtidas por MEV evidenciando região basal e distal. B, D e F) detalhes vista interna do tegumento evidenciando as rachaduras ocasionadas no tecido esclerenquimático devido à temperatura ultrabaixa. A, C e E = 500  $\mu\text{m}$ ; B e F = 500  $\mu\text{m}$ ; D = 330  $\mu\text{m}$ .

Crioinjúrias são comuns em outras estruturas celulares, a exemplo dos grãos de pólen (SOUZA et al., 2015) e ápices caulinares (SOUZA et al., 2016). Souza et al. (2015) verificaram crioinjúrias nos grãos de pólen criopreservados sem o processo de desidratação em *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) principalmente na desestruturação das organelas citoplasmáticas e ruptura da exina. Souza et al. (2016) verificaram que o nitrogênio líquido causa morte nas células periféricas do domo meristemático em ápices caulinares criopreservados de abacaxizeiros, não afetando a sua regeneração, pois os tecidos do domo meristemático não foram afetados.

Com isso, observou-se que é possível criopreservar germoplasma de maracujazeiro a partir de sementes com tegumento, sem causar danos nos tecidos embrionários e sem afetar negativamente a germinação.

## **CONCLUSÃO**

As sementes das espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) apresentam características distintas quanto à morfologia, o que pode facilitar a identificação e separação entre espécies;

Os resultados biométricos de comprimento, largura e espessura das sementes de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) podem ser recomendados para auxiliar na identificação de espécies;

Anatomicamente não existem diferenças marcantes entre as espécies estudadas;

Temperaturas ultrabaixas acarretam fissuras no tegumento de algumas espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.), no entanto, não causam perdas da qualidade fisiológica, mantendo o potencial de germinação.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F. D. A.; JERÔNIMO, E. D. S.; ALVES, N. M. C.; GOMES, J. P.; SILVA, A. S. Estudo de técnicas para o armazenamento de cinco oleaginosas em condições ambientais e criogênicas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 2, p. 189-202, 2010.

ALMEIDA JUNIOR, E. B.; LIMA, L. F.; LIMA, P. B.; ZICKEL, C. S. Descrição morfológica de frutos e sementes de *Manilkara salzmannii* (Sapotaceae). **Revista Floresta**, v. 40, n. 3, p. 535-540, 2010.

ARAÚJO, E. C.; SILVA, R. F.; BARROSO, D. G.; CARVALHO, A. J. C. Efeito do armazenamento e do progenitor masculino sobre a qualidade e micromorfologia de sementes de maracujá. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, p. 110-119, 2009.

BEWELY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. Second edition, Plenum Press, New York, EUA, p. 445-447, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Glossário ilustrado de morfologia. Brasília. Mapa/ACS, 2009, 406 p.

CAMILLO, J.; LUIS, Z. G.; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Tolerância de sementes de dendezeiro à criopreservação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 2, p. 211-215, 2010.

CÁRDENAS-HERNÁNDEZ, J.; MIRANDA, D.; MAGNITSKIY, S.; CARRANZA, C. Morphological and anatomical analyses of the seed coats of sweet granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) seeds. **Agronomía Colombiana**, v. 29, n. 3, p. 377-385, 2011.

CASTRO, D. S.; ARAUJO, E. F.; BORGES, E. E. L.; AMARO, H. T. R Caracterização da testa de sementes de *Apuleia leiocarpa* (VOGEL) J. F. MACBR após superação de dormência. **Ciência Florestal**, v. 27, n. 3, p. 1061-1068, 2017.

CHANDEL, K. P. S.; CHAUDHURY, R.; RADHAMANI, J.; MALIK, S. K. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit. **Annals of Botany**, v. 76, n. 5, p. 443-450, 1995.

DEGINANI, N. B. Las especies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). **Darwiniana**, v.39, n.1-2, p. 43-129. 2001.

DUKE, S. H.; KAKEFUDA, G. Role of the testa in preventing cellular rupture during imbibition of legume seeds. **Plant physiology**, v. 67, n. 3, p. 449-456, 1981.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**. v. 55. n. 1, p.123-142, 1968.

SOUZA, F. V. D.; KAYA, E.; JESUS, V. L.; SOUZA, E. H.; OLIVEIRA, A. V. B.; SKOGERBOE, D.; JENDEREK, M. M. Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 124, n. 2, p. 351-360, 2016.

CIBELE, F. M.; OLIVEIRA, J. A.; DAVIDE, A. C.; GUIMARÃES, R. M. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson). **Cerne**, v. 8, n. 2, p. 17-25, 2002.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, v. 23, n. 1, p. 27-33, 2010.

