

**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**

**CONSERVAÇÃO DE SEMENTES E VIABILIDADE POLÍNICA DE
Passiflora spp.**

Michele dos Santos Ferreira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2020**

CONSERVAÇÃO DE SEMENTES E VIABILIDADE POLÍNICA DE *Passiflora* spp.

Michele dos Santos Ferreira

Licenciada em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), 2018

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso 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 Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Coorientadora: Dr^a. Tatiana Góes Junghans

Coorientadora: Dr^a Taliane Leila Soares

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA

F383c Ferreira, Michele dos Santos.
Conservação de sementes e viabilidade polínica de
Passiflora spp / Michele dos Santos Ferreira._ Cruz das Almas,
BA, 2020.
83f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Fernanda Vidigal Duarte Souza
Co-Orientador: Profª. Drª. Tatiana Góes Junghans
Co-Orientador: Profª. Drª. Taliane Leila Soares

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais
e Biológicas, Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

1. Cultivo do Maracujá. 2. Grãos de Pólen 3.
Criopreservação. I.Universidade Federal do Recôncavo da
Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.
II.Título.

CDD: 634.425

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.
Responsável pela Elaboração - Neubler Nilo Ribeiro da Cunha (*Bibliotecário - CRB5/1578*)
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico)

**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**

**CONSERVAÇÃO DE SEMENTES E VIABILIDADE POLÍNICA DE
Passiflora spp.**

Comissão Organizadora da Defesa de Dissertação
Michele dos Santos Ferreira

Aprovada em 28 de maio de 2020

Prof.^a Dr^a. Fernanda Vidigal Duarte Souza
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Orientadora)

Prof.^a Dr^a. Claudinéia Regina Pelacani Cruz
Universidade Estadual de Feira de Santana
(Examinador Externo)

Prof. Dr. Everton Hilo de Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Examinador Interno)

Dedico a Deus. *“Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém.”* Romanos 11:36

Dedico aos meus pais pela confiança e investimento, e à minha irmã, por toda amizade e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que permitiu que tudo isso fosse possível. Que esteve comigo não somente nestes anos durante esse mestrado, mas que em todos os momentos da minha vida tem sido o meu maior mestre. Agradeço a Ele por mais uma etapa vencida e agradeço porque posso acreditar que muito mais Ele fará.

Agradeço os meus pais Eliene e Simpliciano por todo investimento, orações, ensinamentos e incentivo. Agradeço por poder contar com vocês na realização dos meus sonhos que são seus também.

Agradeço às minhas orientadoras Dra. Fernanda Vidigal, Dr^a Tatiana Junghans e Dr^a Taliane Soares, por todo ensinamento, compreensão e dedicação.

Agradeço à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela oportunidade concedida para a realização da Pós-Graduação, e aos professores que tive o privilégio de conhecer, em especial ao Prof Dr. Everton Hilo, por toda dedicação refletida em tudo o que faz.

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

Agradeço à Embrapa pelo espaço concedido para a realização dos experimentos e por me proporcionar grandes aprendizados!

Agradeço ao Laboratório de Conservação e Tecnologia de Sementes da Embrapa Mandioca e Fruticultura que me permitiu conhecer pessoas especiais que levarei sempre comigo. Em especial a técnica do laboratório, Tatiane Amorim, por todos esses anos de parceria na realização dos experimentos e amizade construída ao longo desses anos desde os períodos dos estágios durante minha graduação.

Agradeço aos colegas Jeanderson, Gleice, Laís, Idália, Sidnara, Rafaele e Sandra por toda colaboração e momentos de descontração que tornaram a caminhada mais leve.

Agradeço a equipe do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial ao técnico Helder Carvalho e a analista Fabiana Aud, por toda disponibilidade e ajuda para a realização dos experimentos.

Agradeço à “Equipe do Maracujá” representada pelo Dr. Onildo Nunes que tem consolidado uma equipe unida e de excelência. Obrigada por todo apoio.

Agradeço às pós-doutoras Ronilze e Eva pela troca de experiência e auxílio.

Agradeço a minha família espiritual, a Primeira Igreja Batista em São Felipe e em especial aos meus pais espirituais Ap. Marcondes e Ap^a Karina, por todos os ensinamentos, incentivo e orações. Vocês sempre farão parte das minhas conquistas!

Aos meus familiares e amigos, obrigada pela compreensão quando não pude estar presente por causa dos estudos. Obrigada por poder partilhar com vocês esse momento de gratidão e alegria.

Aos amigos que estão sempre presentes em nossas reuniões semanais realizadas em minha casa. Obrigada pelas orações e momentos tão especiais de comunhão e renovo!

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram e celebram comigo esta conquista.

Muito Obrigada!

CONSERVAÇÃO DE SEMENTES E VIABILIDADE POLÍNICA DE *Passiflora* spp.

RESUMO: *Passiflora* L. possui uma diversidade de espécies com características importantes para o melhoramento genético, tornando essencial o desenvolvimento de estratégias eficientes para conservação e manejo da cultura do maracujazeiro. Dessa forma o objetivo desse estudo foi determinar o armazenamento adequados para conservação de sementes de *Passiflora* spp.; e viabilizar a superação de dormência nessas espécies, a fim de possibilitar uma manutenção segura dos Bancos Ativos de Germoplasma de *Passiflora*. Bem como, avaliar sua viabilidade polínica, e dessa forma identificar genitores masculinos com alto potencial de fertilização para serem utilizados em cruzamentos interespecíficos e também subsidiar futuras pesquisas de criopreservação de grãos de pólen. O primeiro capítulo deste trabalho aborda a conservação e germinação de sementes de *Passiflora* spp. submetidas a duas condições de desidratação e à duas temperaturas de armazenamento, e o uso dos reguladores vegetais (GA4+7 + BA) na quebra de dormência. As sementes foram obtidas de frutos coletados no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura e submetidas ao teste de germinação em caixa do tipo Gerbox® e colocadas em câmara climatizada de germinação no escuro com temperatura alternada de 20°/30°C, durante 16-8 horas, respectivamente. A análise dos dados concluiu que as espécies *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, e *P. tenuifila*, apresentam dormência em sementes recém-colhidas. *P. suberosa*, apresenta dormência moderada e *P. edulis* Sims, não apresenta dormência em sementes recém-colhidas. Os reguladores vegetais GA4+7 + BA atuam de forma efetiva na quebra de dormência das sementes dessas espécies. As sementes aqui estudadas toleram dessecação e mantêm sua viabilidade com conteúdo de água reduzido entre 4,0 % e 6,7% e podem ser armazenadas a 5° C ou -196° C, obtendo germinação acima de 80% com uso dos reguladores vegetais. O segundo capítulo investigou um meio de cultura adequado para a germinação do grão de pólen e crescimento *in vitro* do tubo polínico de onze espécies silvestres de *Passiflora*. Adicionalmente examinou a viabilidade do pólen por meio da análise histoquímica utilizando a solução de Alexander a 2%. Para a germinação, utilizou-se os meios de cultura, BK e SM suplementado com diferentes concentrações de sacarose (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35%). Com base nos resultados obtidos *in vitro*, observou-se que a sacarose influenciou a germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico do maracujazeiro. *P. edmundoi* foi a espécie que apresentou maiores porcentagens de germinação (89.0%) e de crescimento do tubo polínico (2.6 mm) quando cultivado no meio de cultura SM suplementado com 30% e 15% de sacarose, respectivamente. Quanto à análise histoquímica verificou-se que as *Passiflora* spp. apresentaram alta porcentagem de grãos de pólen viáveis (>79.0%). Os resultados obtidos nesse trabalho podem ser aplicados a outras espécies do BAG de *Passiflora* com o intuito de fornecer informações importantes pra conservação e usos dessas espécies em programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: Maracujazeiro; Criopreservação; Grãos de Pólen, Meio de cultura.

SEED CONSERVATION AND POLLEN VIABILITY OF *Passiflora* spp.

ABSTRACT: *Passiflora* L. (passion fruit) has a diversity of species with important characteristics for genetic improvement, making it essential to develop efficient strategies for the conservation of the species and management of commercial crops. Thus, the objectives of this study were to determine an adequate storage method for the conservation of *Passiflora* spp. seeds and to overcome dormancy, to enable a safe maintenance of Active Germplasm Banks of *Passiflora* and to evaluate pollen viability to identify male parents with high fertilization potential for use in interspecific crosses and support future research of cryopreservation of pollen grains. The first chapter addresses the conservation and germination of *Passiflora* spp. subjected to two dehydration conditions and two storage temperatures, and the use of growth regulators (GA4 + 7 + BA) to break dormancy. The seeds were obtained from fruits collected in the field of the Active Germplasm Bank of Embrapa Cassava and Fruits, and were submitted germination testing in Gerbox® boxes placed in an air-conditioned germination chamber with alternating temperature of 20/30 °C and 16/8 hour photoperiod, respectively. The species *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, and *P. tenuifila* presented dormancy of freshly harvested seeds, while *P. suberosa* had moderate dormancy and *P. edulis* Sims had no dormancy in freshly harvested seeds. The growth regulators GA4 + 7 + BA were effective in breaking dormancy of these species' seeds. The seeds tolerated desiccation and maintained viability with water content between 4.0% and 6.7%, and could be stored at 5 °C or -196 °C, obtaining germination above 80% with the use of plant regulators. The second chapter investigated culture media for the *in vitro* germination of pollen grains and growth of the pollen tubes of 11 wild *Passiflora* species. In addition, we examined the viability of pollen by means of histochemical analysis using 2% Alexander solution. For germination, the culture media BK and SM supplemented with different concentrations of sucrose (5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35%) were used. The results indicated that sucrose influenced the germination of pollen grains and the growth of the pollen tubes. *P. edmundoi* was the species that presented the greatest germination rate (89.0%) and pollen tube length (2.6 mm) when grown in the SM culture medium supplemented with 30% and 15% sucrose, respectively. Regarding the histochemical analysis, *Passiflora* spp. showed a high percentage of viable pollen grains (> 79.0%). The results obtained in this work can be applied to other species of *Passiflora* in germplasm banks for the conservation and uses of these species in breeding programs.

Keywords: Passion fruit; Cryopreservation; Pollen grains, Culture medium.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Passifloraceae e o gênero <i>Passiflora</i> L.	15
2.2 Conservação de Recursos Genéticos de <i>Passiflora</i>	16
2.3 Dormência de sementes em <i>Passiflora</i> spp.....	18
2.4 Viabilidade polínica.....	20
REFERÊNCIAS	23
CONSERVAÇÃO E USO DE REGULADORES VEGETATAIS PARA SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA EM <i>Passiflora</i> spp.	31
1. INTRODUÇÃO	34
2. MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 Material Vegetal	35
2.2 Dessecação das sementes e armazenamento em nitrogênio líquido (-196° C) e em refrigerador (5° C).	36
2.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística.....	37
3. RESULTADOS	39
3.1 Dessecação e determinação do conteúdo de água das sementes.....	39
3.2 Germinação de sementes	40
4. DISCUSSÃO	47
5. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52
OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E ANÁLISE HISTOQUÍMICA DOS GRÃOS DE PÓLEN DE <i>Passiflora</i> spp.	58
1. MATERIAL E MÉTODOS	63
1.1 Material Vegetal	63
1.2 Otimização de meio de cultura para germinação de pólen <i>in vitro</i>	63
1.3 Avaliação do comprimento de tubo polínico	64
1.4 Histoquímica dos grãos de pólen.....	64
2. RESULTADOS	65
2.1 Germinação <i>in vitro</i> de grãos de pólen e comprimento do tubo polínico ...	65

2.2	Histoquímica dos grãos de pólen.....	71
3.	DISCUSSÃO	72
5.	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS.....	78
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	83

1. INTRODUÇÃO

Passiflora L. é o gênero mais representativo da família Passifloraceae Juss. ex Roussel, possui cerca de 153 espécies das quais 83 são endêmicas no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020). No entanto, poucas espécies são cultivadas comercialmente, como *Passiflora edulis* Sims (maracujá azedo) que é cultivada em 90% dos pomares e *Passiflora alata* Curtis (maracujá doce) (MUNHOZ et al., 2018).

O maracujá-azedo, que tem o Brasil como maior produtor e consumidor mundial do fruto fresco e processado (OLIVEIRA et al, 2016) configura na fruticultura uma excelente alternativa para geração de emprego e renda tanto no campo quanto na cidade (BERNACCI et al., 2005) e devido ao fácil plantio e rápido retorno financeiro, permitiu ao proprietário de agricultura familiar encontrar no maracujazeiro uma opção de renda viável, o que torna a cultura muito utilizada na agricultura familiar (MELETTI, 2011).

Segundo o IBGE, em 2019, o Brasil produziu aproximadamente 603 mil toneladas do fruto, sendo o Nordeste a região que mais participou da produção nacional, com 376 mil toneladas representando 62% da produção, e a Bahia participou com 161 mil toneladas, representando 43% da produção do nordeste e 27% da produção nacional (IBGE, 2020).

No entanto, problemas fitossanitários, como a virose do endurecimento dos frutos (SANTOS et al., 2019), bacteriose (COSTA et al., 2019), murcha de *Fusarium* (MELO et al., 2020), antracnose (COELHO et al., 2016), tem prejudicado a expansão e a produtividade do maracujazeiro, pois levam os produtores ao abandono dos pomares e conseqüentemente a desistirem do plantio dessa cultura (CARVALHO et al., 2019). Assim, a forma mais eficaz de sanar problemas como esse é a obtenção de variedades comerciais resistentes a partir do melhoramento genético (FREITAS et al., 2015; OCAMPO et al., 2016).

E são nas espécies silvestres que podem ser encontradas características singulares que as tornam essenciais para os programas de melhoramento genético, pois possuem alelos que lhes permitem adaptabilidade às mudanças climáticas, bem como resistência a pragas e doenças e assim é possível obter híbridos que apresentem frutos melhores, resistentes às doenças, que sejam utilizados como porta-

enxertos (JUNQUEIRA et al, 2005; OLIVEIRA et al., 2013; OCAMPO et al., 2016)., ou híbridos ornamentais (SOARES et al., 2015).

Dessa forma o programa de melhoramento genético desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura, tem buscado desenvolver variedades comerciais melhoradas de *P. edulis* por meio de hibridações interespecíficas com espécies silvestres de *Passiflora* (PEREIRA et al., 2019; LIMA et al., 2019). As hibridações interespecíficas, são realizadas com finalidade de melhorar agronomicamente a qualidade dos frutos (SANTOS et al., 2015) e resistência às doenças (PEREIRA et al., 2019; SANTOS et al., 2019) de *P. edulis*.

Para o contínuo desenvolvimento desses estudos, a Embrapa Mandioca e Fruticultura mantêm um Banco Ativo de Germoplasma de *Passiflora*, que abranje 45 espécies distribuídas em 343 acessos. Esses acessos são mantidos em campo e/ou sementes armazenadas em refrigerador ou câmaras frias. No entanto, tem sido observado problemas constantes voltados para a manutenção dos acessos em campo, pois as plantas estão expostas à pragas, doenças, mudanças climática e desastres naturais.

Da mesma forma, problemas são observados na conservação de sementes, pois, por apresentarem dormência e especificidades quanto ao conteúdo de água ou temperatura de armazenamento, podem perder a viabilidade ao serem armazenadas por um certo período de tempo. Além disso, a dormência em *Passiflora* spp. dificulta o teste de germinação após armazenamento e a produção uniforme de mudas para manutenção dos BAGs em campos, ou para a comercialização de mudas pelos produtores, tornando necessário estudos que busquem sanar problemas voltados tanto para o armazenamento, quanto para a quebra de dormência nas *Passifloras* spp.

Outro fator importante a ser analisado para o uso dessas espécies em programas de melhoramento genético, é selecionar os possíveis parentais masculino para realizar as hibridações. Para isso o conhecimento sobre a viabilidade e capacidade de germinação de pólen, bem como o crescimento do tubo polínico geram bons resultados para esse direcionamento seguro nas hibridações controladas (MARCELLÁN e CAMADRO, 1996; DANE et al., 2004, SALLES et al., 2006).

Trabalhos com maracujazeiros tem utilizado o meio ajustado por Soares et al. (2008), inicialmente usado para germinação de grãos de pólen de bananeira, mas gerou bons resultados em algumas espécies de maracujazeiros (SOARES et al.,

2013;). Entretanto a alta especificidade das *Passifloras*, sugere a otimização de um meio de cultura para cada espécie de maracujazeiro.

Um meio de cultura otimizado permite aumentar a eficiência na técnica de germinação de *in vitro* de grãos de pólen de *Passiflora* spp, e garante maior precisão na identificação de parentais promissores a serem utilizados nos programas de melhoramento, ou seja, permitem um direcionamento mais eficiente nos cruzamentos controlados (BENKÓ et al., 2020; GÜÇLÜ et al., 2020).

Além disso, estudos de crioconservação de pólen de diversas espécies de plantas como *Ananas comosus* L. Merrill (SILVA et al., 2017), *Lilium* (LI et al., 2019), *Paeonia suffruticosa* Andrews (REN et al., 2020), tem sido realizados, e demonstram uma forma eficiente de manter a diversidade dos BAGs, além de sanar problemas de assincronia de antese floral das espécies nas hibridações interespecíficas. Para que essa estratégia seja eficaz é necessário encontrara uma forma eficiente, rápida e confiável para avaliar a viabilidade polínica do material antes e após ciopreservado. Assim, a otimização do meio de cultura também consite em uma etapa importante para estaratégias de crioconservação de grãos de pólen de *Passiflora* spp.

Isso evidencia que os estudos voltados para as características das espécies de *Passiflora* L. e a conservação desse germoplasma, configuram ferramentas necessárias e fundamentais para os programas de melhoramento genético da cultura, pois permitirão um manejo mais adequando desses recursos genéticos vegetais, evitando assim, a erosão genética, que consequentemente garante a disponibilidades dessas espécies para futuras pesquisas.

Dessa forma o objetivo desse estudo foi determinar o conteúdo de água e temperatura de armazenamento adequados para conservação de sementes de *Passiflora* spp.; e viabilizar a superação de dormência nessas espécies, a fim de possibilitar uma manutenção segura dos Bancos Ativos de Germoplasma de *Passiflora*. Assim como, avaliar sua viabilidade polínica, e dessa forma identificar genitores masculinos com alto potencial de fertilização para serem utilizados em cruzamentos interespecíficos e também subsidiar futuras pesquisas de criopreservação do pólen.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Passifloraceae e o gênero *Passiflora* L.

Passifloraceae Juss. ex Roussel pertence a ordem Malpighiales, possui 16 gêneros e aproximadamente 700 espécies (MUNHOZ et al, 2018). Se diferenciam especialmente das demais famílias desta ordem por possuírem filamentos na coroa (JUDD, 2009). São nativas principalmente das regiões tropicais (REZAZADEH et al., 2018). Com ocorrência de 161 espécies distribuídas em todas as regiões do Brasil, dessas, 89 são endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2020).

Em geral, as Passifloraceae são subarbusto, trepadeiras ou lianas com gavinhas axilares, possuem crescimento secundário irregular, ocasionalmente arbustos ou árvores (OCAMPO et al., 2016). Geralmente possuem flores bissexuais, radiais e cinco sépalas frequentemente petaloides e cinco pétalas livres, imbricadas (JUDD, 2009).

Apresentam coroa complexa organizada no ápice e na superfície interna do hipanto, formando um ou mais fileiras de filamento (JUDD, 2009). Geralmente apresentam os cinco estames junto ao gineceu (androgínóforo), filetes geralmente livres, grãos de pólen tri a 12-colpados; parte feminina geralmente com três estigmas; placentação parietal com numerosos óvulos por placenta; sementes geralmente achatadas com arilo carnoso (JUDD, 2009). Possuem folhas alternas espiraladas simples, lobadas com nectários extraflorais no pecíolo ou lâmina, com ou sem estípula, podendo ter margem inteira ou serrada, estípulas geralmente presentes (LORENZI; SOUZA, 2008).

No Brasil, a família Passifloraceae é representada por quatro gêneros: *Ancistrothyrus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L., (FLORA DO BRASIL, 2020), sendo este último o mais reconhecido devido a sua grande diversidade, importância econômica, propriedades de interesse nutricional, farmacêutico (YOCKTENG et al.2011) e ornamental (SOARES et al., 2015). Possui cerca de 570 espécies das quais 153 são encontradas no Brasil e 85 são endêmicas, é dividido em cinco subgêneros: *Astrophea* (Ohwi) Rchb, *Cieca* Medik, *Decaloba* (DC.) M. Roem, *Tetrastylis* Barb Rodr, *Passiflora* Raf. (FLORA DO BRASIL, 2020).

Entre as angiospermas, é o gênero de maior diversidade em forma de folhas e flores, que variam muito em tamanho e cor, com uma coroa complexa constituída de vários filamentos e o perianto diversificado (MUSCHNER et al., 2003).

Suas flores são geralmente grandes e perfumadas que produzem uma grande quantidade de néctar e pólen, facilitando a chegada de insetos para polinização cruzada (ABRAHAMCZYK et al. 2014). Essa é uma característica importante, pois em sua maioria são autoincompatíveis, tornando necessária a polinização cruzada, que é realizada principalmente por abelhas, assim como por aves e várias espécies de morcegos (ABRAHAMCZYK et al. 2014)

2.2 Conservação de Recursos Genéticos de *Passiflora*

Tratando-se de espécies de *Passiflora*, os bancos de germoplasma em condições de campo têm sido a forma mais tradicional de conservação (ENGELMANN, 2004; MELETTI et al., 2007). No entanto, tem como desvantagem a influência direta de fatores bióticos, como pragas e enfermidades e fatores abióticos, como mudanças climáticas, desastres naturais, etc. (ENGELMANN, 2004; MELETTI et al., 2007)

Outra forma muito utilizada de conservação do maracujazeiro é o armazenamento de sementes, visto que, sua principal forma de propagação é via sementes (CARLESSO et al., 2008; TEIXEIRA et al, 2016; FALEIRO et al., 2019). Quando armazenadas corretamente, as sementes mantêm a viabilidade por um longo período de tempo (NASCIMENTO et al., 2015) e por isso a importância do manejo adequado dos bancos de sementes.

Para que esse manejo seja eficiente, o conhecimento sobre a germinação e formas de armazenamento são fundamentais, pois permite que esses acessos sejam mantidos em segurança e viáveis para seu uso futuro, em especial para o melhoramento genético (JUNGHANS; JUNGHANS, 2016; FALEIRO et al., 2019).

