

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL

POLIANA RANGEL COSTA

MORFOMETRIA, GERMINAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* E ADEQUAÇÃO METODOLÓGICA DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Passiflora foetida* var. *glaziovii* KILLIP (PASSIFLORACEAE)

São Mateus, ES

Fevereiro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL

MORFOMETRIA, GERMINAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* E ADEQUAÇÃO METODOLÓGICA DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Passiflora foetida* var. *glaziovii* KILLIP (PASSIFLORACEAE)

POLIANA RANGEL COSTA

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre

São Mateus, ES
Fevereiro de 2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Costa, Poliana Rangel, 1987-

C837m Morfometria, germinação *in vitro* e *ex vitro* e adequação metodológica do teste de tetrazólio em sementes de *Passiflora foetida* var. *glaziovii* Killip (Passifloraceae) / Poliana Rangel Costa. – 2013.

56 f. : il.

Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre.

Coorientadores: José Carlos Lopes, Edilson Romais Schimildt, Anderson Geyson Alves de Araújo.

Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo.

1. Maracujá - Propagação *in vitro*. 2. Tecidos (Anatomia e fisiologia) - Cultura e meios de cultura. 3. Heterose. I. Alexandre, Rodrigo Sobreira. II. Lopes, José Carlos. III. Schimildt, Edilson Romais. IV. Araújo, Anderson Geyson Alves. V. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. VI. Título.

CDU: 63

MORFOMETRIA, GERMINAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* E ADEQUAÇÃO METODOLÓGICA DO TESTE DE TETRAZÓLIO EM SEMENTES DE *Passiflora foetida* var. *glaziovii* KILLIP (PASSIFLORACEAE)

POLIANA RANGEL COSTA

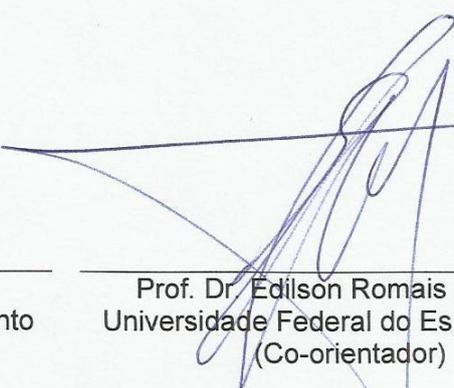
Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Aprovada: 25 de fevereiro de 2013

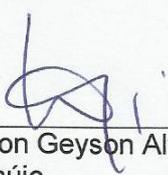
Aprovada: 25/02/2013.



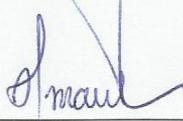
Prof. Dr. José Carlos Lopes
Universidade Federal do Espírito Santo
(Co-orientador)



Prof. Dr. Edison Romais Schimdt
Universidade Federal do Espírito Santo
(Co-orientador)



Prof. Dr. Anderson Geysen Alves
Araújo
Universidade Federal do Espírito Santo
(Co-orientador)



Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientador)

A todos os que compartilharam do meu sonho, possibilitando torná-lo realidade, em especial a minha família por todo apoio e carinho.

Dedico.

Aos que todos os dias me
apresentam o caminho da sabedoria.

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar todos os dias com o dom da vida e por colocar pessoas tão especiais em meu caminho, permitindo desta forma que eu realize meus sonhos e objetivos.

Aos meus pais, Ângela e Jeremias, por todo o apoio, carinho e cuidado durante toda minha vida, e especialmente nesta jornada.

Ao meu irmão Vinicius por ser meu eterno companheiro me ajudando sempre quando mais preciso.

Ao meu esposo Antonio Claudio, por apoiar e vivenciar os meus sonhos, além de auxiliar nos experimentos.

Aos meus amigos de toda vida Jamile, Robson, Kristhiano, Clemilton, Fernanda e Lívia que estiveram ao meu lado me apoiando nas alegrias e dificuldades.

Ao meu orientador Rodrigo Sobreira Alexandre, pela amizade, atenção, cuidado, dedicação, paciência mesmo nos momentos mais difíceis e principalmente por ser um exemplo de profissional no qual eu me espelho.

Aos meus co-orientadores Anderson, Edilson e José Carlos pela dedicação e valiosas sugestões.

Ao professor Antelmo por todo apoio, orientação e colaboração.