GREEN, P. T.; JUNIPER, P. A. Seed–seedling allometry in tropical rain forest trees: seed mass-related patterns of resource allocation and the 'reserve effect'. **Journal of Ecology**, v. 92, n. 3, p. 397-408, 2004.

HUMARA, J. M.; CASARES, A.; MAJADA, J. Effect of seed size and growing media water availability on early seedling growth in *Eucalyptus globulus*. **Forest Ecology and Management**, v. 167, n. 1, p. 1-11, 2002.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 2, p.1-149, 1965.

KLOOS, A.; BOUMAN, F. Case studies in aril development *Passiflora suberosa* L. and *Turnera ulmifolia* L. **Beitrage zur Biologie der Pflanzen**, v. 55, n. 1, p. 49-66, 1980.

KOPPEN, W. Das geographischen system der klimate. **Handbuch der klimatologie**, p. 1-44, 1936.

KROSNICK, S. E.; PORTER-UTLEY, K. E.; MACDOUGAL, J. M.; JORGENSEN, P. M.; MCDADE, L. A. New insights into the evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): phylogenetic relationships and morphological synapomorphies. **Systematic Botany**, v. 38, n. 3, p. 692-713, 2013.

LACKIE, S.; YEUNG, E. C. Zygotic embryo development in *Daucus carota*. **Canadian journal of botany**, v. 74, n. 7, p. 990-998, 1996.

MACDOUGAL, J. M. Revision of *Passiflora* subgenus *Decaloba* section *Pseudodysosmia* (Passifloraceae). **Systematic Botany Monographs**, v. 41, p. 1-146, 1994.

MARTINS, M. A. G.; OLIVEIRA, D. M. T. Morfo-anatomia e ontogênese do fruto e da semente de *Tipuana tipu* (Benth.) O. Kuntze (Fabaceae: Faboideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 1, p.109-121, 2001.

MCDONALD, M. B.; VERTUCCI, C. W.; ROOS, E. E. Soybean seed imbibition: water absorption by seed parts. **Crop Science**, v. 28, n. 6, p. 993-997, 1988.

SILVA, L. M. M.; MATA, M. E. R. M. C.; DUARTE, M. E. M. Teor de água limite para crioconservação de sementes de romã. **Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 2, 2016.

MELO, M. G. G.; MENDONÇA, M. S.; MENDES, A. M. S. Análise morfológica de sementes, germinação e plântulas de jatobá (*Hymenaea intermedia* Ducke var.



*adenotricha* (Ducke) Lee & Lang.) (Leguminosae-caesalpinioideae). **Acta Amazonica**, v. 34, n. 1, p. 9-14, 2004.

MEZZONATO-PIRES, A. C.; MENDONÇA, C. B. F.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V. The taxonomic significance of seed morphology in the *Passiflora* subgenus *Astrophea* (Passifloraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 31, n. 1, p. 68-83, 2017.

MILANI, J. F. Ontogenia de frutos e sementes de espécies de *Passiflora* (Passifloraceae-subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. seção Xerogona (Raf.) Killip). Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia- Campinas, São Paulo, p. 107. 2014.

OLIVO, F.; OLIVO, M.; BERTAN, I.; PESKE, S. P. Espessura do tegumento e qualidade física e fisiológica de sementes de feijão. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 1, p. 89-98, 2011.

ORTIZ, D. C.; BOHÓRQUEZ, A.; DUQUE, M. C.; TOHME, J.; CUÉLLAR, D.; VÁSQUEZ, T. M. Evaluating purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *edulis*) genetic variability in individuals from commercial plantations in Colombia. **Genetic resources and crop evolution**, v. 59, n. 6, p. 1089-1099, 2012.

PÉREZ-CORTÉZ, S.; ESCALA, M.; TILLET, S. Anatomía de la cubierta seminal en ocho especies de *Passiflora*, subgénero *Passiflora*/Seed coat anatomy in eight species of *Passiflora* L., subgenus *Passiflora*. **Acta Botanica Venezuelica**, v. 28, n. 2, p. 337-348, 2005.

PERÉZ-CORTÉZ, S.; ESCALA, M.; TILLET, S. Morfoanatomía de la cubierta seminal en siete especies de *Passiflora* L., subgénero *Passiflora* (Passifloraceae). **Hoehnea**, v. 36, n. 1, p. 131-137, 2009.