Neste tipo de conservação, o controle de fatores como qualidade, conteúdo de água das sementes ou embalagem de armazenamento são fundamentais para reduzir o processo de deterioração das mesmas. Assim, esse conhecimento prévio e estabelecidas as condições mais adequadas favorecem a manutenção das sementes,

garantindo que a viabilidade seja mantida por períodos mais prolongados (MARTINS et al., 2005; FALEIRO et al., 2011).

Para um bom protocolo de armazenamento, a classificação fisiológica das sementes é fundamental. Assim, quanto à tolerância à dessecação e baixas temperaturas, elas podem ser classificadas em ortodoxas, intermediárias e recalcitrantes (ROBERTS; ELLIS, 1973; ELLIS et al., 1990; MAYRINCK et al., 2016).

As sementes ortodoxas compreendem aquelas que podem tolerar maior desidratação (entre 2% e 5% de conteúdo de água) e baixo grau de temperatura de armazenamento (podendo ser abaixo de -18°C); as intermediárias possuem sensibilidade quanto ao armazenamento em temperaturas abaixo de zero e toleram dessecação parcial; sementes recalcitrantes perdem sua viabilidade ao atingir 12% a 31% de conteúdo de água (ELLIS et al., 1990; MAYRINCK et al., 2016).

Assim, no armazenamento de sementes em freezer ou câmaras frias, o conteúdo de água acima de 20%, tem demonstrado ser inapropriado, no caso de temperaturas positivas, pois diminui o poder germinativo, em virtude das atividades respiratórias permanecerem ativas, acarretando em consumo das reservas da semente, além de estabelecer um ambiente que favorece o surgimento de agentes patogênicos (DESAI et al., 1997).

No caso de temperaturas negativas, incluindo a criopreservação, a importância na diminuição do conteúdo de água das sementes conservadas, tem a finalidade de evitar a formação de cristais de gelo no interior das células, que podem ocasionar o rompimento e outras degenerações da membrana celular (ENGELMANN, 2004; KAMI, 2012). Esses danos celulares podem ser comuns também em estruturas como ápices caulinares (SOUZA et al., 2016) e grãos de pólen quando não submetidos à desidratação antes do congelamento (SOUZA et al., 2015; SILVA et al., 2017). Por isso, para protocolos de criopreservação é essencial uma dessecação adequada do material a ser conservado.

Na criopreservação, em virtude da baixa temperatura (-196°C) as atividades metabólicas celulares são drasticamente reduzidas, levando a uma diminuição na deterioração fisiológica do material biológico, permitindo, nesta condição, períodos prolongados de armazenamento (KARTHA, 1985; CRUZ-CRUZ et al., 2013; VENDRAME et al., 2014).

Muitos estudos sobre criopreservação de sementes de *Passiflora* têm sido realizados (MELETTI et al., 2007; GONZÁLEZ-BENITO et al., 2009; VEIGA-BARBOSA et al., 2013; GENEROSO et al., 2019). Esses estudos deixam evidente que o conteúdo de água das sementes é um fator crítico para o êxito do protocolo de criopreservação, especialmente quando as sementes são intermediárias ou recalcitrantes (OSPINA et al., 2000; VEIGA-BARBOSA et al., 2013), pois um elevado conteúdo de água pode induzir a formação de cristais de gelo ou conteúdo de água muito baixo pode danificar o embrião.

Dessa forma, considerando o elevado nível de especificidade, de algumas espécies de *Passiflora*, a realização de ensaios para determinar as melhores condições para conservar essas espécies é relevante e recomendado. A Embrapa Mandioca e Fruticultura tem como objetivo consolidar estratégias que consolidem o germoplasma de *Passiflora*, por meio da conservação de sementes, e de grãos de pólen de maracujazeiros.

A crioconservação de grãos de pólen tem sido muito empregada para várias espécies como *Ananas comosus* L. Merrill (SOUZA et al., 2018, 2017), *Lilium* (LI et al., 2019), *Paeonia suffruticosa* Andrews (REN et al., 2020), no entanto, para *Passiflora* spp., ainda não há na literatura relatos sobre esse tipo de conservação. Dessa forma, esforços têm sido empregados a fim de estabelecer um protocolo de crioconservação de grão de pólen de *Passiflora* spp. a fim de ampliar o banco genético e promover novas possibilidades aos programas de melhoramento genético do gênero, como conservar parentais masculinos para hibridações interespecíficas, ou sanar problemas com assincronia de florescimento ou antese floral.

2.3 Dormência de sementes em *Passiflora* spp.

A dormência de sementes, estrategicamente, serve para a distribuição da germinação ao longo do tempo, constituindo-se em uma estratégia para aumentar as possibilidades de sobrevivência das espécies (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006). Entretanto, embora seja um processo benéfico em condições naturais (FINCH-SAVAGE; LEUBNER-METZGER, 2006) tem como desvantagem a irregularidade da germinação, longos períodos para seu rompimento, dificultando

atividades como produção de mudas, avaliações experimentais, podendo impactar nos programas de melhoramento genético.

A dormência de sementes é um mecanismo fisiológico e adaptativo, no qual, embora o ambiente esteja favorável, as sementes não germinam ou apresentam germinação lenta. Esse mecanismo atrasa a germinação ou faz com que ela ocorra ao longo do tempo a fim de perpetuar a espécie, e é mais comum em espécies silvestres, ou seja, que não passaram por processo de domesticação (FALEIRO et al., 2019). A dormência das sementes não as torna inviáveis, mas indica que elas precisam ser submetidas a determinadas condições para que possam germinar.

As principais categorias para dormência das sementes são: exógena e endógena. A primeira é causada por fatores externos ao embrião como: dormência física (revestimento impermeável), dormência mecânica (revestimento que impede a expansão do embrião) e dormência química (presença de inibidores no revestimento da semente, exemplo: arilo, nos maracujazeiros) (DELANOY et al., 2006; REZAZADEH; STAFNE, 2018). A segunda ocorre devido a fatores no embrião, como: embrião fisiologicamente imaturo ou rudimentar (BEWLEY; BLACK M, 1994). Podem ocorrer também dormência primária ou natural, representada por características inerentes à semente; e secundária ou induzida, causada por condições desfavoráveis à germinação (VIVIAN et al., 2008).

Quanto ao gênero *Passiflora*, vários trabalhos demonstraram dormência em diferentes espécies, com sementes que germinam lentamente ou com baixas porcentagens de germinação, características de sementes que possuem dormência (REGO et al., 2014; REZAZADEH; STAFNE et al., 2018; FALEIRO et al., 2019). Delanoy et al., (2006) em trabalhos realizados com maracujazeiros, relataram a baixa germinação e irregularidade na formação de mudas, podendo ocorrer de dez dias a três meses.

Dentre as estratégias para quebra de dormência em sementes de maracujazeiros, registros mostram o uso de: escarificação (DELANOY et al., 2006; ARAÚJO et al., 2016), imersão em água por vários dias, fermentação em solução de sacarose (REZAZADEH; STAFNE, 2018); remoção do arilo, armazenamento por vários meses (PURSEGLOVE, 1979, NEGREIROS et al., 2006; MOURA et al., 2018) com resultados positivos para muitas espécies e métodos utilizados. No entanto, os resultados têm se mostrado inconsistentes, já que muitas vezes é preciso testar vários

métodos, considerando ainda que cada espécie pode requerer diferentes tratamentos (REZAZADEH; STAFNE, 2018).

Rezazadeh e Stafne (2018) ressaltam que os resultados para trabalhos de quebra de dormência de sementes de *Passiflora* spp., têm se mostrado inconsistentes, fazendo-se entender que vários métodos precisam ser testados, afim de se estabelecer um protocolo eficiente, ou seja, que garanta o máximo de germinação, pois cada espécie pode responder de forma diferente a cada tipo de tratamento.

Contudo, trabalhos têm sugerido o uso de reguladores vegetais para espécies de *Passiflora* com a finalidade de quebrar a dormência. A combinação de ácido giberélico nº 4 e 7 + 6 – benziladenina (GA₄₊₇ + BA), tem se mostrado eficaz na quebra de dormência de espécies de *Passiflora* pois seu uso tem resultado no aumento da taxa e uniformidade de germinação (SANTOS et al., 2016; MOURA et al., 2018; JUNGHANS et al., 2019). Os reguladores vegetais atuam em especial na expressão gênica de enzimas hidrolíticas responsáveis por enfraquecimento do tegumento (TAIZ et al., 2017) e degradação de substâncias de reserva (REGO et al., 2018), isso torna favorável o retorno do crescimento para o embrião (CASTRO et al., 2005).

2.4 Viabilidade polínica

O conhecimento germinativo do grão de pólen é essencial para estudos variados, que vão desde aspectos aplicados da biologia do pólen, estudos reprodutivos, até aqueles direcionados tanto ao melhoramento genético e conservação de alelos (GANESHAN et al., 2008).

A viabilidade polínica, medida por meio da germinação do pólen e do crescimento do tubo polínico é um importante indicador de potenciais parentais em programas de melhoramento genético (RIGAMOTO; TYAGI, 2002; RODRIGUEZ-RIANO; DAFNI, 2000; PIO et al., 2004; BENKÓ et al., 2020; GÜÇLÜ et al., 2020). Por outro lado, ter uma forma de avaliar a viabilidade do pólen nos possibilita a realização de ensaios para sua criopreservação, uma vez que é uma condição para a realização de várias etapas, como a desidratação antes do congelamento e avaliação de sobrevivência após a imersão em nitrogênio líquido. A conservação do pólen, por sua vez, além de significar, a manutenção de alelos, pode ser uma ferramenta significativa

para contornar a assincronia de florescimento, uma barreira comum em programas de melhoramento genético (GANESHAN et al., 2008).

Os métodos de testar a viabilidade polínica podem ser de três formas: por meio de testes histoquímicos; germinação *in vitro* (ROSBAKH; POSCHLOD, 2016; NOVARA et al., 2017, TELLO et al., 2018; IMPE et al., 2020) e germinação *in vivo*, obtendo a porcentagem de frutificação efetiva e formação de sementes (CHEN; FANG, 2016; TELLO et al., 2018; IMPE et al., 2020).

Os testes histoquímicos são realizados com corantes químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes no grão de pólen. Dentre estes, destacam-se lugol (DAFNI, 1992; PAGLIARINI; POZZOBON, 2004), cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), solução de Alexander e carmim acético (NOVARA et al., 2017).

A solução de Alexander dispõe de uma solução tripla composta por orange G (intensificador), fucsina ácida e verde malaquita (ALEXANDER, 1980). Nesses métodos os grãos de pólen viáveis são corados com a fucsina ácida, pois ela reage com o protoplasma, fornecendo ao grão de pólen uma coloração roxa; o verde malaquita reage com a parede celular, corando-a de verde.

Os testes histoquímicos, embora forneça estimativas importantes sobre os componentes celulares e a integridade dos grãos de pólen, não fornecem informações precisas sobre capacidade germinativa dos grãos (ALEXANDER, 2019). Da mesma forma, alguns corantes detectam substâncias constituintes dos grãos de pólen (como amido e lipídios), que podem estar presentes tanto em grãos de pólen viáveis quanto inviáveis (KING, 1960; RODRIGUEZRIANO; DAFNI, 2000; ALEXANDER, 2019).

Em vista disso, informações mais precisas sobre a capacidade germinativa dos grãos de pólen podem ser obtidas por meio de testes de germinação *in vitro*. A germinação *in vitro* dos grãos de pólen permite analisar a capacidade de emissão do tubo polínico, pois simula as condições do estigma, induzindo a germinação do tubo polínico (SOARES et al., 2013; PEREIRA et al., 2018). Essa metodologia tem sido considerada eficaz, prática e rápida para estimar a viabilidade dos grãos de pólen em muitas espécies.

Vários compostos orgânicos e inorgânicos interferem na germinação *in vitro*. Essencialmente, para uma boa germinação e crescimento de tubo polínico, o meio de cultura deve conter uma fonte de carbono, boro e outros nutrientes (GALLETTA, 1983). Diversas espécies necessitam de um meio mais completo, como é o caso do

maracujazeiro, cujo grão de pólen requer diferentes componentes do meio e também diferentes concentrações desses componentes para a sua germinação e crescimento do tubo polínico (SOARES et al., 2018).

Stanley e Linskens (1974) citam que boro, cálcio e magnésio, dentre outros nutrientes, fazem parte da composição do tecido estilar ou do fluído estigmático, no qual proporcionam um ambiente mais próximo ao natural para a germinação do pólen. Segundo Dhar (1983) e Eenik (1983) a composição do meio de cultura deve ser formada por nutrientes que, em sua maioria, estão presentes *in natura* no ambiente de germinação, pois proporcionará um ambiente mais próximo ao real para que possa ocorrer a germinação. Dentre estes componentes, a sacarose se destaca por proporcionar um equilíbrio osmótico entre o pólen e a solução do meio de germinação e fornecer energia para auxiliar na germinação e no rápido desenvolvimento do tubo polínico (Lin et al., 2017; Li et al., 2020).

Uma das grandes dificuldades em se ajustar meios de cultura para germinação de pólen é o elevado nível de especificidade das respostas das diferentes espécies e até mesmo genótipos. Ramos et al. (2008) relataram que cada espécie pode requerer um protocolo específico de meio de cultura para obter germinação adequada dos grãos de pólen, até mesmo diferentes genótipos em uma mesma espécie podem requerer diferentes ajustes.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMCZYK, S; SOUTO, D; RENNER, S.S. Escape from extreme specialization: passionflowers, bats and the swordbilled hummingbird. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 281, n. 1795, p. 20140888, 2014.
- ALEXANDER, L.W. Optimizing pollen germination and pollen viability estimates for *Hydrangea macrophylla*, *Dichroa febrifuga*, and their hybrids, **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 246, p. 244-250. 2019.
- ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technol**, Bangalore, v. 55, n. 1, p. 13-18, 1980.
- ARAÚJO, D. S; LUZ, P. B., NEVES, L. G.; PAIVA SOBRINHO, S. Seed cryopreservation of *Passiflora* species. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, n. 3, p. 248-253, 2016.
- BENKÓ, P., JEE, S., KASZLER, N., FEHÉR, A., GÉMES, K. Polyamines treatment during pollen germination and pollen tube elongation in tobacco modulate reactive oxygen species and nitric oxide homeostasis. **Journal of Plant Physiology**, Oxford, v. 22, p. 1-7, 2020.
- BERNACCI, L.C.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; PASSOS, I.R.S. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. org. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa Cerrados, Planaltina, v.1, p. 559-586, 2005.
- BEWLEY, J.D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**. Plenum Press, New York, v. 15, n.2, p.451, 1994.
- BEYHAN, N.; SERDAR, U. Assessment of pollen viability and germinability in some European chestnut genotypes (*Castanea sativa* L.). **Horticultural Science**, Hoboken, v. 35, p. 171–178, 2008.
- CARLESSO, V.O; BERBERT, P. A.; SILVA, R. F.; DETMANN, E. Secagem e armazenamento de sementes de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, vol.30, n.2, pp.65-74, 2008.
- CARVALHO, B.M., VIANA, A.P., SANTOS, P.H.D., GENEROSO, A.L., CORRÊA, C.C.G., SILVEIRA, V., SANTOS, E. A. Proteome of resistant and susceptible *Passiflora* species in the interaction with *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals distinct responses to pathogenesis. **Euphytica**, Dordrecht, v. 215, p.1-17, 2019.
- CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Agronômica Ceres, Piracicaba, 640p. 2005.
- CHEN, J. C.; FANG, S. C. The long pollen tube journey and *in vitro* pollen germination of *Phalaenopsis* orchids. **Plant Reproduction**, Heidelberg, v. 29, p. 179-188, 2016.

COELHO, M.S.E., BORTOLETI, K.C.A. , ARAÚJO, F.P., MELO, N.F. Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrid and its parentes. **Euphytica**, Dordrecht, v. 210, p. 93–104, 2016.

COSTA, A.P., PEIXOTO, J.R., BLUM, L.E.B. VILELA, M.S., VENDRAME, W. Development and validation of a standard area diagram set as assessment aid for estimating the severity of bacterial spot on tri-lobed leaves of yellow passion fruit. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 35, p.1728-1746, 2019.

CRUZ-CRUZ, C. A.; GONZÁLES-ARNÃO, M.T.; ENGELMANN, F. Biotechnology and conservation of plant biodiversity. **Resources**, Washington, v.2, n.2, p. 73 - 95, 2013.

DAFNI, A., **Pollination ecology: a practical approach**. University Press, Oxford, p. 250, 1992.

DANE, F.; OLGUN G.; E DALGIÇ, O. *In vitro* pollen germination of some plant species in basic culture medium. **Journal of Cell & Molecular Biology**, Maryland, v. 3, n. 2, 2004.

DELANOY, M.; VAN DAMME, P.; SCHELDEMAN, X.; BELTRAN, J. Germination of *Passiflora molíssima* (Kunth) L.H.Bailey, *Passiflora tricuspidata* Mast. and *Passiflora* nov sp. seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.110, p.198-203, 2006.

DESAI, B. B.; KOTECHA, P. M.; SALUNKHE, D. K. **Seeds handbook biology, production, processing and storage**. Marcel Dekker, New York, v. 6. n.1, p.627, 1997.

DHAR, A.K. *In vitro* germination and pollen tube growth of beladonna (*Alropa belladonna*, L.) **Crop Improvement**, Cambridge, v.10, n.2, p.142-144,1983.

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

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

ENIK, A. H. Preliminary results of research on storage and "*in vitro*" germination of lettuce pollen as an aid in lettuce breeding. **Euphytica**, Wageningen, v.32, p.521-526, 1983.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNGHANS, T. G.; JESUS, O. N. D.; MIRANDA, D.; OTONI, W. C. Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 41, n. 2, p. 1-17, 2019.

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**. Embrapa Cerrados, Planaltina, v. 307, n.1, p. 36, 2011.

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, Oxford, v. 171, n. 3, p. 501-523, 2006.

FREITAS, J.C.O.; VIANA, A.P.; SANTOS, E.A.; SILVA, F.H.; PAIVA, C.L.; RODRIGUES, R.; SOUZA, M.M.; EIRAS, M. Genetic basis of the resistance of a passion fruit segregant population to Cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV). **Tropical Plant Pathology**, Heidelberg, v. 40, p. 291-297, 2015.

GALLETTA, G. J. Pollen and seed management. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (ed.) **Methods in fruit breeding**. Indiana: Purdue University Press, p. 23-47, 1983.

GANESHAN, S.; RAJASEKHARAN, P. E.; SHASHIKUMAR, S.; DECRUZE, W. Cryopreservation of pollen. In: REED, B.M. (Ed.). **Plant cryopreservation: a practical guide**. Springer, New York, p. 443-447, 2008.

GENEROSO, A. L.; CARVALHO, V. S.; WALTER, R., CAMPBELL; G., DA SILVA ARAÚJO; L., SANTANA, J. G. S.; DA CUNHA, M. Mature-embryo culture in the cryopreservation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 256, p. 108638, 2019.

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

GÜÇLÜ, S.F., ÖNCÜ, Z., KOYUNCU, F. Pollen performance modelling with an artificial neural network on commercial stone fruit cultivars. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, Heidelberg, v. 61, p. 1-17, 2020.

HASNUNNAHAR, M., KHAN, M. R., & ISSHIKI, S., Inheritance analysis of fertility restoration genes (Rf) in a male sterile system of eggplant using cytoplasm of *Solanum grandifolium*. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v.6, n. 3, p. 475-479, 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=4&z=t&o=11&u1=1&u2=27&u3=1&u=27&u5=1&u6=1> Acesso em: 15 fev. 2020.

IMPE, D., REITZ, J., KÖPNIC, C., ROLLETSCHEK, H., BÖRNER, A., SENULA, A., NAGEL, M. Assessment of pollen viability for wheat. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.10, p.1-13. 2020.

JAYAPRAKASH, P.; SARLA, N. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. pollen *in vitro*. **Journal of experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 357, p. 851-855, 2001.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. Artmed Editora, Porto Alegre, v. 13, n.3, 2009.

JUNGHANS, T. G, COSTA, A.M, SOUZA, J. D. M., & de SOUZA, L. R. Armazenamento, grau de umidade e reguladores de crescimento na superação da dormência de sementes de *Passiflora tenuifila*. **Embrapa Mandioca e Fruticultura, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Cruz das Almas, n. 103, p.17, 2019.

JUNGHANS, T. G.; JUNGHANS, D. T. Conservação de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) para fins de manutenção de germoplasma. **Embrapa Mandioca e Fruticultura, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Cruz das Almas, n. 81, p. 19, 2016.

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

KAMI, D. Cryopreservation of Plant Genetic Resources. In: KATKOV, I. **Current frontiers in cryobiology**. In Tech, Japan, v.1, n.1, p.439-456. 2012.

KARTHA, K. K. Meristem culture and germplasm preservation. In: Kartha, K. K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Rota, v. n.1, p.115-134, 1985.

KING, J. R. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. **Stain technology**, Baltimore, v. 35, p.225-7, 1960.

LI, C., MENG, D., PIÑEROS, M.I.A., MAO, Y., DANDEKAR, A.M., CHENGA, L. A sugar transporter takes up both hexose and sucrose for sorbitol-modulated *in vitro* pollen tube growth in apple. **The Plant Cell**. 32, p. 449–469, 2020.

LI, J.-W., ZHANG, X.-C., WANG, M.-R., BI, W.-L., FAISAL, M., SILVA, J.A.T., VOLK, G.M., WANG, Q.-C. Development, progress and future prospects in cryobiotechnology of *Lilium* spp. **Plant Methods**, Heidelberg, v.15, p.1-12. 2019.

LIMA, L.K. S., JESUS, O.N., SOARES, T.L., SANTOS, I.S., OLIVEIRA, E.J., COELHO FILHO, M.A. Growth, physiological, anatomical and nutritional responses of two phenotypically distinct passion fruit species (*Passiflora* L.) and their hybrid under saline conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 263, p. 1-15, 2019.

LIN, Y., WANG, Y., IQBAL, A., SHI, P., LI, J., YANG, Y., LEI, X. Optimization of culture medium and temperature for the *in vitro* germination of oil palm pollen. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 220, 134–138. 2017.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, v. 1, n.2 p. 640, 2008.

MARCELLÁN, O. N. e CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 67, n. 1-2, p. 101-104, 1996.

MARTINS, L.; SILVA, W.R.; MELETTI, L. M. M.; Conservação de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* SIMS F. *flavicarpa* DEG.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 1, p.183-189, 2005.