Ao professor Luis Fernando Duboc por disponibilizar o seu laboratório para as avaliações referentes ao teste de tetrazólio.

À equipe do laboratório de Ecologia de Vertebrados Aquáticos: Leonardo, Natane, Oliveira, Priscila, Maria Cecilia e Ingride pela amizade e auxílio nas avaliações do teste de tetrazólio.

A CAPES pela concessão da bolsa.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical.

Às sempre prestativas e atenciosas secretárias do PPGAT, Bernadeth e Josiane.

Aos meus grandes amigos Altino e Sheila por me apresentarem o mundo científico e estarem sempre presentes torcendo por mim.

A João Victor e Pedro por todo apoio que tornou possível a realização dos testes de condutividade elétrica.

A Yasmim e Michel pelo auxílio na confecção da exsicata.

Ao professor Luis Fernando Tavares de Menezes e sua equipe por estarem sempre dispostos a me ajudar.

As minhas primas Jaqueline e Emanuela por todo apoio e alegria que me proporcionam.

Aos meus tios Antonio, Etelina, João e Rita por todo apoio e cuidado.

A Evelton e Cristiane por todo companheirismo.

Aos meus amigos Erivelton, Andressa, Jailton e Bruna por todos os momentos maravilhosos.

As minhas amigas Mônica, Lenize, Mayara, Josiane e Paula por tudo que já vivemos e ainda viveremos.

BIOGRAFIA

Poliana Rangel Costa, nascida no município de Linhares, estado do Espírito Santo, no dia 28 de julho de 1987, primeira filha de Jeremias Nunes da Costa e Ângela Maria Rangel Costa, irmã de Vinicius Rangel Costa e casada há três anos com Antonio Claudio Santos. Desenvolveu os estudos fundamentais na Escola Municipal de Ensino Fundamental “Professor João Pinto Bandeira” e concluiu o ensino médio na Escola Estadual de Ensino Médio “Ceciliano Abel de Almeida”. Aos 18 anos ingressou no curso de “Ciências Biológicas”, na antiga Faculdade Unilinhares, na cidade de Linhares, como bolsista integral do PROUNI. Durante a graduação fez parte da equipe do INCAPER, localizado na Fazenda Experimental de Linhares, atuando como bolsista da FAPES no Laboratório de Sementes coordenado pela Dr^a. Sheila Cristina Prucoli Posse. Posteriormente passou a integrar a equipe do laboratório de Ecofisiologia e Pós-colheita coordenado pelo Ms. José Altino Machado Filho como bolsista do Consórcio Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. Obteve o título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Faculdade Pitágoras, em 18 de dezembro de 2010, mesmo dia em que obteve a notícia de ter sido aprovada no Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical do CEUNES, sendo a partir do ano de 2011, aluna de mestrado orientada pelo Professor Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre, atuando assim na área de propagação de plantas. Aos 25 dias do mês de fevereiro de 2013, defendeu sua Dissertação, obtendo o título de Mestre em Agricultura Tropical.

“Não me envergonho de mudar de ideia. Porque não me envergonho de pensar.”

(Pascal).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Gênero <i>Passiflora</i>	5
2.2. Utilidade medicinal das Passifloras	6
2.3. Propagação dos maracujazeiros	8
2.4. Germinação e dormência das sementes	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Caracterização morfológica de <i>P. foetida</i> var. <i>glaziovii</i> Killip	13
3.2. Avaliações do potencial fisiológico de sementes de <i>P. foetida</i> var. <i>glaziovii</i> Killip.....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1. Identificação e caracterização morfológica	17
4.2. Avaliações fisiológicas e bioquímica.....	19
5. CONCLUSÃO.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Resumo da análise de variância para o teste de germinação *in vitro* em *P. foetida* var. *glaziovii* Killip em relação à qualidade de luz e temperatura (Temp.) para as variáveis plântulas normais aos 14 dias após montagem do teste, plântulas normais, plântulas anormais e comprimento de hipocótilo aos 30 dias após montagem do teste de germinação.....22
- TABELA 2. Porcentagem de plântulas normais e anormais e comprimento de hipocótilo (cm) de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip quando submetidas a diferentes temperaturas.....23
- TABELA 3. Porcentagem de plântulas normais e anormais e comprimento de hipocótilo (cm) de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip quando submetidas diferentes qualidades de luz.....24
- TABELA 5. Comparações entre frequências do número (Nº) e porcentagens (%) de embriões viáveis e inviáveis obtidas no teste de tetrazólio com as do teste de germinação *in vitro*.28
- TABELA 6. Comparação do número (Nº) e porcentagem (%) de embriões avaliados pelo teste de tetrazólio que podem dar origem a plântulas normais e anormais com as plântulas obtidas no teste de germinação *in vitro*.30