PÉREZ-CORTÉZ, S.; TILLET, S.; ESCALA, M. Estudio morfológico de la semilla de 51 especies del género *Passiflora* L. **Acta Botanica Venezuelica**, v. 25, n. 1, p. 67-96, 2002.

PÉREZ-CORTEZ, S.; ESCALA, M.; TILLET, S.; SÁNCHEZ, C. Estudio morfoanatômico de la cubierta seminal de *Passiflora quadrangularis* L. (Passifloraceae). **Anales Bot. Agric**, v. 2, n. 1, p. 25-29, 1995.

RAMÍREZ-BENAVIDES, W; JANSEN-GONZÁLES, S. Flower visitation of *Passiflora apetala*, *P. auriculata* and *P. holosericea* (Passifloraceae) by *Pepsis aquila* (Hymenoptera: Pompilidae). **Fragmenta entomologica**, v. 50, n. 1, p. 57-59, 2018.

R CORE TEAM (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAJU, M. V. S. Embryology of the Passifloraceae: gametogenesis and seed development of *Passiflora calcarata* Mast. **The Journal of The Indian Botanical Society**, v. 35, n. 1, p. 126-138, 1956.

RASBAND, W.S. **ImageJ**, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.

SILVÉRIO, A.; TORMES, S. B. F. A.; ARAUJO, J. E. A. O processo da ginosporogênese e ginogametogênese de *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 1, p. 15-22, 2009.

SINGH, D. The structure and development of ovule and seed of *Passiflora foetida* Linn. **Agra. Univ. J. Res. Sci**, v. 11, n. 3, p. 99-111, 1962.

SOUZA, F. H. D.; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. **Brazilian Journal of Botany**, v. 24, n. 4, p. 365-375, 2001.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; ROSSI, M. L.; BRANCALLEÃO, N.; SILVA LEDO, C. A.; MARTINELLI, A. P. Viability, storage and ultrastructure analysis of *Aechmea bicolor* (Bromeliaceae) pollen grains, an endemic species to the Atlantic forest. **Euphytica**, v. 204, n. 1, p. 13-28, 2015.

SOUZA, M. M. D.; PEREIRA, T. N. S.; HOFFMANN, M.; MELO, E. J.; LOURO, R. P. Embryo sac development in yellow passion fruit *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 4, p. 471-475, 2002.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M.; ULMER, B. *Passiflora*: Passionflowers of the world. Portland, Or.: Timber Press 430p.-illus., col. illus.. ISBN, v. 881926485, 2004.

VON TEICHMAN, I.; VAN WYK, A. E. Trends in the evolution of dicotyledonous seeds based on character associations, with special reference to pachychalazy and recalcitrance. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 105, n. 3, p. 211-237, 1991.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho buscou avaliar a germinação de sementes criopreservadas, aliado ao estudo de morfoanatomia de algumas espécies de maracujazeiro com a finalidade de criar subsídios para o uso dessa alternativa para a conservação de espécies de *Passiflora* spp.

Sementes de maracujazeiro podem ser criopreservadas sem a necessidade de dessecação, já que não sofreram danos após serem acondicionadas no nitrogênio líquido. A germinação após o congelamento deixa evidente a manutenção de seu vigor e das estruturas essenciais da semente, consequentemente mantendo o potencial de germinação e emergência de plântulas.

Os resultados da morfoanatomia das sementes mostraram que as espécies de *Passiflora* apresentam características diferenciadas quanto à biometria, mas não quanto à morfoanatomia, já que não apresentam diferenças evidentes em seus tecidos internos.

Os resultados obtidos nesse trabalho podem ser aplicados a outras espécies do BAG de *Passiflora* com o intuito de fornecer informações quanto a conservação a longo prazo e comportamento das sementes.

## APÊNDICES

### Capítulo 1

**APÊNDICE A:** Resumo da análise de variância preliminar das sementes das espécies de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) com diferentes graus de umidade (sementes dessecadas e não dessecadas), diferentes ambientes de semeadura (germinador e casa de vegetação) e diferentes temperaturas de armazenamento (criopreservação e refrigerador) para as variáveis germinação ( $\bar{G}\%$ ), tempo médio de germinação ( $\bar{t}$ ), velocidade média de germinação ( $\bar{v}$ ), incerteza ( $I$ ) e sincronia ( $Z$ ).