MAYRINCK, R. C.; VAZ, T. A. A.; DAVIDE, A. C.; Physiological classification of forest seeds regarding to the desiccation tolerance and storage behaviour. **CERNE**, Lavras, v. 22 n. 1, p. 85-92, 2016.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 83-91, 2011.

MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. A.; PIOR, R. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Revista Scientia Agrária Paranaensis**, Rondon, v.6, n.1, p.13-20, 2007.

MELO, N.J.A., NEGREIROS, A.M.P., MEDEIROS, H.L.S., SALES JÚNIOR, R. Evaluation of *Fusarium* wilt disease in passion fruit species inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v.168, p. 81–87, 2020.

MOURA, R. S.; COELHO FILHO, M. A.; GHEYI, H. R.; JESUS, O. N.; LIMA, L. K. S.; JUNGHANS, T. G. Overcoming dormancy in stored and recently harvested *Passiflora cincinnata* seeds. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 34, n. 5, p. 1158-1166, 2018.

MUNHOZ, C.F., COSTA, Z.P., CAUZ-SANTOS, L.A., REÁTEGUI, A.C.E., RODDE, N., CAUET, S., DORNELAS, M.C., LEROY, P., VARANI, A.M., BERGÈS, H., VIEIRA, M.L.C. A gene-rich fraction analysis of the *Passiflora edulis* genome reveals highly conserved microsyntenic regions with two related Malpighiales species. **Scientific reports**, Londres, v. 8, n. 1, p. 1-18, 2018.

MUSCHNER, V.C.; LORENZ, A.P.; CERVI, A.C.; BONATTO, S.L.; SOUZA-CHIES, T.T.; SALZANO, F.M.; FREITAS, L. B. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, Philadelphia, v. 90, n. 8, 1229-1238, 2003.

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

NEGREIROS, J.R.S.; WAGNER JÚNIOR, A.; ÁLVARES, V.S.; SILVA, J.O.C.; NUNES, E.S.; ALEXANDRE, R.S.; PIMENTEL, L.D.; BRUCKNER, C.H. Influência do estágio de maturação e do armazenamento pós-colheita na germinação e desenvolvimento inicial do maracujazeiro amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28 p.21-24, 2006.

NOVARA, C., ASCARI, L., LA MORGIA, V., REALE, L., GENRE, A., SINISCALCO, C. Viability and germinability in long term storage of *Corylus avellana* pollen. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 214, p. 295–303, 2017.

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

OLIVEIRA, D.A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S.R.S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: sustainable recovery and biological activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 111, p. 55-62, 2016.

OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; BARBOSA, C.J.; SANTOS-FILHO, H.P.; JESUS, O.N. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, p. 485-492, 2013.

OSPINA, J.A.; GUEVARA, C.L.; CAICEDO, L.E.; BARNEY, V. Effects of moisture content on *Passiflora* seed viability after immersion in liquid nitrogen. **JIRCAS International Agriculture Series**, Tsukuba, v. 8, p. 378-381, 2000.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, T. Meiose em vegetais: um enfoque para a caracterização de germoplasma. In: Curso de Genética Aplicado a Recursos Vegetais. **Embrapa recursos genéticos biotecnologia- Documentos**, Brasília, p. 24-41, 2004.

Passiflora in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 29 mai, 2020.

PEREIRA, M.R., RIBEIRO, H., CUNHA, M., ABREU, I. Comparison of pollen quality in *Vitis vinifera* L. cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 227, 112–116. 2018.

PEREIRA, P.P.A., LIMA, L.K.S., SOARES, T.L., LARANJEIRA, F.F., JESUS, O.N., GIRARDI, E.A. Initial vegetative growth and survival analysis for the assessment of *Fusarium* wilt resistance in *Passiflora* spp. **Crop Protection**, Oxford, v. 121, p. 195-203, 2019.

PIO, L. A. S. et al. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, p. 293-296, 2004.

PURSEGLOVE, J.W. **Tropical Crops: Dicotyledons**. Longman, London, n. 5, v.5, p. 719, 1979.

RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; SALLES, L. A.; CHAGAS, E. A.; PIO, R. Receptividade do estigma e ajuste de protocolo para germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Interciência**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 51-55, 2008.

REGO, M.M.; REGO, E.R.; NATTRODT, L.P.U.; BARROSO, P.A.; FINGER, F.L.; OTONI, W. C. Evaluation of different methods to overcome *in vitro* seed dormancy from yellow passion fruit. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.13, n.36, p.3657-3665, 2014.

REN, R., LI, Z., ZHANG, L., ZHOU, H., JIANG, X., LIU, Y. Enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems impact the viability of cryopreserved *Paeonia suffruticosa* pollen. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Cham, v.140, p.1-14. 2020.

REZAZADEH, A.; STAFNE, E. T. Comparison of Seed Treatments on the Germination of Seven Passion Fruit Species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamil Nadu, v. 7, n. 11, p. 3074-3083, 2018.

RIGAMOTO, R. R.; TYAGI, A. P. Pollen fertility status in coastal plant species of Rotuma Island. **The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences**, Suva, v. 20, n. 1, p. 30-33, 2002.

ROBERTS, E.H.; ELLIS, R.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n.2, p.499-514, 1973.

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to assess pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, New York, v. 12, p. 241-244, 2000.

ROSBAKH, S; POSCHLOD, P. Minimal temperature of pollen germination controls species distribution along a temperature gradient. **Annals of botany**, Oxford, v. 117, n. 7, p. 1111-1120, 2016.

SALLES, L. A.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; JUNQUEIRA, K. P. e SILVA, A. B. Sucrose e pH na germinação *in vitro* de grãos de pólen de citros. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 170-174, 2006.

SANTOS, C.H.B.; CRUZ NETO, A.J.; JUNGHANS, T.G.; JESUS, O.N.; GIRARDI, E.A. Estádio de maturação de frutos e influência de ácido giberélico na emergência e crescimento de *Passiflora* spp. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n.3, p.481-490, 2016.

SANTOS, E.A., VIANA, A.P., FREITAS, J. C. O., RODRIGUES, D.L., FERREIRA, R.T., PAIVA, C.L., SOUZA, M.M. Genotype selection by REML/BLUP methodology in a segregating population from an interspecific *Passiflora* spp crossing. **Euphytica**, Dordrecht, v. 204, p. 1–11, 2015.

SANTOS, V.O.D., VIANA, A.P., PREISIGKE, S.D. C., SANTOS, E.A. Characterization of a segregating population of passion fruit with resistance to *Cowpea aphid borne mosaic virus* through morpho-agronomic descriptors. **Genetics and Molecular Research**, Londres, v.18, p.1-13, 2019.

SILVA, R. L.; SOUZA, E. H.; VIEIRA, L. J.; PELACANI, C. R.; SOUZA, F. V. D. Cryopreservation of pollen of wild pineapple accessions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 219, p. 326-334, 2017.

SOARES, T.L, JESUS, O.N., SANTOS-SEREJO, J.A., OLIVEIRA, E.J. *In vitro* pollen germination and pollen viability in passion fruit (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n.3, p. 1116-1126, 2013.

SOARES, T.L, JESUS, O.N., SOUZA, E.H., OLIVEIRA, E.J. Reproductive biology and pollen-pistil interactions in *Passiflora* species with ornamental potential. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 197, p. 339-349, 2015.

SOARES, T.L., JESUS, O.N., SOUZA, E.H., OLIVEIRA, E.J. Floral development stage and its implications for the reproductive success of *Passiflora*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 238, p. 333–342. 2018.

SOARES, T.L., SILVA, S.O., COSTA, M.A.P.C., SANTOS-SEREJO, J.A., SOUZA, A.S., LINO, L.S.M., SOUZA, E.H., JESUS, O.N. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 111-118, 2008.

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**, Dordrecht, v. 204, n. 1, p. 13-28, 2015.

SOUZA, E.H., SOUZA, F.V.D., ROSSI, M.L., PACKER, R.M., CRUZ-BARROS, M.A., MARTINELLI, A.P. Pollen morphology and viability in Bromeliaceae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.89, n.4, p. 3067-3082. 2017.

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)**, Cham, v. 124, n. 2, p. 351-360, 2016.

SOUZA, F.V.D., SOUZA, E.H., KAYA, E., VIEIRA, L.J., SILVA, R.L. Cryopreservation of pineapple shoot tips by the droplet vitrification technique. **Methods in Molecular Biology**. New York, v.1815, p. 269–277. 2018.

STANLEY,R.G.;LINSKENS,H.F. Pollen Biology Biochemistry Management. **Springer**, Berlin, v. 7, p. 307, 1974.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, J.M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. Porto Alegre, Artmed, v. 6. p. 858, 2017.

TEIXEIRA, M.C.; MADER, G.; SILVA-ARIAS, G.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B. Effects of past climate on *Passiflora actinia* (Passifloraceae) populations and insights into future species management in the Brazilian Atlantic forest. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London v.180, n.3, p.348-364, 2016.

TELLO, J., MONTEMAYOR, M.I., FORNECK, A., IBÁÑEZ, J. A new image-based tool for the high throughput phenotyping of pollen viability: evaluation of inter- and intra-cultivar diversity in grapevine. **Plant Methods**, Heidelberg, v. 14, 1-17, 2018.

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.

VENDRAME, W., FARIA, R. T. D., SORACE, M., & SAHYUN, S. A. Orchid cryopreservation. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 3, p. 213-229, 2014.

VIVIAN, R.; SILVA, A. A.; GIMENES, J.; FAGAN, E. B.; RUIZ, S. T.; LABONIA, V. Dormência em sementes de plantas daninhas como mecanismo de sobrevivência: breve revisão. **Planta Daninha**, Viçosa, v.26, n.3, p.695-706, 2008.

YOCKTENG, R; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G; SOUZA-CHIES, T. *Passiflora*. In: KOLE, C. (ed) **Wild crop relatives: genomic and breeding resources tropical and subtropical fruits**. Springer, Berlin and Heidelberg, v. 23, n.1, p. 256, 2011.

CAPÍTULO I

CONSERVAÇÃO E USO DE REGULADORES VEGETATAIS PARA SUPERÇÃO DE DORMÊNCIA EM *Passiflora* spp.

CONSERVAÇÃO E USO DE REGULADORES VEGETATAIS PARA SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA EM *Passiflora* spp.

RESUMO: A forma mais comum de propagação do gênero *Passiflora* L. é via sementes, no entanto, problemas na germinação e no armazenamento, por causa de dormência, são frequentes, o que tornam esses fatores limitantes para os programas de melhoramento genético da cultura. Assim, o objetivo desse estudo foi determinar o conteúdo de água e temperatura de armazenamento adequados para conservação de sementes de oito espécies de *Passiflora*, bem como viabilizar a superação de dormência nessas espécies com o uso dos reguladores vegetais GA₄₊₇ + BA, buscando assim estabelecer um protocolo de conservação adequado para manutenção segura dos Bancos Ativos de Germoplasma de *Passiflora*, e assim possibilitar o uso desses acessos nos programas de melhoramento genético. As sementes das oito espécies foram obtidas de frutos coletados no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura e previamente aos testes de germinação e armazenamento, foram dessecadas em bancada no ambiente de laboratório e em dessecador contendo sílica gel, posteriormente, foram armazenadas a 5° C e -196° C por um ano. Para superação de dormência, as sementes foram embebidas por 24 hora em GA₄₊₇ + BA na concentração de 300 mg L⁻¹. O teste de germinação foi realizado em caixa do tipo Gerbox® e colocadas em câmara climatizada de germinação no escuro com temperatura alternada de 20°C/30°C, durante 16-8 horas, respectivamente. A análise dos dados concluiu que as espécies *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. morifolia*, *P. mucronata* e *P. tenuifila*, apresentam dormência em sementes recém-colhidas. A espécie *P. suberosa*, apresenta dormência moderada e *P. edulis* Sims, não apresenta dormência em sementes recém-colhidas. Os reguladores vegetais GA₄₊₇ + BA atuam de forma efetiva na superação de dormência nas espécies de *Passiflora* aqui estudadas e elas toleram dessecação e mantêm sua viabilidade com conteúdo de água reduzido entre 4,0 % e 6,7%. As sementes de *Passiflora* aqui estudadas podem ser conservadas em ambas as temperaturas de armazenamento, pelo mesmo período com conteúdo de água variando de 13,7% a 4% obtendo taxa de germinação alta (>80) com uso dos reguladores vegetais.

Palavras-chaves: Criopreservação; Maracujazeiro Silvestre; Ácido Giberélico; Benziladenina.

CONSERVATION AND USE OF PLANT REGULATORS TO OVERCOME DORMANCY OF *Passiflora* spp. SEEDS

ABSTRACT: The most common form of propagation of the *Passiflora* L. genus is via seeds. However, problems of germination and storage due to dormancy are frequent, limiting breeding programs. Thus, the objective of this study was to determine the best water content and storage temperature for seed conservation of eight species of *Passiflora*, as well as to overcome dormancy in these species with the use of plant regulators GA4 + 7 + BA, thus seeking to establish a conservation protocol for the safe maintenance of passion fruit species in active germplasm banks, and thus enable the use of these accessions in genetic improvement programs. Seeds of the eight species were obtained from fruits collected in the field of the Active Germplasm Bank of Embrapa Cassava and Fruits. Before storage and germination tests, they were dried in the laboratory in a desiccator containing silica gel and then stored at 5 °C and -196 °C for one year. To overcome dormancy, the seeds were soaked for 24 hours in GA4 + 7 + BA at a concentration of 300 mg L⁻¹. The germination test was carried out in a Gerbox box placed in an air-conditioned germination chamber with alternating temperature of 20/30 °C and 16/8 hour photoperiod, respectively. The species *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. morifolia*, *P. mucronata* and *P. tenuifila* presented dormancy of newly harvested seeds, while *P. suberosa* presented moderate dormancy and *P. edulis Sims* did not present dormancy in freshly harvested seeds. The growth regulators GA4 + 7 + BA acted effectively to overcome dormancy in the *Passiflora* species studied here, and the seeds tolerated desiccation and maintained viability with water content between 4.0% and 6.7%. The *Passiflora* seeds could be preserved at both storage temperatures, for the same period with water content ranging from 13.7% to 4%, obtaining a high germination rate (> 80) with the use of the growth regulators.

Keywords: Cryopreservation; Wild passion fruit; Gibberellic acid; Benzyladenine.

1. INTRODUÇÃO

O maracujá azedo (*Passiflora edulis* Sims) configura uma significativa fonte de renda devido ao seu amplo cultivo, sendo o Brasil o maior produtor e consumidor mundial do fruto (OLIVEIRA et al., 2016). A cultura representa uma excelente alternativa para geração de emprego e renda no campo e na cidade devido ao fácil plantio e rápido retorno financeiro, servindo como cultura alternativa principalmente para agricultura familiar (MELETTI, 2011).

Porém, fatores como pragas e doenças tem limitado a expansão e produtividade dessa cultura (COELHO et al., 2016) levando muitos produtores a desistirem dos pomares de maracujazeiros (CARVALHO et al., 2019). Dessa forma, por meio do melhoramento genético, tem-se buscado sanar problemas como esse obtendo variedades comerciais resistentes a esses fatores limitantes (FREITAS et al., 2015; OCAMPO et al., 2016).

Para isso, encontram-se as *Passiflora* spp. silvestres que apresentam características singulares para otimizar a produção comercial, pois possuem genes que lhes permitem adaptabilidade às mudanças climáticas, bem como resistência a pragas e doenças (DEBOUCK; LIBREROS, 1995, JUNQUEIRA et al, 2005; OLIVEIRA et al., 2013; OCAMPO et al., 2016). Assim, elas tornam-se essenciais para os programas de melhoramento genético, na obtenção de híbridos resistentes às doenças, que apresentem frutos melhores ou podem ser utilizados como porta-enxertos (YOCKTENGET al. 2011; JUNGHANS; JESUS, 2017; OCAMPO et al., 2016).

Os bancos de germoplasma em condições de campo têm sido a forma mais tradicional de conservação dessas espécies (ENGELMANN, 2004; MELETTI et al., 2007). No entanto, as coleções em campo têm como desvantagem a influência direta de fatores bióticos, como pragas, doenças e fatores abióticos, como mudanças climáticas, desastres naturais, etc. que podem acarretar em perda aso BAGs (ENGELMANN, 2004; MELETTI et al., 2007).

Outra forma muito utilizada de conservação do maracujazeiro é o armazenamento de sementes, visto que, sua principal forma de propagação é via sementes (CARLESSO et al., 2008; TEIXEIRA et al, 2016; FALEIRO et al., 2019). Quando armazenadas corretamente as sementes mantêm sua viabilidade por um

longo período de tempo, além de permitir a conservação de uma grande diversidade de espécies em pequenos espaços (NASCIMENTO et al., 2015).

No entanto, problemas de armazenamento são muito comuns em sementes de *Passiflora* spp., tornando esses fatores limitantes para manutenção dos acessos (SANTOS et al., 2016). Dessa forma, estudos voltados para a conservação de sementes desse gênero têm sido constantes (CATUNDA et al., 2003; VEIGA-BARBOSA et al., 2013; VIEIRA et al., 2015; CERQUEIRA-SILVA et al., 2016; GENEROSO et al., 2019).

Da mesma forma, problemas são observados quanto a dormência de sementes especialmente nas *Passifloras* spp. silvestres (FALEIRO et al., 2019), isso dificulta a produção uniforme de mudas para manutenção dos BAGs em campos, tornando necessário estudos que busquem sanar problemas voltados tanto para o armazenamento, quanto para a quebra de dormência nas *Passifloras* spp.

Com isso, o objetivo desse estudo foi determinar o conteúdo de água e temperatura de armazenamento adequados para conservação de sementes de oito espécies de *Passiflora*, bem como viabilizar a superação de dormência de sementes dessas espécies com o uso dos reguladores vegetais GA₄₊₇ + BA, buscando assim estabelecer um protocolo de conservação adequado para manutenção segura dos Bancos Ativos de Germoplasma de *Passiflora*, e assim possibilitar o uso desses acessos nos programas de melhoramento genético.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

As sementes de *Passiflora* spp. foram obtidas de frutos maduros coletados no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura no município de Cruz das Almas, Bahia, Brasil. As espécies utilizadas foram: *P. alata* Curtis (acesso BGP 024), *P. cincinnata* Mast. (acesso BGP 322), *P. edulis* Sims (acesso BGP 418) *P. gibertii* N.E.Br. (acesso BGP 008), *P. morifolia* Mast. (acesso BGP 107), *P. mucronata* L. (acesso BGP 114), *P. suberosa* L. (foi considerado um pool de sementes provenientes de três acessos: BGP 047, BGP 141 e BGP 152) e *P. tenuifila* Killip (acesso BGP 105).

2.2 Dessecação das sementes e armazenamento em nitrogênio líquido (-196° C) e em refrigerador (5° C).

No Laboratório de Conservação e Tecnologia de Sementes, na Embrapa Mandioca e Fruticultura, as sementes obtidas dos frutos coletados tiveram o arilo removido manualmente por meio de fricção em peneira de malha fina e tecido de algodão. Em seguida as sementes foram distribuídas sobre papel em bancada por 72 horas em temperatura ambiente ($27,7 \pm 1,9$ °C) para secar.

A partir das sementes secas em bancada foi contabilizado um lote de 1140 sementes por espécie e dessa forma, obteve-se o primeiro valor para o conteúdo de água das sementes. Para o segundo valor, metade desse lote (720 sementes) foi colocado em dessecador contendo 500g de sílica gel, e deixados nessa condição por 24 horas. O conteúdo de água das sementes foi estimado pelo método de estufa a 105°C, a partir de quatro amostras de 20 sementes cada, de cada espécie, conforme as recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Os lotes das sementes dessecadas em bancada e em sílica, destinados ao armazenamento em nitrogênio, foram colocados em criotubos de 1,5 ml e imersos em botijões de nitrogênio líquido (-196 °C). Um lote foi retirado após 24 horas e o outro foi retirado após um ano. Os lotes de sementes, destinados ao armazenamento em geladeira, foram colocados em sacos de polipropileno transparente e inseridos em frascos de vidro rosqueável, posteriormente acondicionado em refrigerador (5 °C) por um ano.

Para as sementes recém-colhidas, uma parte não foi pré-embebida e outra parte foi pré-embebida por 24 horas em produto comercial Promalin® (ácido giberélico nº 4 e 7 + 6 – benziladenina; GA₄₊₇ + BA) na concentração de 300 mg L⁻¹. Para as sementes armazenadas por um ano, todas as sementes foram embebidas em GA₄₊₇ + BA (Figura 1). Somente *P. edulis* não precisou de embebição em GA₄₊₇ + BA, por apresentar alta porcentagem de germinação inicial (Figura 2).

Posteriormente, essas sementes foram submetidas ao teste de germinação sendo semeadas em caixas de acrílico (tipo Gerbox®) transparentes (11x11 cm) previamente desinfestadas em álcool 70% contendo duas folhas de papel mata-borrão esterilizado em estufa a 105 ± 3 °C por 2 horas e umedecidas com água destilada em quantidade igual à massa do papel seco multiplicada por 2,5. Em seguida, foram

colocadas em câmara climatizada de germinação no escuro, com temperatura alternada de 20/30°C, durante 16-8 horas respectivamente.

As avaliações foram diárias, a partir da semeadura até o início da germinação, com novas avaliações a cada três dias, até a estabilização da germinação. Sendo consideradas germinadas as sementes que apresentavam emissão da radícula com 2 mm.

2.3 Delineamento Experimental e Análise Estatística

Para as variáveis germinação, tempo médio e taxa média de germinação de sementes, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, realizado de forma separada para cada espécie, totalizando 12 tratamentos com 4 repetições de 25 sementes por parcela. Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Lilliefors em nível de 5% de probabilidade e de homogeneidade de variância de Bartlett com o auxílio do *software* Genes (CRUZ, 2013). Após a constatação do atendimento das pressuposições estatísticas, foram realizadas a análise de variância e a comparação de médias pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade com o auxílio do *software* Sisvar (FERREIRA, 2011). Foram avaliados porcentagem de germinação, tempo médio e taxa média de germinação ($V = 1/t$, onde: V = velocidade média de germinação; t = tempo médio) (NASSIF; PEREZ, 2000; RANAL; SANTANA, 2006;).