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Caracterização morfológica de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip: face adaxial da folha (A); tricomas tectores localizados na face adaxial da folha (B); face abaxial da folha (C); tricomas tectores localizados na face abaxial da folha (D); tricoma glandular (E); flor (F); fruto verde com presença de brácteas (G); fruto maduro aberto demonstrando sementes cobertas por arilo (H); sementes intacta e semente após retirada parcial do tegumento demonstrando o endosperma (I). 18
- FIGURA 2. Curva de embebição de sementes de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip.20
- FIGURA 3. Germinação de sementes de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip: sobre papel (A); em rolo de papel (B). Pré-teste de germinação *in vitro* (C): 1. sementes sem tegumento e 2. sementes com tegumento.21
- FIGURA 4. Frascos contendo plântulas de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip após 30 dias de condicionamento em ambientes com qualidades de luz: branca (A); vermelho (B); vermelho extremo (C) e ausência (D).24

RESUMO

RANGEL COSTA, POLIANA; M. Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Fevereiro de 2013; **Morfometria, germinação *in vitro* e *ex vitro* e adequação metodológica do teste de tetrazólio em sementes de *Passiflora foetida* var. *glaziovii* Killip (Passifloraceae)**; Orientador: Rodrigo Sobreira Alexandre; Co-orientadores: Edilson Romais Schmildt, Anderson Geyson Alves Araújo; José Carlos Lopes.

A espécie *Passiflora foetida* L. apresenta ampla utilidade medicinal e ornamental, porém informações referentes aos seus táxons infraespecíficos e ao potencial fisiológico de suas sementes ainda são escassas. Os testes de tetrazólio e germinação são importantes componentes para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes, possibilitando avaliação do vigor e deterioração. Através da aplicação destas metodologias é possível alcançar os níveis máximos de germinação com a obtenção de plântulas de qualidade. Desta forma, objetivou-se caracterizar a *P. foetida* var. *glaziovii* Killip, avaliar o seu comportamento germinativo *ex vitro* e *in vitro* e adequar a metodologia do teste de tetrazólio. A caracterização e identificação botânica foram realizadas a partir da observação de caracteres relevantes conforme chave de identificação. A germinação *ex vitro* foi realizada em rolo e sobre papel Germitest nas temperaturas de 25 e 20-30 °C. Posteriormente sementes totalmente desprovidas de tegumento foram utilizadas nos testes de germinação *in vitro* e de tetrazólio. Para a germinação *in vitro* utilizou-se o meio MS sendo as sementes acondicionadas as diferentes qualidades de luz (branca, vermelho, vermelho extremo e ausência) e duas temperaturas (25 e 20-30 °C). No teste de tetrazólio as sementes foram submergidas, em soluções de tetrazólio em concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10 g L⁻¹ nas temperaturas de 30, 35, 40 e 45 °C por duas horas na ausência de luz. A *P. foetida* var. *glaziovii* Killip é uma espécie silvestres, caracterizada como trepadeira herbácea que apresenta tricomas glandulares em

suas folhas, brácteas e estipulas. Esta planta apresenta sementes pequenas de aproximadamente 4,87 mm de comprimento e 2,15 mm de largura, não-fotoblásticas, sendo que a germinação deve ser realizada *in vitro* na temperatura alternada de 20-30 °C. Na avaliação de vigor através do teste de tetrazólio a combinação da concentração de 10 g L⁻¹ e temperatura de 30 °C é a indicada para esta espécie.

Palavras-chave: maracujá, silvestre, propagação, vigor, cultura de tecidos.

ABSTRACT

RANGEL COSTA, POLIANA; M. Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; February 2013; **Morphology, germination *in vitro* and *ex vitro* and methodological adequacy of the tetrazolium test in seeds of *Passiflora foetida* var. *glaziovii* Killip (Passifloraceae).** Advisor: Rodrigo Sobreira Alexandre; Co-supervisor: Edilson Romais Schmidt, Anderson Geyson Alves Araújo; José Carlos Lopes.