FV	QM					
	GL	$\bar{G}\%$	$\bar{t}$	$\bar{v}$	$I$	$Z$
Espécies (E)	7	1,23223**	1258,103**	0,014568**	7,297809**	0,993941**
Grau de Umidade (G.U.)	1	0,0017	44,57891*	0,000151	3,93333**	0,040115
Ambiente semeadura (A)	1	0,64601**	7051,976**	0,108558**	49,61054**	4,695781**
Temperatura (TE)	1	0,00123	10,16386	0,000001	3,123173**	0,128325*
E * G.U.	7	0,06939**	19,28556	0,000232*	0,112086	0,014262
E * A	7	0,14988**	328,1689**	0,005284**	1,501511**	0,241124**
E * TE	7	0,04041**	40,28809**	0,000202*	0,145576	0,026436
G.U. * A	1	0,026	15,48644	0,000018	0,567028	0,032689
G.U. * TE	1	0,00076	3,111101	0,00002	2,381891**	0,146881**
A * TE	1	0,00723	0,037367	0,000041	0,429385	0,008834
E * G.U. * A	7	0,02179	38,58313**	0,000232*	0,147473	0,020145
E * G.U. * TE	7	0,03489	11,8235	0,000019	0,076602	0,007813
G.U. * A * TE	1	0,0121	2,953951	0,000125	0,001857	0,011889
E * G.U. * A * TE	7	0,00654*	14,31136	0,000102	0,160229	0,010004
Resíduo	199	0,01432	10,85766	0,000087	0,318253	0,021726

(\*) = significativo a ao nível de 5% de probabilidade; (\*\*) = significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F da ANAVA. (QM) Quadrado Médio.  $\bar{G}\%$ : germinação;  $\bar{t}$ : tempo médio de germinação;  $\bar{v}$ : velocidade média de germinação;  $I$ : incerteza;  $Z$ : sincronia.

**APÊNDICE B:** Resumo da análise de variância das sementes de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) para cada espécie, com diferentes graus de umidade (sementes dessecadas e não dessecadas), diferentes ambientes de semeadura (germinador e casa de vegetação) e diferentes temperaturas de armazenamento (criopreservação e refrigerador) para as variáveis germinação ( $\bar{G}$  %), tempo médio de germinação ( $\bar{t}$ ), velocidade média de germinação ( $\bar{v}$ ), incerteza ( $I$ ) e sincronia ( $z$ ).

FV	QM					
	GL	$\bar{G}$ %	$\bar{t}$	$\bar{v}$	$I$	$z$
<i>P. coccinea</i>						
Grau de Umidade (G.U.)	1	0,0045	12,2259	0,0000	0,1284	0,0195
Ambiente	1	0,0648*	716,75*	0,0021*	6,7194*	0,9058*
Temperatura	1	0,0253	0,9932	0,0000	0,5477	0,0014
G.U.*Ambiente	1	0,0162	13,836	0,0000	0,0757	0,0346
G.U.*Temperatura	1	0,0021	49,859	0,0000	1,1734	0,0000
Ambiente*Temperatura	1	0,0050	0,2791	0,0000	0,0742	0,0017
G.U.*Ambiente*Temperatura	1	0,0008	56,209	0,0001	0,3471	0,0015
Resíduo	24	0,0123	16,379	0,0000	0,4097	0,0150
<i>P. edulis</i>						
Grau de Umidade (G.U.)	1	0,0128	0,0000	0,0000	0,0333	0,0135
Ambiente	1	0,0005	680,67**	0,0513**	11,686**	2,1644**
Temperatura	1	0,0338	1,4113	0,0000	0,1950	0,0016
G.U.*Ambiente	1	0,0001	0,0099	0,0000	0,0334	0,0135
G.U.*Temperatura	1	0,1596**	0,1261	0,0000	0,1146	0,0023
Ambiente*Temperatura	1	0,0210	1,1859	0,0000	0,1950	0,0016
G.U.*Ambiente*Temperatura	1	0,0181	0,2063	0,0000	0,1146	0,0023
Resíduo	24	0,0162	2,8927	0,0000	0,1266	0,0207
<i>P. gibertii</i>						
Grau de Umidade (G.U.)	1	0,1001	18,468	0,0012**	1,5529	0,0295
Ambiente	1	0,2869**	92,369**	0,0042**	0,1295	0,0069
Temperatura	1	0,0270	1,8907	0,0002	0,6136	0,0042
G.U.*Ambiente	1	0,0043	9,6002	0,0007*	0,0189	0,0033
G.U.*Temperatura	1	0,0017	0,7616	0,0000	0,0778	0,0668
Ambiente*Temperatura	1	0,0026	4,6923	0,0003	0,0002	0,0031
G.U.*Ambiente*Temperatura	1	0,0002	10,379	0,0005	0,1430	0,0125
Resíduo	24	0,0149	3,0933	0,0001	0,1461	0,0294
<i>P. maliformis</i>						
Grau de Umidade (G.U.)	1	0,0036	13,284	0,0002	0,8228	0,0021
Ambiente	1	0,0325	27,348	0,0014*	3,3697**	0,3771**
Temperatura	1	0,0595	20,583	0,0004	0,1238	0,0820
G.U.*Ambiente	1	0,0013	26,258	0,0004	0,0038	0,0031
G.U.*Temperatura	1	0,0032	0,3630	0,0000	0,3935	0,0167
Ambiente*Temperatura	1	0,0200	1,7222	0,0000	0,3322	0,0318
G.U.*Ambiente*Temperatura	1	0,0021	3,7509	0,0000	0,0120	0,0000