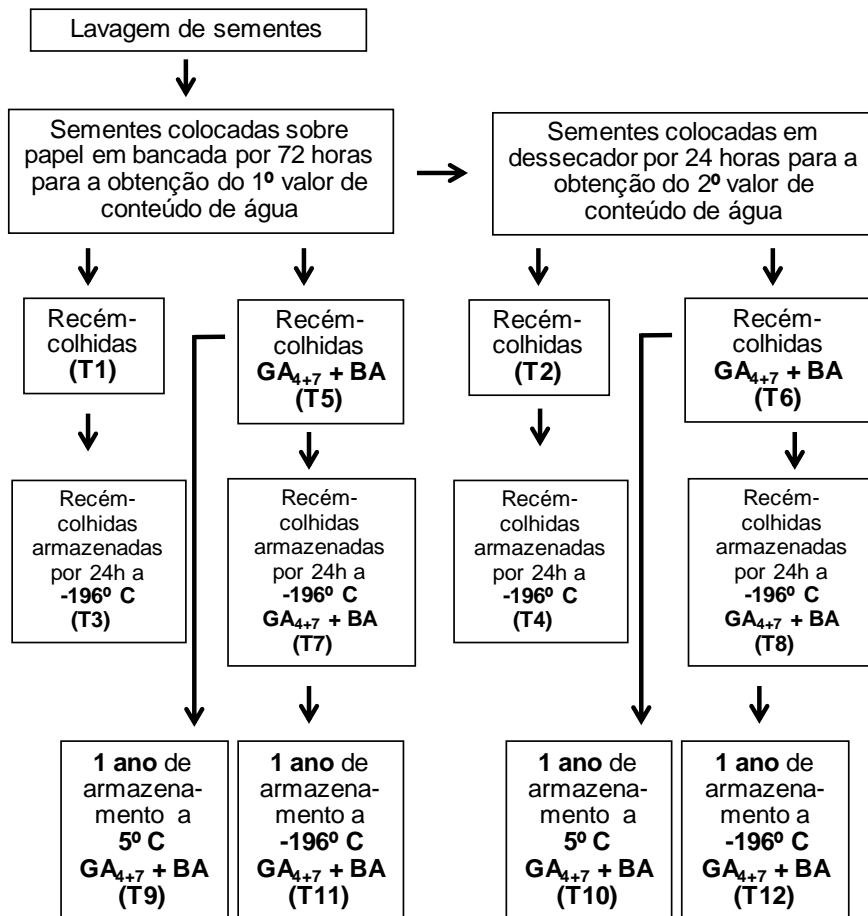


Figura 1. Diagrama geral da metodologia usada para beneficiamento, armazenamento e germinação de sementes de *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, *P. suberosa* e *P. tenuifila*.

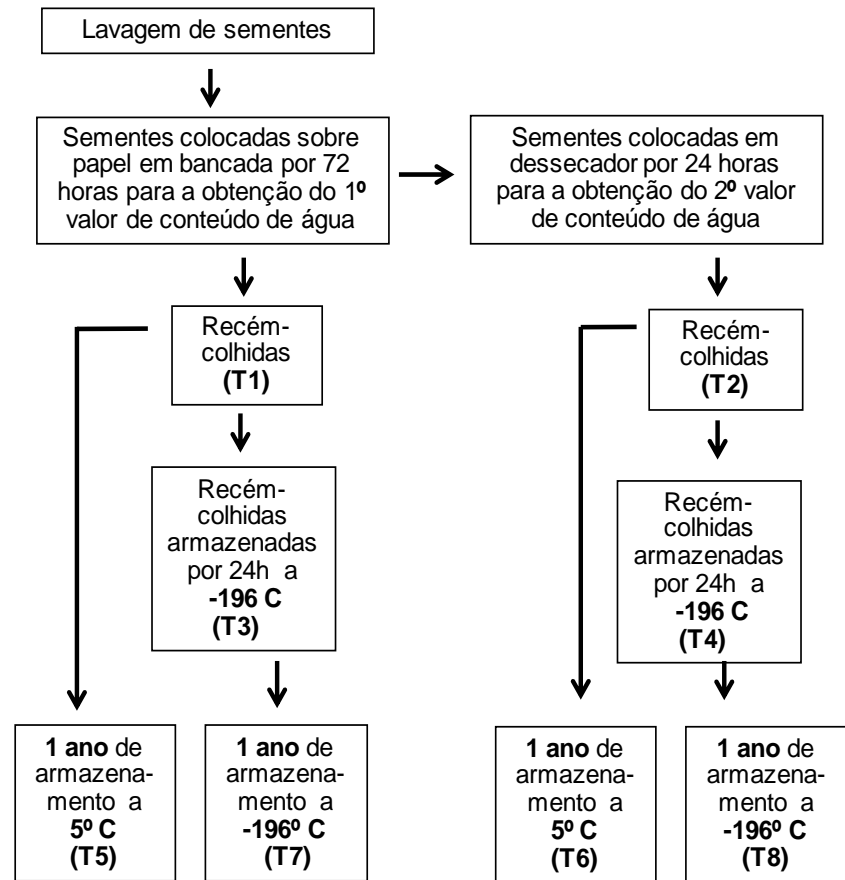


Figura 2. Diagrama geral da metodologia usada para beneficiamento, armazenamento e germinação de sementes de *P. edulis*.

3. RESULTADOS

3.1 Dessecação e determinação do conteúdo de água das sementes

Na Tabela 1 estão apresentados os valores do conteúdo de água das sementes, na qual, pode-se observar que, as sementes secas em bancada apresentaram valor médio de 11,1%, enquanto as sementes desseccadas em sílica apresentaram valor médio de 5,4% e após acondicionadas por 24h em nitrogênio líquido as médias permaneceram similares, 10,3% e 5,7%, respectivamente para os dois tratamentos.

Após armazenadas por um ano, o valor médio para o conteúdo de água das sementes secas em bancada e armazenadas em refrigerador foi de 9,5%, e 10,0% para as sementes criopreservadas. As sementes desseccadas em sílica conservadas por um ano a 5° C e obtiveram valor médio 5,4%, e 5,6% quando armazenadas a -196° C. Com isso, nota-se que, a variação do conteúdo de água das sementes, considerando um ano de armazenamento, é baixa.

Os dados de conteúdo de água após armazenamento configuram um dado complementar e de acompanhamento das sementes armazenadas, uma vez que, havendo uma variação muito grande nos conteúdos de água após armazenamento poderia afetar a germinação das sementes. No entanto as alterações quanto ao conteúdo de água das sementes foram pequenas, e a germinação, para a maioria das espécies, não foi afetada negativamente após armazenamento (Tabela 2; Tabela 3).

Tabela 1. Conteúdo de água das sementes secas em bancada e dessecadas em dessecador, valores iniciais e após armazenamento.

Espécie	Bancada	Sílica	Bancada -196° C 24h	Sílica -196° C 24h	Bancada 5° C 1 Ano	Sílica 5° C 1 Ano	Bancada -196° C 1 Ano	Sílica -196° C 1 Ano
<i>P. alata</i>	13,7	4,0	12,4	6,2	8,5	4,6	10,5	5,2
<i>P. cincinnata</i>	10,0	6,7	9,7	6,5	8,9	5,4	9,6	6,4
<i>P. edulis</i>	10,0	5,6	10,5	5,2	8,7	4,8	9,3	5,2
<i>P. gibertii</i>	10,5	5,4	10,2	5,9	10,0	5,7	10,6	7,2
<i>P. morifolia</i>	10,8	4,9	8,3	4,9	11,3	5,1	11,4	5,9
<i>P. mucronata</i>	10,6	4,4	10,6	5,1	10,1	5,2	10,6	5,6
<i>P. suberosa</i>	12,4	6,4	12,3	5,6	9,6	6,4	9,6	5,5
<i>P. tenuifila</i>	10,8	5,9	8,3	6,4	8,5	6,0	8,8	6,6
Média Geral	11,1%	5,4%	10,3%	5,7%	9,5%	5,4%	10%	5,6%

3.2 Germinação de sementes

Das oito espécies aqui estudadas, sete (*P. alata*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, *P. suberosa* e *P. tenuifila*) apresentaram germinação baixa, tardia ou desuniforme quando não expostas aos reguladores vegetais. Foi observado, também, que a imersão em nitrogênio líquido por 24 horas proporcionou a quebra tegumentar de algumas sementes na maioria das espécies, ainda assim, a germinação permaneceu lenta com baixas percentagens. Porém, após serem submetidas aos reguladores vegetais de GA₄₊₇ + BA, as sementes obtiveram velocidade e uniformidade na germinação.

Apenas *P. edulis*, uma espécie comercial, obteve média de germinação alta e uniforme sem o uso de reguladores vegetais, com início de germinação entre o sexto e sétimo dia após semeadura, apresentando valores entre 35% a 84% de germinação para sementes recém-colhidas e estabilização aos 23 dias após semeadura, com valores acima de 90% de germinação. Assim, com essa espécie, não foi necessário utilizar regulador vegetal para os demais testes de germinação.

Após armazenamento por um ano, nas duas temperaturas (5° e -196° C) e nas duas formas de dessecação, *P. edulis* apresentou germinação rápida, alta e uniforme com início de germinação entre o terceiro e quinto dia após semeadura com valores iniciais entre 23% a 94%, sendo estabilizada a germinação aos quinze dias após a semeadura alcançando valores entre 92% a 99% de germinação. Quanto a

porcentagem de germinação, *P. edulis* não demonstrou diferença estatística tanto para sementes recém-colhidas, quanto para sementes armazenadas. No entanto para tempo médio e taxa média, as sementes armazenadas demonstraram melhores respostas (Figura 4; Tabela 2).

Tabela 2. Dados de germinação, tempo médio e taxa média de germinação de sementes de *P. edulis*, nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Germinação (%)	Tempo médio (dias)	Taxa média
Bancada	97 a	7,93 b	0,13 b
Sílica	98 a	7,49 b	0,13 b
Bancada / 24h a -196° C	97a	8,03 b	0,13 b
Sílica / 24h a -196° C	92 a	7,57 b	0,13 b
Bancada / 1 ano a 5° C	98 a	5,13 a	0,20 a
Sílica / 1 ano a 5° C	99 a	5,45 a	0,18 a
Bancada / 1 ano a -196° C	98 a	5,13 a	0,20 a
Sílica / 1 ano a -196° C	96 a	5,34 a	0,19 a
CV (%)	3,29	11,46	13,36
Média Geral	97	6,5	0,161

As

médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

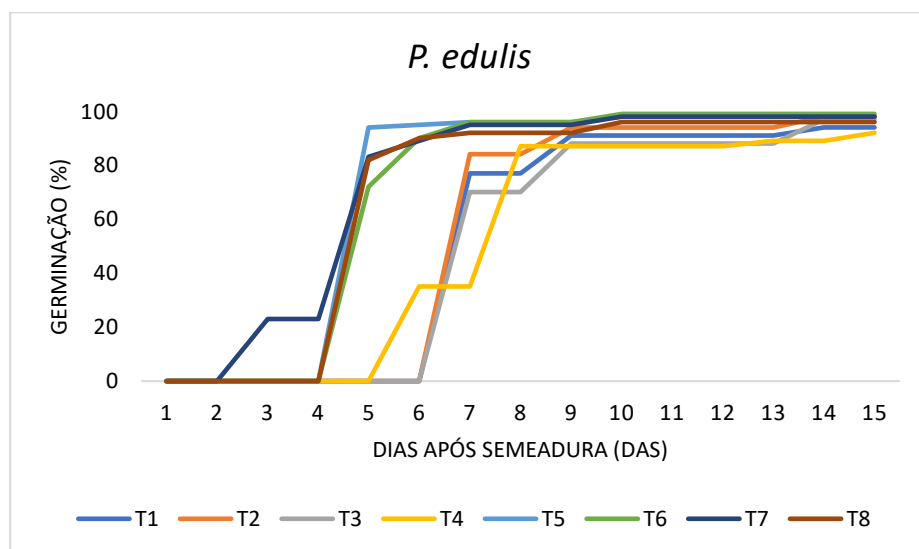


Figura 4. Curvas de germinação de sementes de *P. edulis*, de acordo com os tratamentos: Bancada (T1); Sílica (T2); Bancada / 24h a -196° C (T3); Sílica / 24h a -196° C (T4); Bancada / 1 ano a 5° C (T5); Sílica / 1 ano a 5° C (T6); Bancada / 1 ano a -196° C (T7); Sílica / 1 ano a -196° C (T8).

P. gibertii, *P. morifolia* e *P. suberosa*, após submetidas aos reguladores vegetais obtiveram germinação alta, rápida e uniforme, com curva de germinação similar (Figura 5 C, D e F), sendo observado início de germinação entre o terceiro e quinto dia após a semeadura e estabilização entre o décimo segundo e decimo quarto dia após semeadura com valores acima de 95% de germinação, sem diferença estatística para germinação e tempo médio. Mas, obtiveram melhor taxa média, as sementes armazenadas por um ano, independente da temperatura de armazenamento (5° C e -196° C) ou conteúdo de água das sementes (Tabela 3). No entanto, quando não submetidas aos reguladores vegetais, as espécies *P. gibertii* e *P. morifolia* obtiveram germinação baixa com valores médios de 11,5% e 8% respectivamente (Figura C e D; Tabela 3). Enquanto *P. suberosa* obteve germinação alta quando comparada as demais espécies, com média de 58% (Tabela 3). Entretanto, foi observada germinação tardia e desuniforme com início entre o quinto e décimo terceiro dia e estabilização aos 65 dias após semeadura (Figura 5 F).

P. mucronata, obteve germinação baixa com média de 4% quando não tratadas com reguladores vegetais (GA₄₊₇ + BA). Enquanto as sementes tratadas com GA₄₊₇ + BA apresentaram boa germinação, com valores entre 64% a 81% para as sementes não armazenadas e 78% a 93% para as sementes armazenadas por um ano. Sendo que, as sementes armazenadas em nitrogênio líquido, independente do conteúdo de água, apresentaram os melhores resultados tanto para germinação quanto para tempo médio (Figura 5 E; Tabela 3)

As sementes de *P. alata*, apresentaram germinação baixa e tardia quando não submetidas aos reguladores vegetais (GA₄₊₇ + BA), com média de 11%, enquanto as sementes tratadas com os reguladores vegetais GA₄₊₇ + BA apresentaram maior germinação, com valores entre 56% a 83%. O armazenamento em geladeira não apresentou diferença estatística para germinação, enquanto para as sementes criopreservadas, o melhor resultado foi obtido para as sementes dessecadas em sílica (80%). Quanto ao tempo médio e taxa média, os melhores resultados foram obtidos para as sementes armazenadas por um ano independente da temperatura de armazenamento (5° e -196° C) ou modo de dessecação das sementes (Figura 5 A; Tabela 3).

As sementes das espécie *P. cincinnata*, apresentaram média de 5% de germinação quando não submetidas aos reguladores vegetais GA₄₊₇ + BA. Quando

submetidas aos reguladores GA₄₊₇ + BA, apresentaram germinação entre 52% e 70% para sementes recém-colhidas, sendo os melhores resultados de germinação obtidos para as sementes armazenadas por um ano, independente da temperatura de armazenamento (5° C e -196° C) nos diferentes métodos de dessecação, com média acima de 80 %. Simultaneamente, o melhor valor para germinação, tempo médio e taxa média, foram demonstrados nas sementes armazenadas a 5° C dessecadas em bancada (Figura B; Tabela 3).

As sementes de *P. tenuifila*, apresentaram germinação baixa e tardia quando não submetidas aos reguladores vegetais GA₄₊₇ + BA, com média de 5%, enquanto as sementes tratadas com GA₄₊₇ + BA sem armazenamento apresentaram média de germinação de 70%, e após armazenamento, apresentaram germinação média de 91%. Os melhores resultados para germinação, tempo médio e taxa média, simultaneamente, foram obtidos para as sementes armazenadas por um ano em nitrogênio líquido (-196° C) ou em refrigerador (5° C) com conteúdo de água inicial de 10,7%, dessecadas em bancada (Figura 5 G; Tabela 3).

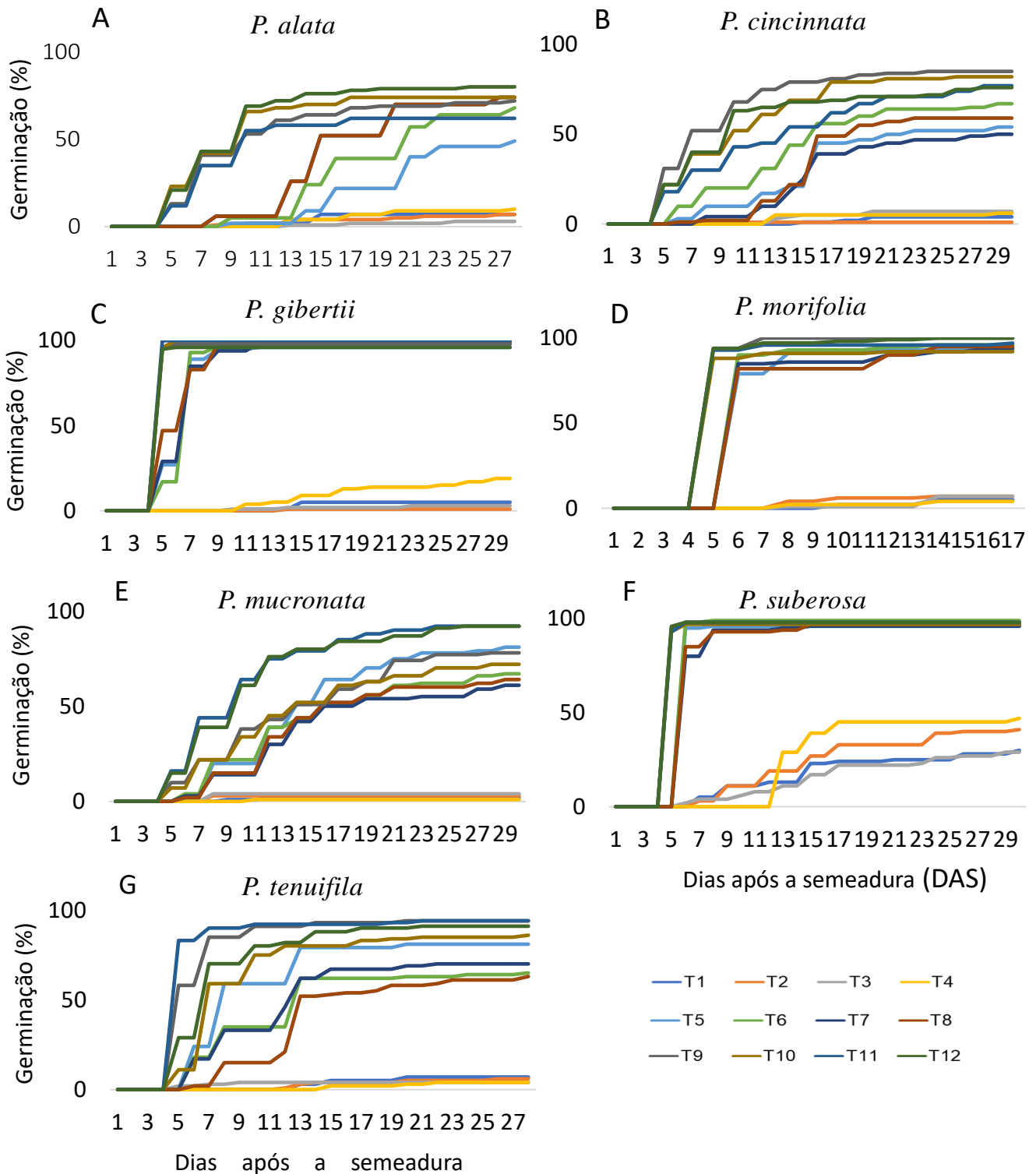


Figura 5. Curvas de germinação de sementes de sete espécies de *Passiflora*, estudadas neste trabalho de acordo com os tratamentos: Bancada (T1); Sílica (T2); Bancada / 24h a -196°C (T3); Sílica / 24h a -196°C (T4); Bancada / GA_{4+7} + BA (T5); Sílica / GA_{4+7} + BA (T6); Bancada / 24h a -196°C / GA_{4+7} + BA (T7); Bancada / 24h a -196°C / GA_{4+7} + BA (T8); Bancada / 1 ano a 5°C / GA_{4+7} + BA (T9); Sílica / 1 ano a 5°C / GA_{4+7} + BA (T10); Bancada / 1 ano a -196°C / GA_{4+7} + BA (T11); Sílica / 1 ano a -196°C / + GA_{4+7} + BA (T12).

Tabela 3. Valores de germinação, tempo médio e taxa média de sementes de *P. alata*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, *P. suberosa*, *P. tenuifila* nos diferentes tratamentos.