The species *Passiflora foetida* L. has wide medical utility and ornamental, but information concerning their infraspecific taxon and the physiological potential of its seeds are still scarce. Tetrazolium tests and germination are important components for the evaluation of the physiological quality of seeds, enabling the evaluation force and deterioration. Through the application of these methodologies is possible to achieve the maximum levels of germination with getting quality seedlings. In this way, aimed to characterize *P. foetida* var. *glaziovii* Killip, evaluate their behavior *in vitro* and *ex vitro* germinal and tailor the tetrazolium test methodology. The botanical identification and characterization were performed from the observation of relevant characters as identification key. The *ex vitro* germination was held in roller and paper Germitest at temperatures of 25 and 20-30° C. Totally devoid of seed integument later were used in the *in vitro* germination tests and tetrazolium. For the *in vitro* germination medium was MS being the seeds put up the different qualities of light (white, red, red extreme and absence) and two temperatures (25 and 20-30° C). Tetrazolium test the seeds were submerged, tetrazolium solution at a concentration of 2.5; 5.0; 7.5 and 10 g L⁻¹ at temperatures of 30, 35, 40 and 45° C for two hours in the absence of light. *P. foetida* var. *glaziovii* Killip is a wild species, characterized as herbaceous vine with glandular trichomes on its leaves, bracts and estipulas. This plant has small seeds of approximately 4.87 mm long and 2.15 mm wide, non-photoblástico, and germination *in vitro* should be performed in alternating temperature

of 20-30° C. In the evaluation of force through the tetrazolium test the combination of concentration of 10 g L⁻¹ and temperature of 30° C is recommended for this species.

Key words: passion fruit, wild, propagation, force, tissue culture.

1. INTRODUÇÃO

A família Passifloraceae é composta por 27 gêneros e 935 espécies, sendo trepadeiras herbáceas, arbustos e até árvores lenhosas (APGIII, 2009). No Brasil ocorrem quatro gêneros, *Mitostemma* Mast., *Dilkea* Mast., *Ancisthrothyrus* Harms e *Passiflora* L., com 147 espécies, na sua maioria subordinada ao gênero *Passiflora* (BERNACCI et al., 2013).

Conhecida vulgarmente como canapú-fedorento, maracujá-de-estalo ou maracujá do mato, a *Passiflora foetida* L. é uma trepadeira herbácea autocompatível (FARIA & STEHMANN, 2010). Esta é possivelmente a espécie mais variável do gênero *Passiflora* com 38 táxons infraespecíficos revisados e aceitos por Killip em 1938 (GARCÍA & HOC, 1998; ARARÚJO & ALVES, 2007; CARVALHO et al., 2011).

Atualmente estes táxons estão sendo revisados não havendo, portanto, precisão em relação ao seu total. Conforme The Plant List (2010) são aceitos oito táxons infraespecíficos de *P. foetida*, porém, essa quantidade não está em conformidade com os dados apresentados em Tropicos.org (2013), no qual há aceitação da *P. foetida* var. *glaziovii* Killip, assim como observado no IPNI (2013).

A *P. foetida* é a única espécie do gênero que apresenta glândulas de resina, que são tricomas secretores presentes principalmente nas flores, frutos, brácteas e estípulas. Esta resina apresentou elevada atividade de proteases e fosfatases ácidas e recebeu a devida atenção devido à presença de passifloricinas, inseticida do tipo alfa-pironas e outras substâncias capazes de inibir a atividade de metaloproteases envolvidas na invasão tumoral, metástase e angiogênese (ROSA & DORNELAS, 2012).

Esta espécie apresenta grande valor ornamental, medicinal e etnobotânico sendo utilizada em tratamentos como asma, icterícia, erisipela, doenças de pele com

inflamação, biliousnes, tonturas, dor de cabeça, emenagogo, insônia, histeria, ansiedade nervosa e apresentando atividades antiproliferativa, antibactericida, sedativa e antiespasmódica (MOHANASUNDARI et al., 2007; NATARAJAN et al., 2011; RASOOL et al., 2011; SATHISH et al., 2011).