Resíduo	24	0,0296	11,696	0,0002	0,2717	0,0211
<i>P. morifolia</i>						
Grau de Umidade (G.U.)	1	0,0276	7,5075	0,0000	0,3009	0,0071
Ambiente	1	0,1830**	1060,8**	0,0142**	10,186**	0,5371**
Temperatura	1	0,0288	0,0224	0,0000	0,3289	0,0154
G.U.*Ambiente	1	0,0990**	5,1964	0,0000	0,0072	0,0012
G.U.*Temperatura	1	0,0200	2,9624	0,0000	0,5205	0,0082
Ambiente*Temperatura	1	0,0072	0,1037	0,0000	0,1229	0,0043
G.U.*Ambiente*Temperatura	1	0,0313	4,7673	0,0000	0,0011	0,0000
Resíduo	24	0,0081	14,257	0,0001	0,2861	0,0136
<i>P. setacea</i>						
Grau de Umidade (G.U.)	1	0,0081	0,8859	0,0002	0,5844	0,0000
Ambiente	1	0,5645**	3164,4**	0,0332**	1,6766	0,0159
Temperatura	1	0,0270	0,9688	0,0000	0,2039	0,0536
G.U.*Ambiente	1	0,0048	4,6604	0,0003*	0,0985	0,0275
G.U.*Temperatura	1	0,0017	10,299	0,0000	0,0628	0,0514
Ambiente*Temperatura	1	0,0345*	2,6876	0,0000	0,0511	0,0000
G.U.*Ambiente*Temperatura	1	0,0005	21,036	0,0001	0,4860	0,0610
Resíduo	24	0,0064	6,6540	0,0001	0,8107	0,0323
<i>P. suberosa</i>						
Grau de Umidade (G.U.)	1	0,0005	0,0228	0,000	0,7694	0,0119
Ambiente	1	0,1047*	768,10**	0,034**	15,586**	1,5746**
Temperatura	1	0,0732*	6,7878*	0,000	0,0454	0,1356*
G.U.*Ambiente	1	0,0116	0,4027	0,000	0,5463	0,0546
G.U.*Temperatura	1	0,0520	2,5113	0,000	0,2192	0,0401
Ambiente*Temperatura	1	0,0058	1,2846	0,000	0,1544	0,0217
G.U.*Ambiente*Temperatura	1	0,0011	4,9726	0,000	0,0194	0,0045
Resíduo	24	0,0140	1,3764	0,000	0,2308	0,0285
<i>P. tenuifila</i>						
Grau de Umidade (G.U.)	1	0,3301**	127,1825	0,0000	0,5258	0,0563
Ambiente	1	0,4584**	2838,5**	0,0051**	10,766**	0,8019**
Temperatura	1	0,0095	259,52**	0,0005**	2,0838*	0,0196
G.U.*Ambiente	1	0,0413	225,60*	0,0002*	0,8155	0,0360
G.U.*Temperatura	1	0,0048	18,9914	0,0000	0,3561	0,0160
Ambiente*Temperatura	1	0,0332	25,1924	0,0000	0,0154	0,0060
G.U.*Ambiente*Temperatura	1	0,0038	1,8108	0,0000	0,0002	0,0000
Resíduo	24	0,0122	32,1322	0,0000	0,3358	0,0169

\*= significativo a ao nível de 5% de probabilidade; \*\*=significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F da ANAVA. (QM) Quadrado Médio.  $\bar{G}$  %: germinação;  $\bar{t}$ : tempo médio de germinação;  $\bar{v}$ : velocidade média de germinação;  $I$ : incerteza;  $Z$ : sincronia.