Germinação (%)							
Tratamento	<i>P. alata</i>	<i>P. cincinnata</i>	<i>P. gibertii</i>	<i>P. morifolia</i>	<i>P. mucronata</i>	<i>P. suberosa</i>	<i>P. tenuifila</i>
Bancada	10 c	5 d	8 c	11 b	4 d	57 c	7 d
Sílica	10 c	1 d	1 d	7 b	4 d	69 b	6 d
Bancada / 24h a -196° C	8 c	8 d	12 c	7 b	5 d	50 c	4 d
Sílica / 24h a -196° C	14 c	7 d	25 b	7 b	4 d	59 c	4 d
Bancada / GA ₄₊₇ + BA	56 b	56 c	96 a	93 a	81 b	99 a	81 b
Sílica / GA ₄₊₇ + BA	73 a	70 b	98 a	96 a	69 c	99 a	65 c
Bancada / 24h a -196° C / GA ₄₊₇ + BA	70 a	52 c	99 a	94 a	61c	96 a	70 c
Sílica / 24h a -196° C / GA ₄₊₇ + BA	83 a	60 c	99 a	95 a	64 c	97 a	63 c
Bancada / 1 ano a 5° C / GA ₄₊₇ + BA	72 a	86 a	98 a	100 a	78 b	98 a	94 a
Sílica / 1 ano a 5° C / GA ₄₊₇ + BA	74 a	85 a	100 a	92 a	79 b	97 a	86 b
Bancada / 1 ano a -196° C / GA ₄₊₇ + BA	63 b	81 a	100 a	98 a	93 a	98 a	94 a
Sílica / 1 a -196° C / GA ₄₊₇ + BA	80 a	84 a	96 a	100 a	93 a	98 a	91 a
CV %	19,85	17,62	7	6,52	13,01	8,37	12,77
Média Geral	51,08	49,58	82,3	6,67	77,25	84,75	55,42
Tempo médio (dias)							
Tratamento	<i>P. alata</i>	<i>P. cincinnata</i>	<i>P. gibertii</i>	<i>P. morifolia</i>	<i>P. mucronata</i>	<i>P. suberosa</i>	<i>P. tenuifila</i>
Bancada	18,88 b	20,38 b	25,07 b	25,0 d	10,5 a	30,58 c	15,21 c
Sílica	19,88 b	*	14,00 b	10,0 b	8a	26,00 c	16,83 d
Bancada / 24h a -196° C	24,75 b	16,56 b	44,46 c	13,0 b	8a	29,20 c	4,75 a
Sílica / 24h a -196° C	23,52 b	16,75 b	23,40 b	16,0 c	11a	21,15 b	18,00 d
Bancada / GA ₄₊₇ + BA	21,28 b	15,62 b	6,613 a	6,4 a	13,98 b	6,23 a	8,96 b
Sílica / GA ₄₊₇ + BA	19,13 b	14,22 b	6,79 a	6,3 a	14,27 b	6,02 a	10,23 b
Bancada / 24h a -196° C / GA ₄₊₇ + BA	17,67 b	16,19 b	6,84 a	6,6 a	14,06 b	6,46 a	10,38 b
Sílica / 24h a -196° C / GA ₄₊₇ + BA	18,34 b	15,59 b	6,41 a	7,0 a	13,90 b	6,52 a	12,96 c
Bancada / 1 ano a 5° C / GA ₄₊₇ + BA	9,40 a	8,75 a	5,03 a	5,8 a	13,00 b	5,03 a	6,25 a
Sílica / 1 ano a 5° C / GA ₄₊₇ + BA	8,22 a	11,01 a	5,04 a	5,2a	14,49 b	5,04 a	8,43 b
Bancada / 1 ano a -196° C / GA ₄₊₇ + BA	8,86 a	13,41 b	5,00 a	5,2 a	10,21 a	5,02 a	5,57 a
Sílica / 1 a -196° C / GA ₄₊₇ + BA	8,62 a	13,14 b	5,01 a	5,3 a	10,61 a	5,05 a	7,61 b

CV %	22,98	21,11	31,6	29,40	10,25	23,16	23,24
Média Geral	6,54	13,65	11,5	9,18	13,07	12,77	10,43
Taxa média							
Tratamento	<i>P. alata</i>	<i>P. cincinnata</i>	<i>P. gibertii</i>	<i>P. morifolia</i>	<i>P. mucronata</i>	<i>P. suberosa</i>	<i>P. tenuifila</i>
Bancada	0,06 b	0,05 c	0,04 c	0,04 e	0,10 b	0,03 e	0,07 c
Sílica	0,06b	*	0,02 d	0,10 c	0,12 a	0,04 e	0,07 c
Bancada / 24h a -196° C	0,04 b	0,07 c	0,02 d	0,08 d	0,12 a	0,04 e	0,12 b
Sílica / 24h a -196° C	0,05 b	0,07 c	0,05 c	0,07 d	0,09 b	0,05 d	0,06 c
Bancada / GA ₄₊₇ + BA	0,05 b	0,06 c	0,15 b	0,16 b	0,07 c	0,16 c	0,11 b
Sílica / GA ₄₊₇ + BA	0,05 b	0,07 c	0,15 b	0,16 b	0,07 c	0,17 b	0,10 c
Bancada / 24h a -196° C / GA ₄₊₇ + BA	0,06 b	0,06 c	0,15 b	0,15 b	0,07 c	0,16 c	0,10 c
Sílica / 24h a -196° C / GA ₄₊₇ + BA	0,05 b	0,06 c	0,16 b	0,14b	0,07 c	0,15 c	0,08 c
Bancada / 1 ano a 5° C / GA ₄₊₇ + BA	0,11 a	0,12 a	0,20 a	0,18 a	0,08 c	0,20 a	0,16 a
Sílica / 1 ano a 5° C / GA ₄₊₇ + BA	0,12 a	0,09 b	0,20 a	0,20 a	0,07 c	0,20 a	0,12 b
Bancada / 1 ano a -196° C / GA ₄₊₇ + BA	0,12a	0,08 b	0,20 a	0,19 a	0,10 b	0,20 a	0,18 a
Sílica / 1 a -196° C / GA ₄₊₇ + BA	0,12 a	0,08 b	0,20 a	0,19a	0,09 b	0,20 a	0,14 b
CV %	17,75	30,09	5,6	12,79	9,73	4,57	25,10
Média Geral	0,07	0,07	0,15	0,14	0,08	0,13	0,11

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. * germinação de 1% em um dia após semeadura.

4. DISCUSSÃO

Para uma boa conservação de sementes é necessário estabelecer condições que permitam a manutenção da viabilidade e possibilitem a melhor germinação no início e após o armazenamento dessas sementes. Por isso, avaliar a presença de dormência nas sementes e qual método de superação pode ser utilizado é um fator determinante para a posterior utilização das sementes, visto que, após armazenadas é necessário saber se as mesmas permanecem viáveis (JUNGHANS; JUNGHANS, 2016).

Muitos estudos confirmam que várias espécies de *Passiflora* possuem problemas na germinação de sementes, como dormência ou recalcitrância (DELANOY et al., 2006; PADUA et al., 2011; REZAZADEH; STAFNE, 2018; FALEIRO et al., 2019), os quais reafirmam os resultados demonstrados neste trabalho, onde sete (*P. alata*, *P. cincinnata*, *P. gibertii*, *P. morifolia*, *P. mucronata*, *P. suberosa* e *P. teunifila*) das oito espécies avaliadas apresentaram germinação baixa e lenta, ao serem submetidas ao teste de germinação com sementes recém-colhidas (Tabela 3). Delanoy et al. (2006) destacam que sementes de maracujá podem levar de dez a noventa dias para germinarem quando não submetidas a um tratamento de quebra de dormência, assim, apresentam baixa porcentagem de germinação e formação irregular de mudas.

O mecanismo de dormência de sementes de uma forma geral pode estar relacionado a dois fatores mais significativos, são eles: dormência endógena ligada a fatores que envolvem o embrião, podendo ser dormência fisiológica, morfológica e morfofisiológica; ou dormência exógena, ligada a fatores externos como impermeabilidade do tegumento à água e/ou ao gás (FOWLER e BIANCHETTI, 2000; CARDOSO, 2009).

Diversos estudos relatam a presença de dormência, em sementes de *Passiflora* spp., contudo a origem pode variar de espécie para espécie, ou podem apresentar diferentes níveis de dormência, que é a combinação desses diferentes mecanismos existentes (DELANOY et al., 2006). Dessa forma, entende-se que para uma germinação rápida e uniforme é necessário que a dormência seja superada em todos os níveis, ou seja em todos os mecanismos.

Neste trabalho foi observado que a imersão em nitrogênio líquido por 24 horas proporcionou a quebra tegumentar de algumas sementes na maioria das espécies, ainda assim, a germinação permaneceu lenta com baixas percentagens. Porém, após embebição das sementes em de GA₄₊₇ + BA houve velocidade e uniformidade na germinação para todas as espécies. O que indica que a dormência presente nas espécies não está relacionada ao tegumento, ou, independente do tipo de dormência presente nas espécies testadas, o regulador promoveu a superação nos diferentes níveis.

Rezazadeh e Stafne (2018) em trabalho realizado com sete espécies de *Passiflora*, demonstraram germinação de sementes inferior utilizando quatro pré-tratamentos para quebra de dormência, no qual as taxas de germinação variaram entre 20% e 50% nos melhores tratamentos, sendo que, apenas uma espécie (*P. laurifolia*) obteve germinação de 75%, quando submetida à escarificação e fermentação por 7 dias em solução de sacarose a 10%. Cada espécie respondeu de forma diferente a cada tratamento.

Rezazadeh e Stafne (2018) ressaltam que os resultados para trabalhos de quebra de dormência de sementes de *Passiflora* spp., têm se mostrado inconsistentes, fazendo-se entender que vários métodos precisam ser testados, afim de se estabelecer um protocolo eficiente, ou seja, que garanta o máximo de germinação, pois cada espécie pode responder de forma diferente a cada tipo de tratamento. Com isso, os resultados deste trabalho demonstraram-se promissores, pois todas as diferentes espécies aqui trabalhadas responderam de forma positiva aos tratamentos, e obtiveram elevada taxa de germinação.

Da mesma forma, outros trabalhos visando a superação de dormência de sementes de *Passiflora* spp., foram testados métodos diferenciados, sendo observado que a utilização de reguladores vegetais foram os mais eficazes (DELANOY et al., 2006; COSTA et al., 2010; PADUA et al., 2011; SANTOS et al., 2016; MOURA et al., 2018).

Reguladores vegetais são comumente usados para superar dormência fisiológica de sementes (GRZYBOWSKI et al., 2019), pois o regulador vegetal atua em especial na expressão gênica de enzimas hidrolíticas responsáveis por enfraquecimento do tegumento (TAIZ et al., 2017) e degradação de substâncias de

reserva (REGO et al., 2014), estas condições permitem que o embrião retome seu crescimento (CASTRO et al., 2005).

Em trabalhos realizados com o produto comercial Promalin® que é a combinação do ácido giberélico nº 4 e 7 + 6 – benziladenina (GA₄₊₇ + BA), foi observado em duas espécies de *Passiflora* (*P. setacea* De Candolle e *P. tenuifila* Killip) na concentração de 300 mg L⁻¹ proporcionou aumento na germinação para ambas as espécies (COSTA et al., 2015; JUNGHANS et al., 2019) o que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho (Tabela 3).

Quanto as sementes de *P. edulis*, uma espécie comercial, não foi observado dormência pois obteve média geral de germinação de 97% sem uso de reguladores vegetais. No entanto, diferentes trabalhos (GHOSH et al., 2017; REZAZADEH e STAFNE 2018; GRZYBOWSKI et al., 2019) indicaram dormência para a espécie citada, sendo necessário o tratamento para germinação, e em todos os trabalhos mencionados, foi relatado taxa de germinação inferior aos resultados obtidos aqui.

Isso pode ser explicado pela enorme diversidade genética de *Passiflora* que apresentam características diferentes para germinação e armazenamento, tanto entre as espécies, quanto nos diferentes genótipos da mesma espécie (ALEXANDRE et al., 2004; JUNGHANS; JESUA, 2015).

Quanto ao armazenando de sementes, a literatura relata que o efeito do congelamento por nitrogênio líquido (-196°C) pode resultar em diversos danos ao material biológico, dentre eles se destaca o rompimento celular devido a formação de cristais de gelo (MARTÍNEZ-MONTERO et al., 2002; MULLEN; CRISTER, 2007; SOUZA et al., 2015). Por isso, na criopreservação, um fator crucial para um bom protocolo de congelamento está na diminuição do conteúdo de água das sementes conservadas.

Alguns trabalhos também destacam a importância de utilizar crioprotetores para aumentar a recuperação do material após o armazenamento (SAKAI, A.; ENGELMANN, 2007). Porém Araújo et al. (2016), em um trabalho realizado com quatro espécies (*P. mucronata*, *P. micropelata*, *P. suberosa* e *P. edulis*), destacam que as sementes sem crioprotetores obtiveram melhor taxa de germinação. Assim como neste trabalho, no qual não foram utilizados crioprotetores e as porcentagens de germinação foram elevadas. Com isso, entende-se que, para as espécies avaliadas neste trabalho, o ponto crítico para a criopreservação de sementes é definir

o conteúdo de água ideal antes de mergulhá-las em nitrogênio líquido como relatado por Towill (2002).

Grzybowski et al. (2019) relatam que a refrigeração (7,3-8,5 ° C) manteve a viabilidade e o vigor de sementes de maracujá amarelo por nove meses, apresentando germinação de 60% ao final desse período. Catunda et al. (2003) evidenciaram que sementes com conteúdo de água entre 8% e 10% acondicionadas em embalagens impermeáveis armazenadas em refrigerador (4° C), obtiveram os melhores resultados para armazenamento de sementes de *P. edulis* por dez meses.

Esses dados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, no qual o armazenamento em refrigerador manteve a viabilidade das sementes com conteúdo de água de 10,0% a 13,7% (secas em ambiente de laboratório) e 4 % a 6,7% (dessecadas em sílica) armazenadas por um ano. Estudos sugerem que um ambiente moderadamente seco e frio, possibilita a manutenção da viabilidade das sementes de forma mais prolongada (HARRINGTON, 1959; FERREIRA, et al. 2017)

Neste trabalho observa-se que as sementes alcançaram teor de água entre 4% e 6,7% após dessecação, verificando que, mesmo com baixo conteúdo de água, as sementes não tiveram seu poder germinativo comprometido, isso evidencia uma característica peculiar de semente ortodoxa e corrobora com os resultados obtidos por Becwar et al. (1983), que determinaram o limite mínimo de 2% de teor de água para que sementes de maracujá mantenham sua viabilidade.

Em relação aos dados de armazenamento associado ao uso de GA₄₊₇ + BA pode ser observado que, após um ano de armazenamento em refrigerador ou nitrogênio líquido, independente do conteúdo de água, as sementes obtiveram melhores resultados de tempo médio e taxa média para a maior parte das espécies. Isso indica que o armazenamento associado ao GA₄₊₇ + BA pode atuar aumentando a velocidade de germinação das sementes.

Contudo, Padua et al. (2011), em trabalho realizado com *P. setacea*, relatam que o conteúdo de água das sementes (3,7% a 16,9%) não afetou a germinação, as quais foram tratadas com GA₃ para quebra de dormência. No entanto, após oito meses de armazenamento em três condições de temperatura (4°C, -20° C e -196°C) com o conteúdo de água das sementes reduzido para 3,7%, ocorreu uma indução à dormência, possivelmente causada pela interação dos fatores temperatura, umidade e período de armazenamento.

Porém, algumas espécies apresentam necessidade de armazenamento para quebra de dormência, como descreve Tiwari et al. (2016) em trabalho realizado com espécies ornamentais. Negreiros et al. (2006) e Moura et al. (2018) também relatam efeito positivo sobre a germinação de sementes de *Passiflora* após armazenamento, fazendo-se entender que o armazenamento pode atuar favorecendo a germinação de sementes de *Passiflora* até certo período. No entanto, isso pode variar de acordo com a espécie e a temperatura de armazenamento.

5. CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo mostraram que as sementes de maracujazeiro podem tolerar níveis de dessecação abaixo de 10% de conteúdo de água e dessa forma podem ser conservadas por um período mais prolongado tanto em refrigerador (5° C) quanto em nitrogênio líquido (-196°C) e que o uso dos reguladores vegetais GA₄₊₇ + BA na concentração de 300 mg L⁻¹ atua de forma efetiva para promover superação de dormência nas sementes de *Passiflora* spp. avaliadas no presente trabalho, e permite uma taxa de germinação alta e uniforme após armazenamento. A imersão em nitrogênio líquido por 24 horas não promove a superação de dormência, nas sementes de *Passiflora* spp. aqui avaliadas, indicando presença de dormência fisiológica que pode ser superada com o uso desses reguladores.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, R.S.; JÚNIOR, A.W.; NEGREIROS, J.R.S.; PARIZZOTTO, A.; BRUCKNER, C.H. Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n. 12, p.1239 - 1245, 2004.
- ARAÚJO, D. S; LUZ; P. B., NEVES, L. G.; PAIVA SOBRINHO, S. Seed cryopreservation of *Passiflora* species. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 38, n. 3, p. 248-253, 2016.
- BECWAR, M.R.; STANWOOD, P.C.; LEONHARDT, K.W. Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. **Journal American Society Horticulture Science**, Alexandria, v.108, n.4, p.613-618, 1983.
- BRASIL, **Regras Para Análise De Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília-DF, Brasil. 2009.
- CARDOSO, V.J.M. **Conceito e classificação da dormência em sementes**. *Oecologia Brasiliensis*, v.13, p.619-630, 2009.
- CARLESSO, V.O; BERBERT, P. A.; SILVA, R. F.; DETMANN, E.. Secagem e armazenamento de sementes de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, vol.30, n.2, pp.65-74, 2008.
- CARVALHO, B.M., VIANA, A.P., SANTOS, P.H.D., GENEROSO, A.L., CORRÊA, C.C.G., SILVEIRA, V., SANTOS, E. A. Proteome of resistant and susceptible *Passiflora* species in the interaction with *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals distinct responses to pathogenesis. **Euphytica**, Dordrecht, v. 215, p.1-17, 2019.
- CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Agronômica Ceres, Piracicaba, 640p. 2005.
- CATUNDA, P. H. A.; VIEIRA, H. D.; SILVA, R. F. D.; POSSE, S. C. Influência do teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 65-71, 2003.
- CATUNDA, P. H. A.; VIEIRA, H. D.; SILVA, R. F. D.; POSSE, S. C. 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.; FALEIRO, F.G.; JESUS, O.N.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A.P. The genetic diversity, conservation, and use of passion Fruit (*Passiflora* spp.). In: Ahuja, M.R., Jain, S.M. (Eds.), *Genetic Diversity and Erosion in Plants*. **Springer International Publishing**, New York, pp. 215–231, 2016.

COELHO, M.S.E., BORTOLETI, K.C.A. , ARAÚJO, F.P., MELO, N.F. Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrid and its parentes. **Euphytica**, Dordrecht, v. 210, p. 93–104, 2016.

COSTA, A.M.; LIMA, H.C.; CARDOSO, E.R.; SILVA, J.R.; PADUA, J.G.; FALEIRO, F.G.; PEREIRA, R.C.A.; CAMPOS, G.A. **Produção de mudas de maracujazeiro silvestre (*Passiflora setacea*)**. Comunicado Técnico, 176, Embrapa Cerrados, Planaltina, p.1, 2015.

COSTA, C. J.; OLIVEIRA SIMÕES, C.; COSTA, A. M. Escarificação Mecânica e Reguladores Vegetais para Superação da Dormência de Sementes de *Passiflora setacea* DC. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Planaltina, v. 271, p. 15, 2010.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. Maringá, v.35, n.3, p.271-276, 2013.

DEBOUCK D, G; LIBREROS, D. Neotropical montane forests: A fragile home of genetic resources of wild relatives of New World crops. 1995. In: CHURCHILL S,P; BALSLEV, H; FORERO, E;LUTEYN ,J. L. (eds). **Biodiversity and conservation of neotropical montane forests, proceedings of a symposium**, New York Botanical Garden, p. 561–577. 1993.

DELANOY, M.; VAN DAMME, P.; SCHELDEMAN, X.; BELTRAN, J. Germination of *Passiflora molíssima* (Kunth) L.H.Bailey, *Passiflora tricuspidata* Mast. and *Passiflora* nov sp. seeds. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.110, p.198-203, 2006.

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

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNGHANS, T. G.; JESUS, O. N. D.; MIRANDA, D.; OTONI, W. C. Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 2, 2019.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNGHANS, T. G.; JESUS, O. N. D.; MIRANDA, D.; OTONI, W. C. Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 2, 2019.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNGHANS, T. G.; JESUS, O. N. D.; MIRANDA, D.; OTONI, W. C. Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 2, 2019.

FERREIRA, F. C., VILLELA, F. A., MENEGHELLO, G. E., SOARES, V. N. Cooling of soybean seeds and physiological quality during storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 39, n. 4, p. 385-392, 2017.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, Larvas, vol.35, n.6, p.1039-1042, 2011.

FOWLER, A.J.P.; BIANCHETTI, A. **Dormência em sementes florestais**. Documentos, 40, Embrapa Florestas, Colombo, p.27, 2000.

FREITAS, J.C.O; VIANA, A.P.; SANTOS, E.A.; SILVA, F.H.; PAIVA, C.L.; RODRIGUES, R.; SOUZA, M.M.; EIRAS, M. Genetic basis of the resistance of a passion fruit segregant population to Cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV). **Tropical Plant Pathology**, Heidelberg, v. 40, p. 291-297, 2015.

GENEROSO, A. L.; CARVALHO, V. S.; WALTER, R., CAMPBELL; G., DA SILVA ARAÚJO; L., SANTANA, J. G. S.; DA CUNHA, M. Mature-embryo culture in the cryopreservation of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) seeds. **Scientia Horticulturae**, v. 256, p. 108638, 2019.

GHOSH, A.; DEY, K.; BAURI, F. K.; DEY, A. N. Effects of different pre-germination treatment methods on the germination and seedling growth of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*). **Int J Curr Microbiol Appl Sci**, v. 6, n. 4, p. 630-636, 2017.

GRZYBOWSKI, C. R. S.; SILVA, R. C. D.; BELNIAKI, A. C., E PANOBIANCO, M. Investigation of dormancy and storage potential of seeds of yellow passion fruit. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 41, n. 3, p. 367-374, 2019.

HARRINGTON, J.F. Drying, storing, and packaging seeds to maintain germination and vigor. **Proceedings Short Course Seedsmen**, p.89-108, 1959.

JUNGHANS, T. G, COSTA, A.M, SOUZA, J. D. M., & de SOUZA, L. R. Armazenamento, grau de umidade e reguladores de crescimento na superação da dormência de sementes de *Passiflora tenuifila*. **Embrapa Mandioca e Fruticultura, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Cruz das Almas, n. 103, p.17, 2019.

JUNGHANS, T. G, COSTA, A.M, SOUZA, J. D. M., & de SOUZA, L. R. Armazenamento, grau de umidade e reguladores de crescimento na superação da dormência de sementes de *Passiflora tenuifila*. **Embrapa Mandioca e Fruticultura, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Cruz das Almas, n. 103, p.17, 2019.

JUNGHANS, T. G.; JESUS O. N. (Ed.). **Maracujá: do cultivo à comercialização**. Embrapa, Brasília:, p. 299-318, 2017,

JUNGHANS, T. G.; JESUS, O. N. *Passiflora cincinnata* Mast. In: JUNGHANS, T. G. **Guia de plantas e propágulos de maracujazeiro**. n.1, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, p. 21-27, 2015.

JUNGHANS, T. G.; JUNGHANS, D. T. Conservação de sementes de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*) para fins de manutenção de germoplasma. **Embrapa Mandioca e Fruticultura, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Cruz das Almas, n. 81, p. 19, 2016.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M.F.; FALEIRO, F.G.; PEIXOTO, J.R.; BERNACCI, L.C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá:**

germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. p. 81-108, 2005.

MARTÍNEZ-MONTERO, M.E.; MORA, N.; QUIÑONES, J.; GONZÁLEZ-ARNAO, M.T.; ENGELMANN, F.; LORENZO, J.C. Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes of sugarcane (*Saccharum* sp.) embryogenic calluses. **CryoLetters**, London, v.23, p.237-244, 2002.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p. 83-91, 2011.

MELETTI, L. M. M.; BARBOSA, W.; VEIGA, R. F. A.; PIOR, R. Crioconservação de sementes de seis acessos de maracujazeiro. **Revista Scientia Agrária Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v.6, p.13-20, 2007.