Poucos são os trabalhos referentes à *P. foetida*, sendo, portanto escassas as informações referentes ao seu potencial fisiológico. Entretanto, para a obtenção de plantas com padrões de qualidade desejados é essencial compreender os métodos viáveis para sua propagação (PIRES et al., 2012).

Para que a germinação das sementes seja eficiente é necessário o conhecimento dos padrões ótimos para a espécie, e os principais fatores do ambiente que controlam a germinação são a umidade do solo, a luz e a temperatura (BASKIN & BASKIN, 1988), Os testes de germinação e de tetrazólio (TZ) são alguns dos principais métodos para avaliação do potencial fisiológico de sementes.

A germinação das sementes tem início com a embebição de água e desencadeia uma seqüência de mudanças metabólicas, que culminam com a emergência de raiz primária, quando se refere a sementes viáveis não-dormentes (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

A luz é um fator de grande importância na germinação de sementes e desenvolvimento das mudas, podendo afetar a germinação de forma positiva, negativa ou indiferente (BALAGUERA et al., 2010).

A temperatura também influencia diretamente a germinação, pois afeta a absorção de água e as reações bioquímicas que regulam o metabolismo envolvido nesse processo, sendo que cada espécie possui uma faixa característica de temperatura dentro da qual suas sementes podem germinar (ZUCARELI et al., 2009).

Apesar do teste de germinação ser o método mais utilizado para avaliação do vigor de sementes, o teste de tetrazólio (TZ) vem ganhando destaque devido às vantagens de sua utilização podendo ser citados: a redução considerável do período de avaliação do potencial germinativo, sendo especialmente útil quando as sementes que têm de ser semeadas imediatamente após a colheita (BRASIL 2009; HOSOMI et al. 2011; SANTOS et al. 2012); o fato de não ser afetado por fungos; o baixo custo e possibilidade de estimativa de vigor; possibilidade de avaliação da viabilidade de sementes que apresentam dormência ou germinação lenta (ISTA 2004, RIBEIRO et al. 2010, GRZYBOWSKI et al. 2012) e solucionar problemas

detectados em teste de germinação, em que as razões para as anormalidades de plântulas não sejam claras, de acordo com a International Seed Testing Association (ISTA 2004).

O teste topográfico de tetrazólio (TZ) é um teste bioquímico que pode ser utilizado para determinar rapidamente a viabilidade de sementes, que é analisada pela coloração dos tecidos vivos em presença de uma solução de sal tetrazólio (2,3,5 trifenil cloreto de tetrazólio) (BRASIL, 2009; DELOUCHE, 1976; ISTA, 2004).

O teste baseia-se na submersão das sementes em uma solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, que se difunde pelos tecidos vivos, onde ocorre a sua redução por ação das enzimas desidrogenases, principalmente a desidrogenase do ácido málico. Desta forma, íons de hidrogênio são transferidos para o sal de tetrazólio resultando na formação de um composto estável não difusível de coloração avermelhada denominado trifenilformazan, indicando assim a presença de atividade respiratória nas mitocôndrias (BARROS et al., 2005). Entretanto, tecidos deteriorados ou danificados desenvolvem coloração vermelha intensa, enquanto os vigorosos desenvolvem coloração suave e os tecidos mortos não desenvolvem coloração, mantendo a cor natural (DELOUCHE, 1976).

A eficácia do TZ depende de metodologias apropriadas a cada espécie, determinando: as formas de pré-condicionamento, o preparo das sementes antes de serem submetidas à coloração, a concentração da solução de tetrazólio, o tempo e temperatura de condicionamento. Estas padronizações são importantes, pois influenciam diretamente a intensidade e a uniformidade de coloração das sementes, ou seja, interferem na avaliação e na interpretação dos resultados (GASPAR-OLIVEIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2010).

A determinação destes parâmetros geralmente ocorre a partir de estudos que comparam os resultados obtidos no teste de tetrazólio com outros testes que avaliam a qualidade das sementes, como a germinação e a emergência de plântulas (GASPAR-OLIVEIRA et al., 2009).

Outra ferramenta de grande aplicabilidade no TZ é a utilização de imagens digitalizadas, no qual é possível o seu armazenamento, ampliação e posterior avaliação de forma mais detalhada da coloração apresentada pelos tecidos, reduzindo-se desta forma os erros (CUSTÓDIO et al., 2012).

Diante das informações apresentadas, objetivou-se caracterizar a *P. foetida* var. *glaziovii* Killip e definir as condições ideais de aplicação dos testes de germinação e de tetrazólio em suas sementes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Passiflora*

Embora espécies da família Passifloraceae ocorram no Velho Mundo (África e Ásia), apenas com a descoberta da América a ciência veio a ter contato com o grupo. A primeira menção a representantes da família Passifloraceae faz referência a frutos comestíveis denominados granadillas, em referência à romã (*Punica granatum* L.) (KUGLER & KING, 2004).

Entretanto, existiam, também, nomes de origem indígena, como maracujá, derivado de múrucuya de origem tupi que significa “fruto que se serve” ou “alimento na cuia” e mburucuya de origem guarani (KUGLER & KING, 2004; MELLETI, 2000).

Outra denominação atribuída ao maracujá é “flor da paixão”, devido ao arranjo numérico e anatômico de suas flores e os elementos da crucificação de Cristo. Assim, seriam os cinco estames representativos das cinco chagas, os três pistilos para os três pregos e as cores branca e púrpura, representando a pureza e a divindade (SILVA & SILVA-ALMEIDA, 2000).

No Brasil o gênero *Passiflora* L. é o maior e o mais importante economicamente. As espécies mais conhecidas do gênero *Passiflora* são as cultivadas comercialmente, podendo ser citadas a *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Degener (maracujazeiro amarelo) e *P. edulis* Sims. (maracujazeiro roxo), que são utilizadas principalmente na indústria para obtenção de suco concentrado e *P. alata* Curtis (maracujazeiro doce), cujos frutos são consumidos na forma de ‘fruta

fresca' e as folhas são utilizadas na indústria farmacêutica e de cosméticos (VASCONCELLOS & DUARTE FILHO, 2000; BRIGNANI, 2002).

2.2. Utilidade medicinal das Passifloras

O emprego de plantas medicinais para a manutenção e a recuperação da saúde tem ocorrido ao longo dos tempos desde as formas mais simples pelo tratamento local até as formas mais sofisticadas com a fabricação industrial de medicamentos (GIRALDI & HANAZAK, 2010).

As plantas medicinais muitas vezes caracterizam o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos, o que explica o fato de serem amplamente cultivadas em quintais residenciais ou comercializadas em feiras livres e mercados populares (MACIEL et al., 2002).

A seleção de plantas com possível poder farmacológico depende de diversos fatores que incluem o conteúdo químico, toxicidade e uso tradicional pela população em diferentes culturas, que é conhecido como etnobotânica (RATES, 2001).

A Etnobotânica aborda a forma como as pessoas incorporam as plantas em suas práticas e tradições culturais (GIRALDI & HANAZAK, 2010). Ao investigar a utilização dos fitoterápicos pela população brasileira alguns autores evidenciaram que as espécies do gênero *Passiflora* estão entre os mais utilizados (RIBEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2006; MARLIÉRE et al., 2008). Sendo que os medicamentos fitoterápicos à base de maracujá devem ser elaborados a partir das espécies *P. alata* e *P. incarnata* (ZERAİK et al, 2010).

A utilidade medicinal do maracujá foi descoberta em 1867, quando passiflorina havia despertado grande interesse na medicina. Porém, antes mesmo da descoberta das Américas nativos desta região já faziam uso das propriedades terapêuticas do maracujá (CERQUEIRA-SILVA et al.2010).

Espécies do gênero *Passiflora* são empregadas frequentemente na medicina popular, principalmente devido às suas propriedades sedativas e

ansiolíticas, sendo *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata* as mais utilizadas para este fim (MENDEZ et al., 2011)

No Brasil, a *Passiflora alata* Curtis está presente em preparações farmacêuticas como infusões e comprimidos sozinha ou em associação com *P. edulis* e *P. incarnata* (MENDEZ et al., 2011).

A *P. foetida* L. é utilizada por inteira no uso terapêutico medicinal, seja na forma fresca ou seca (RASOOL et al., 2011). A decocção ou emplastros de diversas partes da planta são utilizados no combate a asma, insônia, emenagogo, biliousnes, histeria, inflamação de pele, ansiedade nervosa, dor de cabeça e erisipelas (MOHANASUNDARI et al., 2007; NATARAJAN et al., 2011; RASOOL et al., 2011; SATHISH et al., 2011; CHIVAPAT et al., 2011).