MOURA, R. S.; COELHO FILHO, M. A.; GHEYI, H. R.; JESUS, O. N.; LIMA, L. K. S.; JUNGHANS, T. G. Overcoming dormancy in stored and recently harvested *Passiflora* *cinninata* seeds. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 34, n. 5, p. 1158-1166, 2018.

MULLEN, S.F.; CRISTER, J.K. The Science of Cryobiology. In: WOODRUFF, T.K. & SNYDER, K.A. (Eds). **Oncofertility**: Fertility preservation for cancer survivors. Springer, New York, p.83-109, 2007.

NASSIF, S.M.L.; PEREZ, S.C.J.G.A. Efeitos da temperatura na germinação de sementes de amendoim-do-campo (*Pterogyne nitens* Tul.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 22, nº 1, p.1-6, 2000.

NEGREIROS, J.R.S.; WAGNER JÚNIOR, A.; ÁLVARES, V.S.; SILVA, J.O.C.; NUNES, E.S.; ALEXANDRE, R.S.; PIMENTEL, L.D.; BRUCKNER, C.H. Influência do estágio de maturação e do armazenamento pós-colheita na germinação e desenvolvimento inicial do maracujazeiro amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.28 p.21-24, 2006.

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

OLIVEIRA, D.A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S.R.S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: sustainable recovery and biological activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 111, p. 55-62, 2016.

OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; BARBOSA, C.J.; SANTOS-FILHO, H.P.; JESUS, O.N. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, p. 485-492, 2013.

PADUA, J. G.; SCHWINGEL, L. C.; MUNDIM, R. C.; SALOMÃO, A. N.; e ROVERIJOSÉ, S. C. B. Germinação de sementes de *Passiflora* *setacea* e dormência induzida pelo armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 80-85, 2011.

RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. How and why to measure the germination process? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.29, n.1, p.1-11, 2006.

REGO, M.M.; REGO, E.R.; NATTRODT, L.P.U.; BARROSO, P.A.; FINGER, F.L.; OTONI, W. C. Evaluation of different methods to overcome *in vitro* seed dormancy from yellow passion fruit. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.13, n.36, p.3657-3665, 2014.

REZAZADEH, A.; STAFNE, E. T. Comparison of Seed Treatments on the Germination of Seven Passion Fruit Species. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 11, p. 3074-3083, 2018.

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

SANTOS, C.H.B.; CRUZ NETO, A.J.; JUNGHANS, T.G.; JESUS, O.N.; GIRARDI, E.A. Estádio de maturação de frutos e influência de ácido giberélico na emergência e crescimento de *Passiflora* spp. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n.3, p.481-490, 2016.

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**, Dordrecht, v. 204, n. 1, p. 13-28, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, J.M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed, Porto Alegre, v. 6. p. 858, 2017.

TEIXEIRA, M.C.; MADER, G.; SILVA-ARIAS, G.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B. Effects of past climate on *Passiflora actinia* (Passifloraceae) populations and insights into future species management in the Brazilian Atlantic forest. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v.180, n.3, p.348-364, 2016.

TIWARI, A. K.; TIWARI, T. N.; PRASAD, S. R. Seed dormancy in ornamental plants: a review. **Indian Journal of Agricultural Science**, Delhi, v. 86, p. 580-592, 2016.

TOWILL, L.E. Cryopreservation of plant germplasm. In: TOWILL, L.E.; BAJAJ, Y.P.S. Cryopreservation of plant germplasm II. Biotechnology in Agriculture and Forestry, **Springer**, Berlin, v.50, p.4-21, 2002.

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.

VIEIRA, H.; CATUNDA, P.; 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. 2015. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, n. 1, p.65-71, 2015

YOCKTENG, R; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G; SOUZA-CHIES, T. *Passiflora*. In: KOLE, C. (ed) **Wild crop relatives**: genomic and breeding resources tropical and subtropical fruits. Springer, Berlin and Heidelberg, v. 23, n.1, p. 256, 2011.

CAPÍTULO II

**OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE GERMINAÇÃO *IN VITRO* E ANÁLISE HISTOQUÍMICA
DOS GRÃOS DE PÓLEN DE *Passiflora* spp.**

OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE GERMINAÇÃO *IN VITRO* E ANÁLISE HISTOQUÍMICA DOS GRÃOS DE PÓLEN DE *Passiflora* spp.

RESUMO: Estudos de viabilidade polínica são essenciais na produção de frutos e sementes, de importância para o melhoramento genético, além de serem fundamentais como suporte à estratégias de conservação. O objetivo desse trabalho foi investigar o meio de cultura adequado para a germinação *in vitro* dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico de onze espécies silvestres de *Passiflora* e adicionalmente examinar a viabilidade por meio de teste histoquímico com solução de Alexander a 2%. Para a germinação *in vitro*, utilizou-se dois meios de cultura, BK e SM suplementado com diferentes concentrações de sacarose (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35%). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 11 x 7 x 2 (espécie x concentrações de sacarose x meios de cultura). Com base nos resultados obtidos, observou-se que a sacarose influenciou a germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico do maracujazeiro. A espécie *P. edmundoi* foi a que apresentou maiores porcentagens de germinação (89%) e de crescimento do tubo polínico (2,6 mm) em meio de cultura SM suplementado com 30% e 15% de sacarose, respectivamente. Quanto à análise histoquímica verificou-se que as espécies de *Passiflora* apresentaram alta porcentagem de grãos de pólen viáveis acima de 79%. As informações obtidas nesse estudo, permitiram identificar o meio de cultura mais adequado para cada espécie de *Passiflora*, auxiliando na escolha dos genitores masculinos com alto potencial de fertilidade, buscando maximizar o potencial de pegamento nos cruzamentos controlados e no estabelecimento de programas de melhoramento genético de maracujazeiro. Outro impacto desses resultados está voltado para subsidiar estudos voltados à conservação de grãos de pólen.

Palavras-chave: Maracujazeiro; germinação *in vitro*, sacarose, tubo polínico, corante Alexander, melhoramento.

OPTIMIZATION OF *IN VITRO* GERMINATION MEDIA AND HISTOCHEMICAL ANALYSIS OF POLLEN GRAINS OF *Passiflora* spp.

ABSTRACT: Pollen viability studies are essential for the production of fruits and seeds, as well as for genetic improvement and conservation strategies. The objective of this work was to investigate the most suitable culture medium for *in vitro* germination of pollen grains and growth of pollen tubes of 11 wild *Passiflora* species and to examine the viability by means of histochemical testing with 2% Alexander solution. For *in vitro* germination, two culture media were used, BK and SM, both supplemented with different concentrations of sucrose (5, 10, 15, 20, 25, 30 and 35%). The experimental design was completely randomized in an 11 x 7 x 2 factorial scheme (species x sucrose concentrations x culture media). Sucrose influenced the germination of pollen grains and the growth of pollen tubes. *P. edmundoi* showed the greatest germination rate (89%) and pollen tube length (2.6 mm) in SM culture medium supplemented with 30% and 15% sucrose, respectively. Regarding the histochemical analysis, the *Passiflora* species presented high percentage of viable pollen grains (above 79%). The information obtained in this study allowed identifying the most suitable culture medium for each *Passiflora* species, helping in the choice of male parents with high potential for fertility, to maximize the potential success of controlled crosses in genetic improvement programs of passion fruit. The results can also support studies of the conservation of pollen grains.

Keywords: Passion fruit; *in vitro* germination, sucrose, pollen tube, Alexander solution, breeding.

1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro (*P. edulis* Sims) pertence à família Passifloraceae que é composta por 700 espécies, classificadas em 16 gêneros (FLORA DO BRASIL, 2020). Dentre esses, destaca-se o gênero *Passiflora* considerado o mais representativo com mais de 570 espécies das quais 153 são encontradas do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020) considerado um dos maiores centros de diversidade do gênero de *Passiflora* (OLIVEIRA et al., 2016) e o maior produtor e consumidor de maracujazeiro.

Em 2019, o Brasil produziu 602 mil toneladas em 42 mil hectares, sendo que 62.3% dessa produção estão distribuídos na região Nordeste e o Estado da Bahia se destacou como maior produtor da fruta, com 26.7% (IBGE, 2020). Entretanto, poucas espécies são cultivadas comercialmente no país como *Passiflora edulis* Sims (maracujá azedo), cultivada em 90% dos pomares comerciais e *Passiflora alata* Curtis (maracujá doce) (MUNHOZ et al., 2018).

O programa de melhoramento genético desenvolvido na Embrapa Mandioca e Fruticultura busca desenvolver variedades comerciais de *P. edulis* por meio de hibridações interespecíficas com as espécies silvestres de *Passiflora* que apresentam alelos de resistência à fatores bióticos e abióticos (PEREIRA et al., 2019; LIMA et al., 2020). As hibridações interespecíficas, são realizadas com finalidade de melhorar agronomicamente a qualidade dos frutos (SANTOS et al., 2015) e resistência às doenças (PEREIRA et al., 2019; SANTOS et al., 2019) de *P. edulis*. Como forma de diversificar o uso das passifloras, o programa de melhoramento tem sido voltado também para a obtenção de híbridos com potencial ornamental (SOARES et al., 2015; BELO et al., 2018).

Informações sobre a viabilidade e desenvolvimento dos grãos de pólen das passifloras silvestres são fundamentais para o êxito das hibridações interespecíficas, pois permitem um direcionamento mais eficiente nos cruzamentos controlados (BENKÓ et al., 2020; GÜÇLÜ et al., 2020). Essas informações são também importantes para estudos reprodutivos e como forma de subsidiar estudos que busquem estratégias de conservação de grãos de pólen. A criopreservação de grão de pólen já é uma realidade para várias espécies de plantas como *Ananas comosus* L. Merrill (SOUZA et al., 2018, 2017), *Lilium* (LI et al., 2019), *Paeonia suffruticosa* Andrews (REN et al., 2020). Portanto, a identificação do meio de cultura eficiente para

estimar a germinação, constitui uma das etapas limitantes no desenvolvimento dessa técnica de conservação do pólen.

A viabilidade dos grãos de pólen tem sido estudada por meio de diferentes métodos, seja pela germinação *in vitro* ou *in vivo* e por diferentes técnicas de coloração (TELLO et al., 2018; IMPE et al., 2020). Entretanto, as técnicas de coloração são mais rápidas, mas os grãos de pólen inviáveis geralmente absorvem o corante e a determinação dos grãos de pólen completamente corados é muitas vezes subjetiva e superestimada (ALEXANDER, 2019). Em vista disso, o teste de germinação *in vitro* de grão de pólen é considerado um dos métodos mais convenientes e confiáveis para testar a viabilidade de grãos de pólen (ALDAHADHA et al., 2019), já que simula as condições *in vivo*, a fim de avaliar a capacidade do grão de pólen de emitir o tubo polínico e realizar a fertilização (PEREIRA et al., 2018).

O maracujazeiro, cujo grão de pólen mesmo estando em estágio fisiológico adequado, requer um meio de cultura elaborado com diferentes componentes como boro, cálcio, potássio e também diferentes concentrações de sacarose para a sua germinação e crescimento do tubo polínico (SOARES et al., 2018; SOARES et al., 2013). Dentre esses componentes as sacarose tem um papel significativo por proporcionar um equilíbrio osmótico entre os grãos de pólen e a solução do meio de germinação e fornece energia para auxiliar na germinação e no rápido desenvolvimento do tubo polínico (LIN et al., 2017; LI et al., 2020).

A maioria dos trabalhos de germinação *in vitro* de grãos de pólen de *Passiflora* utiliza o meio de cultura estabelecido por SOARES et al., 2013 que contém 15% de sacarose, ácido bórico, nitrato de cálcio, nitrato de potássio e sulfato de magnésio e ágar. Embora esse meio de cultura tenha apresentado resultados satisfatórios para algumas espécies de maracujazeiro silvestre com porcentagens de germinação acima de 80%, existem casos em que a germinação *in vitro* é baixa (< 50%), ainda que apresente alto potencial de fertilização *in vivo*, o que demonstra que o meio de cultura não estava ajustado para essas espécies.

Considerando a alta especificidade na resposta da germinação dos grãos de pólen das diferentes espécies de passifloras aos meios de cultura, torna-se relevante o ajuste/otimização desse meio para cada espécie de maracujazeiro. Essa estratégia, permite aumentar a eficiência da técnica de germinação *in vitro* de grãos de pólen de

Passiflora e também garantir maior acurácia na identificação de indivíduos promissores para uso em programas de melhoramento genético.

O objetivo desse estudo foi determinar o meio de cultura e a concentração de sacarose adequada para máxima expressão de germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico de onze espécies de *Passiflora*, bem como avaliar a sua viabilidade polínica por meio da solução de Alexander, buscando assim, identificar genitores masculinos com alto potencial de fertilização para serem utilizados em cruzamentos interespecíficos e também subsidiar futuras pesquisas de criopreservação dos grãos de pólen.

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Material Vegetal

Como material vegetal foram utilizados grãos de pólen provenientes de onze espécies de *Passiflora*: *P. actinia* Hook (BGP-466), *P. alata* Curtis (BGP-220), *P. cincinnata* Mast. (BGP-471), *P. edmundoi* Sacco (BGP-472), *P. foetida* L. (BGP-395), *P. gibertii* N. E. Brown (BGP-148), *P. kermesina* Link & Otto (BGP-452), *P. pohlii* Mast. (BGP-454), *P. rubra* Linn. (BGP-125), *P. subrotunda* Mast. (BGP-441) e *P. tenuifila* Killip (BGP-105) conservadas no Banco Ativo de Germoplasma de Maracujazeiro da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Figura 1) localizada em Cruz das Almas, Bahia, Brazil (12°40'42.5" S, 39°05'15.0" W, 222 m de altitude). De acordo com a classificação de Köppen and Geiger (1928) o clima da região é uma transição do tipo Am a Aw (tropical subúmido a seco), com temperatura média anual do ar de 23,8°C, precipitação pluviométrica anual média de 1.224 mm, concentrada de junho a agosto, e umidade relativa média anual em torno de 80%.

1.2 Otimização de meio de cultura para germinação de pólen *in vitro*

Os grãos de pólen utilizados na realização do trabalho foram provenientes de anteras coletadas de diferentes flores (n = 5) na antese e distribuídos em placas de Petri (50 mm x 50 mm de diâmetro) contendo 10 mL de meio de cultura (SM) estabelecido por Soares et al. (2008) contendo [0,03% Ca(NO₃)-4H₂O, 0,02% Mg(SO₄)-7H₂O, 0,01% KNO₃ e 0,01% H₃BO₃] com adição de 15% de sacarose, solidificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 7,0, chamamos esse de meio

básico, que obteve bons resultados para germinação de grãos de pólen de várias espécies de maracujazeiro (SOARES et al., 2013; 2015; 2018). No entanto, nesse ensaio preliminar, algumas das espécies estudadas pela primeira vez como *P. kermesina*, *P. pohlii* e *P. actinia* não apresentaram germinação nesse meio básico, demandando ajustes para promover a germinação nessas espécies e maximizar o potencial de germinação. Para isso, foram testados em nosso estudo dois meios de cultura, o BK (BREWBAKER e KWACK, 1963) contendo [0,03% Ca(NO₃)-4H₂O, 0,02% Mg(SO₄)-7H₂O, 0,01% KNO₃ e 0,01% H₃BO₃] com adição de 10% de sacarose, solidificado com 0,8% de ágar e pH ajustado para 6,5. e SM (SOARES et al., 2008), suplementados com sete diferentes concentrações de sacarose (5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35%).

Os grãos de pólen foram removidos das anteras, nas mesmas condições do ensaio anterior, e distribuídos nas placas de Petri com o auxílio de um pincel. Em seguida, as placas de Petri foram mantidas em temperatura controlada (27 ± 1 °C) no escuro por 24 horas, antes da realização da contagem de grãos de pólen germinados e do comprimento do tubo polínico, com auxílio de um estereomicroscópio Leica EZ4 (Leica, Wetzlar, Alemanha). O grão de pólen foi considerado germinado quando o comprimento do tubo foi igual ou superior ao diâmetro do grão de pólen (PÉREZ et al., 2019).

Para cada meio de cultura e diferentes concentrações de sacarose foram avaliadas três placas de Petri, sendo contabilizados para cada placa de Petri a germinação de pelo menos 100 grãos de pólen com auxílio de estereomicroscópio, totalizando 300 grãos de pólen. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 11 x 7 x 2 (espécie x concentração de sacarose x tipo de meio de cultura).

1.3 Avaliação do comprimento de tubo polínico

O crescimento do tubo polínico das onze espécies de *Passiflora* foi avaliado 24 horas após seu cultivo *in vitro*. Foram selecionados aleatoriamente 30 tubos polínicos de cada meio de cultura e espécie avaliada. O comprimento do tubo polínico (mm) foi mensurado com o auxílio do software ImageJ 1.46r (RASBAND 1997-2016) utilizando as imagens obtidas a partir do estereomicroscópio.

1.4 Histoquímica dos grãos de pólen

Para avaliação a avaliação histoquímica, os grãos de pólen foram coletados de anteras de diferentes flores (n = 5). Em seguida, os grãos de pólen foram distribuídos em lâminas de vidro e corados com solução de Alexander a 2% (ALEXANDER, 1980). Para obter uma amostra aleatória de grãos de pólen corados, utilizou-se o método de varredura, observando 100 grãos de pólen/ lâmina/ espécie com três repetições, totalizando 300 grãos de pólen, com o auxílio de um microscópio óptico (Leica, Wetzlar, Alemanha). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições por espécie de *Passiflora* estudada e cada repetição foi representada por uma lâmina de vidro.

1.5 Análise estatística

Os dados de porcentagem foram transformados em arco-seno ($\sqrt{x/100}$) para padronização e homogeneidade das variâncias. Para os dados de germinação *in vitro* dos grãos de pólen e comprimento do tubo polínico foram realizadas análises descritivas utilizando estatística descritiva Boxplot. Para análise histoquímica dos grãos de pólen, os valores foram representados pela média \pm erro padrão (EP). As análises de Boxplot foram realizadas usando o pacote “ggplot2” implementado no programa R (R Development Core Team, 2018). Em complementação à análise estatística, os dados também foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o pacote "agricolae" implementado no software R.

2. RESULTADOS

2.1 Germinação *in vitro* de grãos de pólen e comprimento do tubo polínico

Com base nos resultados obtidos, foi possível identificar diferentes respostas das onze espécies de *Passiflora* estudadas (Figura 1) em relação à germinação *in vitro* do grão de pólen e crescimento do tubo polínico nos diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose.



Figura 1. Visão geral das flores das 11 espécies de *Passiflora* utilizadas nesse estudo: a) *P. actinia*. b) *P. alata*. c) *P. cincinnata*. d) *P. edmundoi*. e) *P. foetida*. f) *P. gibertii*. g) *P. kermesina*. h) *P. pohlii*. i) *P. rubra*. j) *P. subrotunda*. k) *P. tenuifila*.

A concentração de sacarose afetou significativamente ($p \leq 0,05$) a germinação dos grãos de pólen das diferentes espécies de *Passiflora* inoculados nos meios SM e BK. Foi observada também uma interação entre o meio de cultura x concentração de sacarose (Figura 2), que possibilitou identificar o comportamento de cada espécie dentro das concentrações de sacarose e nos meios de culturas testados. Para a maioria das espécies de *Passiflora*, observou-se que a combinação do meio SM com 30% ou 35% de sacarose proporcionaram os maiores percentuais de germinação dos grãos de pólen quando comparado ao meio básico que contém na sua formulação 15% de sacarose (Figura 2).

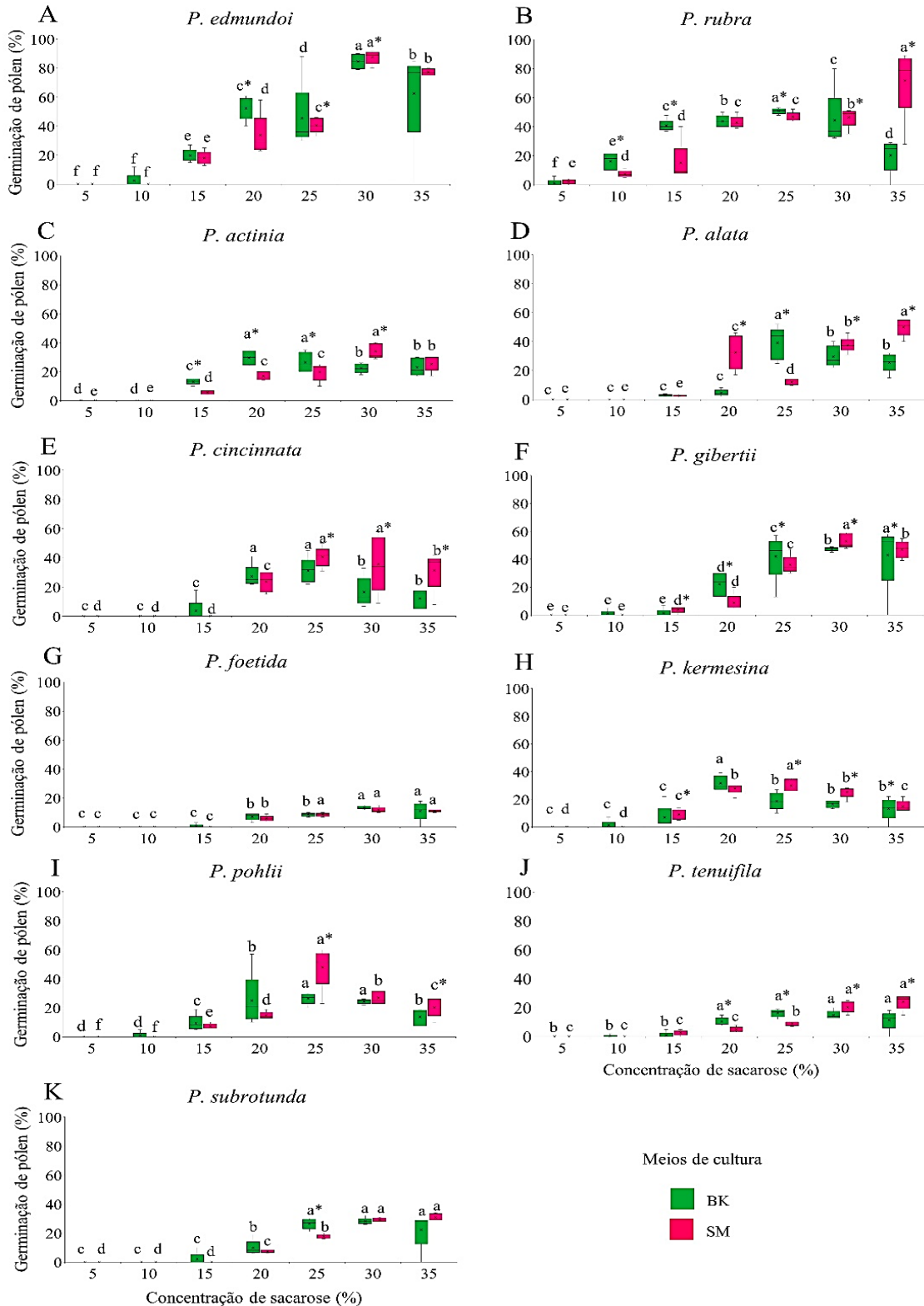


Figura 2. Boxplot da germinação *in vitro* dos grãos de pólen nas onze espécies de *Passiflora* mostrando o efeito da concentração de sacarose nos meios de culturas SM e BK. A linha demonstrada no box, corresponde à média e o “x” o valor da mediana. As diferentes letras minúsculas no topo das barras de erro indicam variação significativa pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$) entre as concentrações de sacarose dentro de meio de cultura. *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, entre os meios de cultura considerando a concentração de sacarose.

P. edmundoi e *P. rubra* foram as espécies que apresentaram os maiores registros de germinação dos grãos de pólen com 89% (Figura 2a; Figura 3a-b) e 82,2% (Figura 2b, Figura 3c-d) quando avaliadas em meio SM com 30% e 35% de sacarose, respectivamente. Para as demais espécies de *Passiflora*, foi possível identificar para *P. actinia* 34% de germinação dos grãos de pólen em meio de cultura SM suplementado com 30% de sacarose (Figura 2c; Figura 3e-f), 50% de germinação para *P. alata* quando cultivado em meio SM com 35% de sacarose (Figuras 2d; Figura 3g-h). Em *P. cincinnata*, foi observado maior porcentagem de grão de pólen germinados (42,8%) em meio de cultura SM contendo 30% de sacarose, embora não diferiu do meio contendo 25% desse carboidrato com 42,6% de germinação (Figura 2e; Figura 3i-j).

Para *P. gibertii* verificou-se que os meios de cultura SM e BK combinados com 30% e 35% de sacarose, induziram maiores percentuais de germinação de grãos de pólen com 54,4% e 54% (Figura 2f; Fig. 3k-l), respectivamente. Na espécie *P. foetida*, foi observada uma germinação de 13% no meio BK contendo 30% ou 35% de sacarose, embora não diferiu do meio SM combinado com essas concentrações de sacarose (Figura 2g; Figura 3m-n). Para *P. kermesina* e *P. pohlii* a concentração de 25% de sacarose adicionada no meio SM promoveu melhor desempenho com 32,6% (Figura 2h; Figura 3o-p), e 54,8% de grãos de pólen germinados (Figura 2i; Figura 3q-r), respectivamente. Já nas espécies *P. tenuifila* e *P. subrotunda* observou-se os maiores percentuais de germinação dos grãos de pólen em meio SM suplementados com 35% de sacarose com valores respectivos, de 25% (Figura 2j; Figura 3s-t) e 31,4% (Figura 2k; Figura 3u-v).

Em nosso estudo, não foi observada germinação *in vitro* de grãos de pólen nos meios BK e SM suplementados com 5% e 10% de sacarose (Figura 2), à exceção de *P. rubra*, que apresentou germinação de 2,6% e 6,4% nos meios SM combinados com 5% e 10% de sacarose, respectivamente, e também no meio BK contendo 10% desse carboidrato, com 16,4% de grãos germinados (Figura 2b).

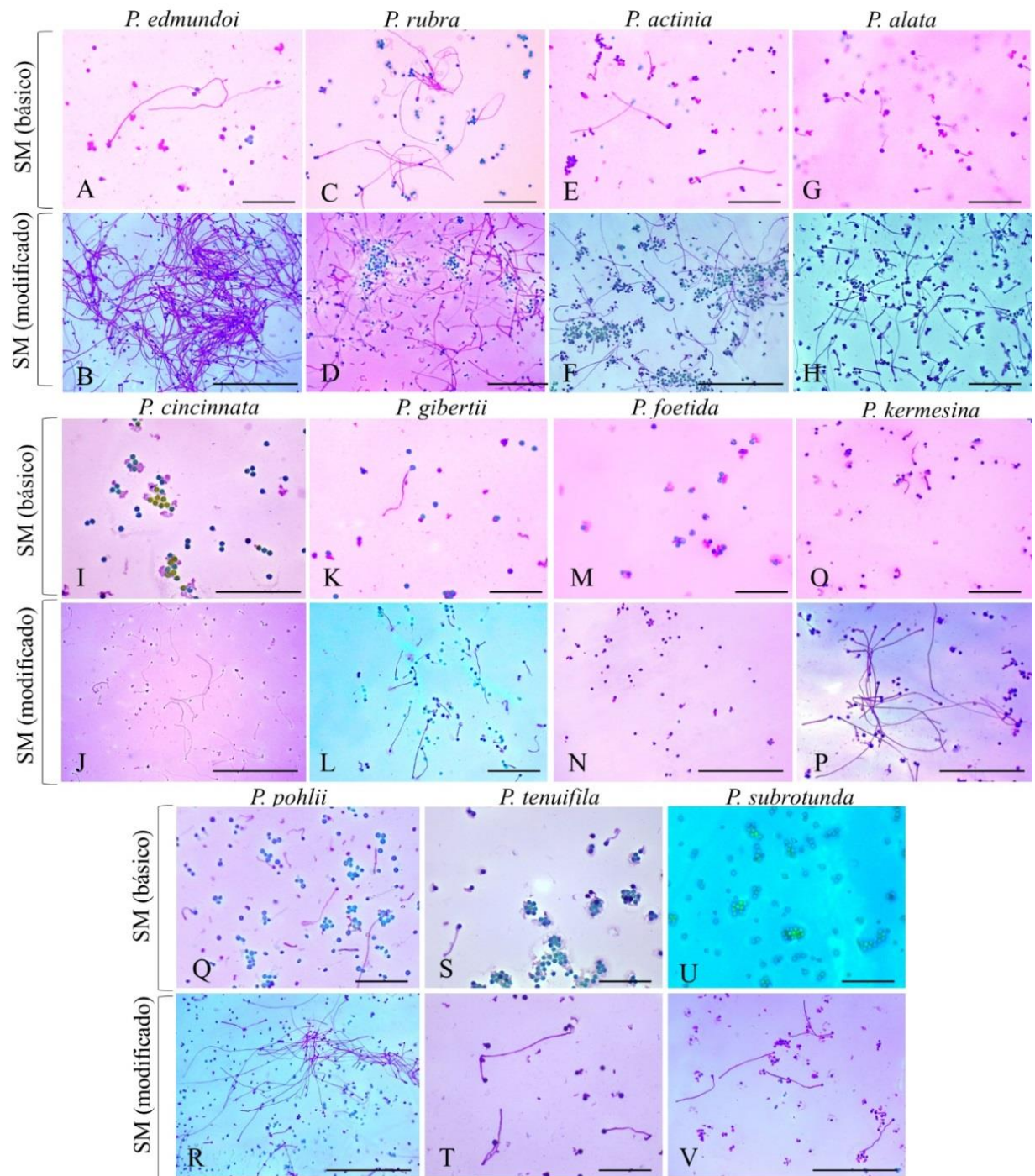


Figura 3. Germinação *in vitro* dos grãos de pólen das onze espécies de *Passiflora* inoculados em meio básico (SM + 15% de sacarose) e em meio otimizado para cada espécie, após 24 horas de cultivo *in vitro*. a-b) *P. edmundoi* cultivados em meio básico (a) e em SM + 30% sacarose (b). c-d) *P. rubra* em meio básico (c) e SM + 35% sacarose (d). e-f) *P. actinia* em meio básico (e) e SM + 30% sacarose (f). g-h) *P. alata* em meio básico (g) e SM + 35% sacarose (h). i-j) *P. cincinnata* em meio básico (i) e em SM + 30% sacarose (j). k-l) *P. gibertii* em meio básico (k) e SM + 30% sacarose (l). m-n) *P. foetida* em meio básico (m) e SM + 30% sacarose (n). o-p) *P. kermesina* em meio básico (o) e SM + 25% sacarose (p). q-r) *P. pohlii* em meio básico (q) e SM + 25% sacarose (r). s-t) *P. tenuifila* em meio básico (s) e SM + 35% sacarose (t). u-v) *P. subrotunda* em meio básico (u) e SM + 35% sacarose (v).

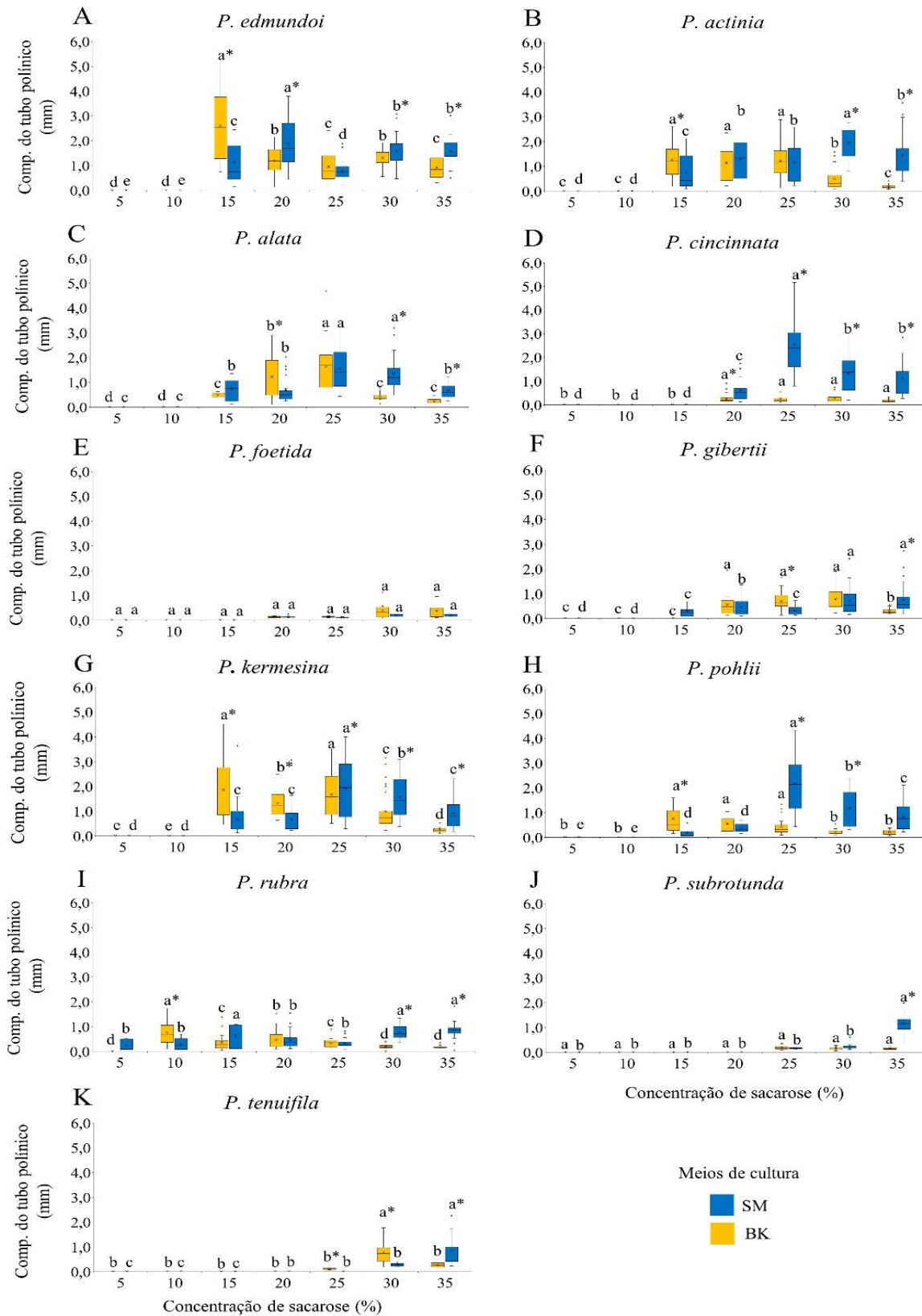


Figura 4. Box plot do comprimento do tubo polínico das onze espécies *Passiflora* cultivadas nos meios BK e SM suplementada com diferentes concentrações de sacarose. A linha demonstrada no box, corresponde à média e o “x” o valor da mediana. As diferentes letras no topo das barras de erro indicam médias estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$). Os círculos (●) representam os “outliers”.

A qualidade dos grãos de pólen é quantificada, não apenas pela capacidade de germinação, mas também pelo comprimento do tubo polínico. De forma análoga ao observado com a porcentagem de germinação *in vitro* dos grãos de pólen, o comprimento do tubo polínico das onze espécies de *Passiflora* também foi influenciado ($p \leq 0.05$) pela concentração de sacarose adicionada aos meios de cultura. O comprimento do tubo polínico entre as diferentes espécies variou de 0,37 mm observado em *P. foetida* com o meio de cultura BK contendo 30 a 35% de sacarose (Figura 4e) a 2.60 mm em *P. edmundoi* em meio de cultura BK contendo 15% de sacarose (Figura 4a).

Quanto às outras espécies de *Passiflora* os resultados foram variados com maior comprimento do tubo polínico em *P. actinia* em meio SM suplementado com 30% de sacarose (1,94 mm) (Figura 4b); *P. alata* em meio BK combinado com 25% de sacarose com 1,64 mm (Figura 4c); *P. cincinnata* em meio SM acrescido de 25% de sacarose (2,55 mm) (Figura. 4d); *P. gibertii* – BK com 30% de sacarose com 0.79 mm (Figura 4f), embora não diferiu do tratamento SM + 30% de sacarose (0.72 mm); *P. kermesina* – SM +25% de sacarose (1.93 mm) (Figura 4g); *P. pohlii* – SM + 25% de sacarose (2.16 mm) (Figura. 4h); *P. rubra* - SM + 35% (0.87 mm) (Figura 4j) e para espécies *P. subrotunda* e *P. tenuifila* verificou-se maior crescimento do tubo polínico nos meios SM combinado com 35% de sacarose com 1.16 mm (Figura 4l) e 0.91 mm (Figura 4m), respectivamente.

2.2 Histoquímica dos grãos de pólen

Com base nos resultados da viabilidade dos grãos de pólen estimada com uso da solução de Alexander, observou-se grande variabilidade entre as espécies de *Passiflora* avaliadas (Figura 5a). Houve a formação de pelo menos três grupos. O grupo 1, formado pela maioria das espécies de *Passiflora* (*P. gibertii*, *P. subrotunda*, *P. edmundoi*, *P. kermesina*, *P. foetida* e *P. tenuifila*) apresentou porcentagem de viabilidade oscilando de 93% (*P. gibertii*) a 98,5% (*P. tenuifila*). O grupo 2 foi representado por quatro espécies de *Passiflora* (*P. cincinnata*, *P. alata*, *P. actinia* e *P. pohlii*), com viabilidade polínica variando de 86,6% (*P. pohlii*) a 91,6% (*P. cincinnata*). Já o terceiro e o último grupo, foi constituído por uma única espécie (*P. rubra*) com 79,7% de grão de pólen viáveis.

Os grãos de pólen corados com solução de Alexander apresentaram uma dupla coloração devido à utilização simultânea de verde malaquita e fucsina ácida, sendo que o primeiro tem afinidade com a celulose presente na parede celular corando-a de verde, enquanto que o protoplasma é corado de rosa pela fucsina ácida (Figura 5b - seta cheia). Já os grãos de pólen abortados e inviáveis por não apresentarem protoplasma, coraram-se apenas de verde (Figura 5b - seta pontilhada).

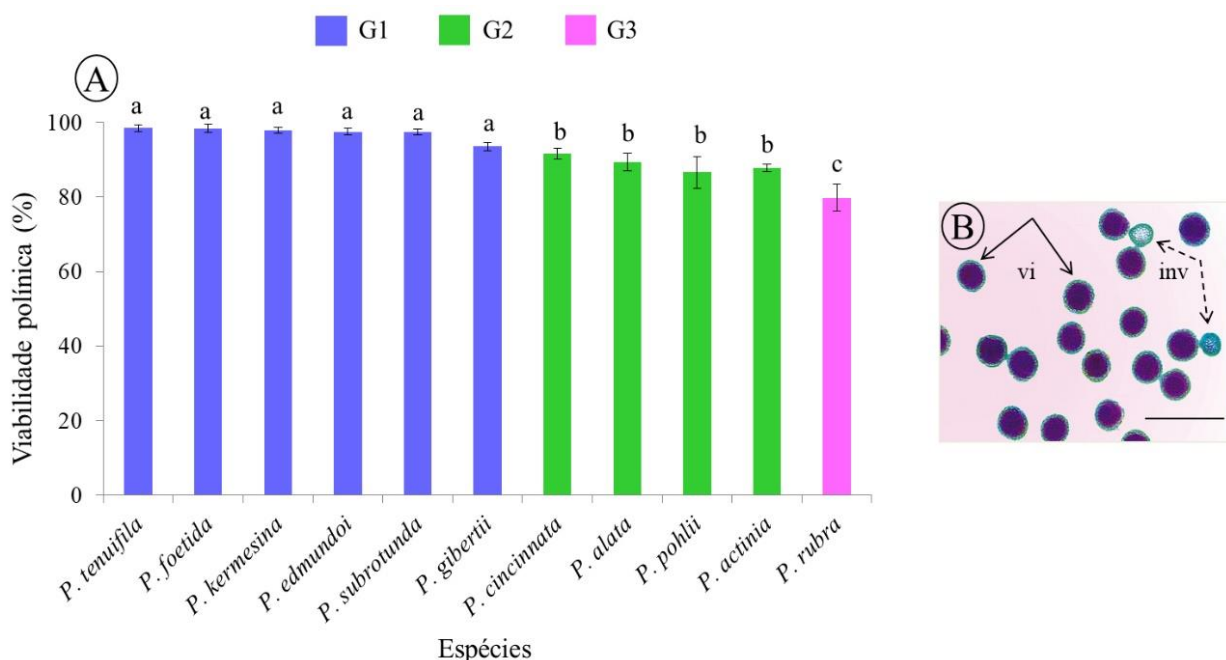


Fig. 5. Fotomicrografia da viabilidade do pólen das onze espécies de *Passiflora* por meio do corante reativo de Alexander. a) Porcentagem de grãos de pólen viáveis. b) Aspecto dos grãos de pólen corados de rosa púrpura (viáveis – seta cheia) e com coloração esverdeada (inviáveis – seta pontilhada). Médias seguidas por letras iguais pertence ao mesmo agrupamento pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3. DISCUSSÃO

Informações sobre viabilidade de grãos de pólen no germoplasma avaliado são fundamentais para trabalhos de biologia reprodutiva e melhoramento genético, pois permitem auxiliar na identificação dos cruzamentos mais promissores para uso em hibridações (FRAGALLAH et al., 2019; IMPE et al., 2020, SILVA et al., 2020).

No presente estudo, avaliamos diferentes concentrações de sacarose combinados nos meios de germinação de grãos de pólen BK e SM após resultados insatisfatórios com os meios de germinação relatados anteriormente para o maracujá (SOARES et al., 2013; SOARES et al., 2015). Vale destacar que esses meios de

cultura BK e SM contêm diversas substâncias orgânicas e inorgânicas como sacarose, ácido bórico, nitrato de cálcio, nitrato de potássio e sulfato de magnésio, e são amplamente utilizados na germinação dos grãos de pólen de inúmeras espécies de plantas (HINE et al., 2019; SILVA et al., 2020; WANI et al., 2020).

Aqui, os meios de cultura testados foram otimizados pela primeira vez a partir da modificação da concentração de sacarose. Foi possível observar que a suplementação exógena de diferentes concentrações desse carboidrato afetou significativamente a germinação dos grãos de pólen e o crescimento do tubo polínico das onze espécies de *Passiflora* estudadas. O comportamento dessas espécies também foi diferenciado dentro de cada concentração de sacarose, evidenciando a interação espécie x concentração de sacarose.

Não foi observada germinação *in vitro* dos grãos de pólen nos meios de culturas hipotônicos (5% e 10% de sacarose) para a maioria das espécies de *Passiflora*, confirmando a importância da adequação da concentração de sacarose no meio para o desenvolvimento do tubo polínico. Outros autores também observaram que a utilização de sacarose em baixas concentrações no meio de cultura não forneceram energia suficiente para que os grãos de pólen pudessem expressar a sua capacidade germinativa (PADUREANU et al., 2020). Portanto, uma concentração adequada de sacarose é essencial para a germinação dos grãos de pólen e crescimento do tubo polínico, embora quando utilizada em altas concentrações pode também suprimir ambos os processos (LIN et al., 2017).

A sacarose além de regular a pressão osmótica do meio de cultura também fornece energia nos processos biossintéticos envolvidos no crescimento, na diferenciação e na morfogênese celular (SILVA et al., 2016). É interessante destacar que a concentração ótima de carboidrato para a germinação dos grãos de pólen difere consideravelmente entre diferentes espécies de plantas (LIU et al., 2013; PADUREANU et al., 2020). Em nosso estudo, pode-se observar para a maioria das espécies de *Passiflora* um aumento na porcentagem de germinação com o incremento da concentração de sacarose no meio de cultura, sendo que nas mais altas concentrações desse carboidrato (30% ou 35%) adicionadas no meio SM foi observada uma maior germinabilidade dos grãos de pólen.

Provavelmente, a maior porcentagem de germinação com a elevação da concentração de sacarose pode ser justificada pela maior oferta de energia, com

favorecimento do crescimento do tubo polínico. Esses resultados são consistentes aos obtidos por outros autores investigando diferentes espécies de plantas, tais como *Momordica subangulata* Blume ssp. *renigera* (G. Don) de Wilde (NAIK et al., 2016), *Cunninghamia lanceolata* L. (FRAGALLAH et al., 2019), *Betula utilis* D. Don (WANI et al., 2020), já que os mesmos reportaram maior porcentagem de germinação com o aumento das concentrações de sacarose adicionada ao meio de cultura. Em contrapartida, Silva et al. (2020) ao avaliarem a germinação *in vitro* dos grãos de pólen de *Castanea crenata* Siebold & Zucc. observaram um decréscimo na porcentagem de germinação quando a mais alta concentração de sacarose foi adicionada no meio de cultura.

Com relação às espécies de *Passiflora* avaliadas, cinco delas (*P. edmundoi*, *P. rubra*, *P. alata*, *P. gibertii* e *P. pohlii*) apresentaram germinação de pólen acima de 55,0%; quatro (*P. cincinnata*, *P. kermesina* e *P. subrotunda*) com germinação variando de 30,0 a 43,0% e *P. actinia* com 25 % e *P. foetida* com 13,0% de grãos germinados, respectivamente. Essas diferenças nos percentuais de germinação observadas em nosso estudo, provavelmente podem estar relacionadas à demanda energética que é variável e justifica essa alta especificidade da concentração de sacarose em relação aos meios de cultura testados.

Estudos prévios realizados por outros autores também observaram diferentes respostas na germinação dos grãos de pólen de onze espécies de *Passiflora* cultivados em meio SM enriquecido com 15% de sacarose (SOARES et al., 2018). Vale destacar, que em nosso estudo foi possível identificar pelo menos duas espécies de *Passiflora* (*P. rubra* e *P. tenuifila*) comuns aos relatados por Soares et al. (2018) e as porcentagens de germinação dos grãos de pólen apresentados por essas espécies quando cultivados nesse mesmo meio de cultura foram expressivamente inferiores aos obtidos por esses autores. Por outro lado, quando otimizamos a concentração de sacarose nesse meio de cultura para 30% ou 35% foram observadas nessas duas espécies de *Passiflora* percentuais de germinação de grãos de pólen significativamente superiores aos relatados por Soares et al. (2018). Essa grande diferença na porcentagem de germinação dos grãos de pólen obtida em nosso estudo quando comparada aos de Soares et al. (2018), pode ser devido, além da suplementação exógena de sacarose no meio de cultura, a outros fatores, como o estado nutricional das plantas, condições ambientais, estação do ano, temperatura

(PÉREZ et al., 2019, IMPE et al., 2020; PADUREANU et al., 2020), bem como pode variar consideravelmente entre indivíduos de uma mesma espécie (SILVA et al., 2020).

Para o maracujazeiro, ainda são necessários estudos para se determinar qual a porcentagem de germinação polínica mínima para uma boa fecundação e frutificação efetiva. A maioria dos trabalhos realizados com *Passiflora* (SOARES et al., 2013; 2015; 2018) utiliza como critério na seleção de espécies polinizadoras a hipótese descrita por Scorzam and Sherman (1995), em que grãos de pólen de boa qualidade devem apresentar alta germinação polínica, ou seja, acima de 50.0% e tubos polínicos bem desenvolvidos.

Levando-se em consideração a informação mencionada acima, cinco espécies de *Passiflora* avaliadas no presente estudo, como *P. edmundoi*, *P. rubra*, *P. alata*, *P. gibertii* e *P. pohlii* mostram-se promissoras para serem utilizadas em cruzamentos para obter populações segregantes, já que apresentaram porcentagem de germinação acima de 50%. A maioria dessas espécies pertence ao subgênero *Passiflora* (*P. edmundoi*, *P. racemosa* e *P. gibertii*) com $2n = 18$ e são consideradas autoincompatíveis (SOARES et al., 2015), enquanto que *P. rubra* e *P. pohlii* pertencem ao subgênero *Decaloba* com $2n = 12$ e são consideradas autocompatível (FARIA; STEHMANN, 2010; SCORZA; DORNELAS, 2014). Apesar de não existir homologia cromossômica entre as espécies representadas por esses dois subgêneros, muitos híbridos interespecíficos tem sido obtidos com sucesso, porque as barreiras de incongruências são frágeis (BELO et al., 2018).

Esse é o primeiro trabalho a fornecer dados sobre o crescimento do tubo polínico em *Passiflora*. Os resultados obtidos, mostraram que a concentração de sacarose adicionadas aos meios de cultura SM e BK, influenciaram significativamente o desenvolvimento do tubo polínico nas diferentes espécies de maracujazeiro avaliadas. De maneira geral, a concentração de 25% sacarose e o meio SM proporcionaram os maiores comprimentos dos tubos polínicos.

A espécie *P. edmundoi* foi que apresentou tubos polínicos mais desenvolvidos, enquanto que em *P. foetida* observou-se menor comprimento do tubo polínico. Estudos realizados com outras espécies de plantas também revelaram que o comprimento do tubo polínico foi afetado significativamente pelas concentrações de sacarose (THU et al., 2017; FRAGALLAH et al., 2019; KOEN et al., 2020).

É interessante destacar que a germinação de grãos de pólen *in vitro* fornece um sistema experimental controlado, mas não reproduz completamente o crescimento do tubo polínico *in vivo*, onde as interações entre os grãos de pólen e a superfície do estigma são mais complexas (NOVARA et al., 2017), por isso a importância de tê-la bem ajustada para cada espécie de *Passiflora*. Entretanto, a germinação dos grãos de pólen em meio de cultura ainda é a principal técnica que apresenta resultados semelhantes aos que provavelmente ocorrem *in vivo* e por isso a importância de tê-la bem ajustada para cada espécie de maracujazeiro (SOARES et al., 2015).

A presente pesquisa mostra também a viabilidade polínica estimada com uso da solução de Alexander, quando observou-se que todas as espécies de maracujazeiro apresentaram viabilidade acima de 70%, que é satisfatória para uso em programas de hibridação controlada. No entanto, esse teste histoquímico apesar de muito atraente por sua simplicidade e velocidade na aplicação, superestima a viabilidade dos grãos de pólen quando comparado aos resultados obtidos pelo teste de germinação *in vitro* (ALEXANDER et al., 2019; IMPE et al., 2020). Os resultados obtidos em nosso estudo comprovam essa afirmativa, já que os dados de germinação *in vitro* dos grão de pólen foram bastante inferiores aos observados com teste histoquímico, à exceção de *P. edmundoi* e *P. rubra* que apresentaram resultados *in vitro* bem próximos aos dados de viabilidade com o uso do corante Alexander.

Levando-se em consideração a variabilidade genética do gênero *Passiflora*, a análise da fertilidade dos grãos de pólen dos genitores masculinos coletados no campo é condição preliminar indispensável para o sucesso dos cruzamentos voltados para obtenção de híbridos com potencial agrônômico e ou ornamental. Portanto, o conhecimento da viabilidade polínica mediada pela germinação *in vitro* do grão de pólen buscando identificar o meio de cultura e a concentração de sacarose adequados para maximização do potencial germinativo de cada espécie de *Passiflora* e também por meio da análise histoquímica geraram informações úteis na seleção de genótipos promissores para uso em programas de hibridação.

É interessante destacar a necessidade de mais estudos voltados para maximizar a germinação dos grãos de pólen de algumas espécies de *Passiflora*, principalmente as que apresentaram porcentagem de germinação abaixo de 50% por meio da manipulação de outras fontes de açúcar como (rafinose, maltose, celobiose, estaquiose) que tem demonstrado resultados satisfatórios quando comparado a

sacarose (HIRSCHE et al., 2017; IMPE et al., 2020). A partir disso, outra abordagem que será foco de investigação futura refere-se a conservação de grãos de pólen, já que o maracujazeiro apresenta assincronia de florescimento, que muitas vezes limita hibridações de interesse. E com essa técnica, os grãos de pólen podem ser utilizados a qualquer momento, além de proporcionar a preservação do germoplasma e melhorar a eficiência dos programas de melhoramento.

5. CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo mostraram que a resposta da germinação dos grãos de pólen *in vitro* e o comprimento do tubo polínico foram influenciados pelo meio de cultura BK e SM e pela concentração de sacarose suplementada nesses meios. A adição de 30 % ou 35 % de sacarose no meio SM proporcionaram os maiores percentuais de germinação para maioria das espécies de *Passiflora* investigadas. Quanto ao comprimento do tubo polínico, observou-se que a suplementação de 25 % de sacarose contribuiu para emissão de tubos polínicos mais longos. Para a viabilidade polínica com uso do corante Alexander foi possível identificar alta porcentagem de grãos de pólen viáveis acima de 79 %. *P. edmundoi* foi que apresentou maior viabilidade polínica bem como tubos polínicos mais longos, sendo considerado forte candidato para ser utilizado como parental masculino em cruzamentos interespecíficos voltados para obtenção de híbridos com potencial agrônomico e ou ornamental. É importante destacar a necessidade de expandir esse estudo para outras espécies de *Passiflora*, explorando assim a rica variabilidade genética presente nesse gênero buscando identificar materiais potencialmente promissores para serem utilizados no programa de melhoramento e também para futuros estudos de criopreservação de pólen de maracujazeiro.

REFERÊNCIAS

- ALDAHADHA, A.; AL SANE, K.; BATAINEH, A.; ALLOUSH, A. A.; HAMOURI, Z. Pollen viability and *in vitro* germination of six pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars grown in northern Jordan. **Advances in Horticultural Science**, Baq'a, Jordan, v. 33, n. 3, p. 441-446, 2019.
- ALEXANDER, L.W. Optimizing pollen germination and pollen viability estimates for *Hydrangea macrophylla*, *Dichroa febrifuga*, and their hybrids, **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 246, p. 244-250. 2019.
- ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. **Stain Technol**, Bangalore, v. 55, n. 1, p. 13-18, 1980.
- BELO, G.O., SOUZA, M.M., SILVA, G.S., LAVINSCKY, M.P. Hybrids of *Passiflora*: *P. gardneri* versus *P. gibertii*, confirmation of paternity, morphological and cytogenetic characterization. **Euphytica**, Dordrecht , v. 214, n.2, p. 1-13, 2018.
- BENKÓ, P., JEE, S., KASZLER, N., FEHÉR, A., GÉMES, K. Polyamines treatment during pollen germination and pollen tube elongation in tobacco modulate reactive oxygen species and nitric oxide homeostasis. **Journal of Plant Physiology**, Oxford, v. 22, p. 1-7. 2020.
- BERNACCI, L.C., CERVI, A.C., MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A., NUNES, T.S., IMIG, D.C., MEZZONATO, A.C., Passifloraceae. In: AUTORES. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015.. Disponível em :< <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>.> Acesso em: mar. 2020.
- BREWBAKER, James L.; KWACK, Beyoung H. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. **American journal of botany**, Philadelphia, v. 50, n. 9, p. 859-865, 1963.
- CARVALHO, B. M.; VIANA, A. P.; SANTOS, P. H. D.; GENEROSO, A. L.; CORRÊA, C. C. G.; SILVEIRA, V.; SANTOS, E. A. Proteome of resistant and susceptible *Passiflora* species in the interaction with *Cowpea aphid-borne mosaic virus* reveals distinct responses to pathogenesis. **Euphytica**, Wageningen, v. 215, n. X, p. 1-17, 2019.
- CAUZ-SANTOS, L. A.; MUNHOZ, C. F.; RODDE, N.; CAUET, S.; SANTOS, A. A.; PENHA, H. A.; DORNELAS, M. C.; VARANI, A. M.; OLIVEIRA, G. C. X.; BERGÈS, H.; VIEIRA, M. L. C. The chloroplast genome of *Passiflora edulis* (Passifloraceae) assembled from long sequence reads: structural organization and phylogenomic studies in Malpighiales. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, p.1–17, 2017.
- COELHO, M.S.E., BORTOLETI, K.C.A. , ARAÚJO, F.P., MELO, N.F. Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrid and its parentes. **Euphytica**, Wageningen, v. 210, p. 93–104, 2016.
- COSTA, A.P., PEIXOTO, J.R., BLUM, L.E.B. VILELA, M.S., VENDRAME, W. Development and validation of a standard area diagram set as assessment aid for

estimating the severity of bacterial spot on tri-lobed leaves of yellow passion fruit. **Biosci**, Washington, v. 35, p. 1728-1746, 2019.

FRAGALLAH, S.A.D.A., LIN, S., LI, N., LIGATE, E.J., CHEN, Y. Effects of sucrose, boric acid, pH, and incubation time on *in vitro* germination of pollen and tube growth of chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* L.). **Forests**, Heidelberg, v.10, p. 2-16. 2019.

GÜÇLÜ, S.F., ÖNCÜ, Z., KOYUNCU, F. Pollen performance modelling with an artificial neural network on commercial stone fruit cultivars. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, Heidelberg, v. 61, p. 1-17, 2020.

HINE, A., ROJAS, A., SUAREZ, L., MURILLO, O., ESPINOZA, M. Optimization of pollen germination in *Tectona grandis* (Teak) for breeding programs. **Forests**, Heidelberg, v.10, 1-10, 2019.

HIRSCHE, J., FERNÁNDEZ, J.M.G., J.M., STABENTHEINER, E., GROBKINSKY, D.K., ROITSCH, T. Differential effects of carbohydrates on Arabidopsis pollen germination. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 58, n.4, p.691–701, 2017.

IBGE–Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?t=4&z=t&o=11&u1=1&u2=27&u3=1&u=27&u5=1&u6=1>, 2020. (Accessed 15 February 2020).

IMPE, D., REITZ, J., KÖPNIC, C., ROLLETSCHEK, H., BÖRNER, A., SENULA, A., NAGEL, M. Assessment of pollen viability for wheat. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.10, p.1-13, 2020.

KOEN, J., SLABBERT, M.M., BOOYSE, M., BESTER, C. Honeybush (*Cyclopia* spp.) pollen viability and surface morphology. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v.128, p. 167-173, 2020

KÖPPEN, W., GEIGER, R. Klimate der Erde. **Gotha**: Verlag Justus Perthes. Wall-map 150cmx200cm. 1928.

LI, J.-W., ZHANG, X.-C., WANG, M.-R., BI, W.-L., FAISAL, M., SILVA, J.A.T., VOLK, G.M., WANG, Q.-C. Development, progress and future prospects in cryobiotechnology of *Lilium* spp. **Plant Methods**, Heidelberg, v.15, p.1-12, 2019.

LI, C., MENG, D., PIÑEROS, MI.A., MAO, Y., DANDEKAR, A.M., CHENGA, L. A sugar transporter takes up both hexose and sucrose for sorbitol-modulated *in vitro* pollen tube growth in apple. **The Plant Cell**, Heidelberg, v.32, p. 449–469, 2020.

LIMA, L.K. S., JESUS, O.N., SOARES, T.L., SANTOS, I.S., OLIVEIRA, E.J., COELHO FILHO, M.A. Growth, physiological, anatomical and nutritional responses of two phenotypically distinct passion fruit species (*Passiflora* L.) and their hybrid under saline conditions. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 263, p. 1-15. 2019.

LIN, Y., WANG, Y., IQBAL, A., SHI, P., LI, J., YANG, Y., LEI, X. Optimization of culture medium and temperature for the *in vitro* germination of oil palm pollen. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 220, p. 134–138. 2017.

Liu, L., Huang, L., Li, Y. Influence of boric acid and sucrose on the germination and growth of areca pollen. **American Journal of Plant Sciences**, Madison, v. 4, p. 1669-1674, 2013.

MELO, N.J.A., NEGREIROS, A.M.P., MEDEIROS, H.L.S., SALES JÚNIOR, R. Evaluation of Fusarium wilt disease in passion fruit species inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *passiflorae*. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 168, p. 81–87, 2020.

MUNHOZ, C.F., COSTA, Z.P., CAUZ-SANTOS, L.A., REÁTEGUI, A.C.E., RODDE, N., CAUET, S., DORNELAS, M.C., LEROY, P., VARANI, A.M., BERGÈS, H., VIEIRA, M.L.C. A gene-rich fraction analysis of the *Passiflora edulis* genome reveals highly conserved microsyntenic regions with two related Malpighiales species. **Scientific Reports**, Londres, v. 8, p. 1-18, 2018.

NOVARA, C., ASCARI, L., LA MORGIA, V., REALE, L., GENRE, A., SINISCALCO, C. Viability and germinability in long term storage of *Corylus avellana* pollen. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 214, p. 295–303, 2017.

OLIVEIRA, D.A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S.R.S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: sustainable recovery and biological activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 111, p. 55-62, 2016.

PADUREANU, S., PATRAS, A. Germination potential and pollen tube growth in *Galanthus nivalis* L. **Flora**, v. 264, p. 1-8, 2020.

Passiflora in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 29 mai, 2020.

PEREIRA, M.R., RIBEIRO, H., CUNHA, M., ABREU, I. Comparison of pollen quality in *Vitis vinifera* L. cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 227, p. 112–116, 2018.

PEREIRA, P.P.A., LIMA, L.K.S., SOARES, T.L., LARANJEIRA, F.F., JESUS, O.N., GIRARDI, E.A. Initial vegetative growth and survival analysis for the assessment of *Fusarium* wilt resistance in *Passiflora* spp. **Crop Protection**, Oxford, v.121, p. 195-203. 2019.

PÉREZ, V., HERRERO, M., HORMAZA, J.I. Pollen performance in mango (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae): Andromonoecy and effect of temperature. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 253, p. 439-446, 2019.

R Development Core Team, 2018. R: a Language and Environment for Statistical Computing, Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018. Accessed Dec 12, 2019.

RASBAND, W.S., 1997-2016. ImageJ, U S National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>.

REN, R., LI, Z., ZHANG, L., ZHOU, H., JIANG, X., LIU, Y. Enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems impact the viability of cryopreserved *Paeonia*

sufruticosa pollen. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.140, p.1-14. 2020.

SANTOS, E.A., VIANA, A.P., FREITAS, J. C. O., RODRIGUES, D.L., FERREIRA, R.T., PAIVA, C.L., SOUZA, M.M. Genotype selection by REML/BLUP methodology in a segregating population from an interspecific *Passiflora* spp crossing. **Euphytica**, Wageningen, v.204, p.1–11, 2015.

SANTOS, V.O.D., VIANA, A.P., PREISIGKE, S.D. C., SANTOS, E.A. Characterization of a segregating population of passion fruit with resistance to *Cowpea aphid borne mosaic virus* through morpho-agronomic descriptors. **Genetics and Molecular Research**, Londres, v.18, p.1-13, 2019.

SCORZA, L.C.T., DORNELAS, M.C. Rapid touch-stimulated movement in the androgynophore of *Passiflora* flowers (subgen. Decaloba; Sect. Xerogona). An adaptation to enhance cross-pollination? **Plant Signal Behav**, Amsterdam, v.9, p.1-6, 2014.

SCORZA, R., SHERMAN, W.B., PEACHES. In: Janik, J., Moore, J.N. (Eds.), **Fruit Breeding**. John & Sons, New York, p. 325–440, 1995.

SILVA, D.M., ZAMBON, C.R., TECHIO, V.H., PIO, R. Floral characterization and pollen germination protocol for *Castanea crenata* Siebold & Zucc. **Journal of the Botanical Research**, v. 130, p.389–395, 2020.

SILVA, L.F.O., ZAMBON, C.R., PIO, R., OLIVEIRA, A.F.D., GONCALVES, E.D. Establishment of rowth medium and quantification of pollen grains of olive cultivars in Brazil's subtropical areas. **Bragantia**, Campinas, v.75, p.26 –32, 2016.

SOARES, T.L, JESUS, O.N., SANTOS-SEREJO, J.A., OLIVEIRA, E.J. *In vitro* pollen germination and pollen viability in passion fruit (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n.3, p. 1116-1126, 2013.

SOARES, T.L, JESUS, O.N., SOUZA, E.H., OLIVEIRA, E.J. Reproductive biology and pollen-pistil interactions in *Passiflora* species with ornamental potential. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 197, p. 339-349, 2015.

SOARES, T.L., JESUS, O.N., SOUZA, E.H., OLIVEIRA, E.J. Floral development stage and its implications for the reproductive success of *Passiflora*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 238, p. 333–342. 2018.

SOARES, T.L., SILVA, S.O., COSTA, M.A.P.C., SANTOS-SEREJO, J.A., SOUZA, A.S., LINO, L.S.M., SOUZA, E.H., JESUS, O.N. *In vitro* germination and viability of pollen grains of banana diploids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 111-118, 2008.

SOUZA, F.V.D., SOUZA, E.H., KAYA, E., VIEIRA, L.J., SILVA, R.L. Cryopreservation of pineapple shoot tips by the droplet vitrification technique. **Methods in Molecular Biology**. New York, v.1815, p. 269–277. 2018.

SOUZA, E.H., SOUZA, F.V.D., ROSSI, M.L., PACKER, R.M., CRUZ-BARROS, M.A., MARTINELLI, A.P. Pollen morphology and viability in Bromeliaceae. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.89, n.4, p. 3067-3082. 2017.

TELLO, J., MONTEMAYOR, M.I., FORNECK, A., IBÁÑEZ, J. A new image-based tool for the high throughput phenotyping of pollen viability: evaluation of inter- and intra-cultivar diversity in grapevine. **Plant Methods**, Heidelberg, v. 14, 1-17, 2018.

THU, M.K., LIN, Y., CHEN, J., CHENG, C., MUNIR, N., XU, X., LAI, Z. FLOWER TYPES, Pollen Morphology, and *in vitro* pollen germination of longan (*Dimocarpus longan* Lour.). **Journal of the Botanical Research**, Texas, v. 1, n.1, p. 50-56, 2017.

WANI, M. S., HAMID, M., TANTRAY, Y. R., GUPTA, R. C., MUNSHI, A. H., SINGH, V. *In vitro* pollen germination of *Betula utilis*, a typical tree line species in Himalayas. **Journal of the Botanical Research**, Texas, v. 131, p. 214–221. 2020

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho apresentou resultados promissores quanto a conservação e quebra de dormência das sementes de *Passiflora* spp. recém-colhidas ou armazenadas por um ano, uma vez que as sementes conservadas obtiveram taxa de germinação alta após o uso dos reguladores vegetais GA4+7 + BA.

O gênero *Passiflora* L. possui ampla diversidade desde os aspectos externos das sementes, flores, ou grãos de pólen, quanto nos seus aspectos fisiológicos como germinação de sementes, germinação de grão de pólen, emissão e comprimento de tubo polínico.

A suplementação de sacarose ao meio de cultura para otimização de germinação polínica é fundamental para as espécies de *Passiflora*.

Os resultados obtidos nesse trabalho podem ser aplicados a outras espécies do BAG de *Passiflora* com o intuito de fornecer informações quanto a germinação, conservação e quebra de dormência de sementes, germinação *in vitro* de grão de pólen e viabilidade polínica, a fim de selecionar parentais masculinos para os programas de melhoramento genético, bem como, subsidiar estudos de conservação de pólen dessas espécies.