Os principais constituintes fitoquímicos desta planta contém alcalóides, flavonóides, fenóis, compostos glicosídeos cianogênicos, passiflorinas, policetídeos e alfa-pironas (MOHANASUNDARI et al., 2007). Os flavonóides encontrados nas folhas de *P. foetida* apresentam diversos benefícios biológicos. A vitexina apresenta-se como um potente hipotensor, além de demonstrar propriedades anti-inflamatórias e anti-espamódicas. Já o campferol, a apigenina e a luteolina demonstraram possuir efeitos antialérgicos devido à inibição da liberação de histamina (CHIVAPAT et al., 2011).

O extrato bruto e etanólico das folhas de *P. foetida* L. apresentam atividade antiproliferativa em adenocarcinoma de mama humano na gama potencial de IC50. Mohanasundari et al. (2007), observaram que o extrato etanólico das folhas apresenta notável atividade antibacteriana contra *Ps. Putida*, *V. cholerae*, *S. flexneri* e *S. pyogenes*.

O extracto etanólico bruto preparado a partir de calos obtidos *in vitro* de folhas de *P. foetida* L. mostrou exercer efeito protetor promissor contra a hepatoxina CCl₄ em ratos com lesões hepáticas induzidas. Após 14 dias de alimentação oral de extrato etanólico (200 e 500 mg kg⁻¹ b.wt) os animais apresentaram redução significativa de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo anteriormente estes níveis elevados pela presença da CCl₄ (RASOOL et al., 2011). O mesmo efeito hepatoprotetor contra CCl₄ em ratos albinos foi demonstrado por Anandan et al. (2009), porém os referentes autores obtiveram o extrato etanólico de frutos de *P.*

foetida. Em ambos os relatos, o efeito hepatoprotetor foi atribuído à presença dos flavonóides.

2.3. Propagação dos maracujazeiros

A propagação do maracujazeiro pode ser feita de forma sexuada, por sementes ou assexuada, por estaquia, enxertia, alporquia e cultura de tecidos *in vitro* (WAGNER JUNIOR et al., 2006). No Brasil a propagação do maracujazeiro comercial é feita basicamente por meio de sementes, sendo as mudas produzidas em viveiros telados ou cobertos de palha, em sacos de polietileno ou tubetes, cerca de dois meses antes do início do plantio (DANTAS, 2006).

Há uma preferência pelo método assexuado devido à sua praticidade e antecipação das mudas. Além disto, mesmo quando a produção de mudas é realizada por estaquia ou enxertia, o seu início ocorre a partir da germinação de sementes para obtenção de matrizes (FERREIRA, 2000).

A grande questão da produção de mudas de maracujazeiros comerciais a partir de sementes é a elevada heterozigose, que determina alta variabilidade genética, ocasionando, portanto, elevada desuniformidade entre plantas nos pomares. Uma alternativa para solucionar esta questão é a propagação vegetativa, que apresenta como vantagem a manutenção de material com boas características agrônômicas, favorecendo a multiplicação de plantas produtivas e tolerantes a pragas e a doenças (LIMA et al., 1999).

2.4. Germinação e dormência das sementes

O conhecimento sobre os aspectos da germinação de sementes das diversas espécies de *Passiflora* é fundamental para a propagação e para a manutenção de bancos de germoplasma, visando assim evitar a erosão genética (PASSOS et al., 2004).

A germinação ocorre em uma sequência ordenada de eventos iniciados pela absorção de água, a qual desencadeia divisões celulares, síntese de enzimas e mobilização de reservas, aumento da taxa respiratória, de assimilação e diferenciação celular (KRAMER & KOZLOWSKI, 1972).

A água tem papel fundamental na compreensão da biologia da semente, particularmente nos processos de desenvolvimento e germinação. De acordo com Carvalho & Nakagawa (2000), por meio do fornecimento da água ocorre a reidratação dos tecidos e conseqüentemente a intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, culminando com o fornecimento de energia e nutrientes necessários para o crescimento do eixo embrionário.

O processo de absorção de água pela semente segue um padrão trifásico. Na fase I ocorre a embebição, com ativação da semente por consequência do início da entrada de água, já na fase II a absorção torna-se constante, sendo poucos os aumentos no teor de água evidenciados e por fim a fase III, na qual se observa a elevação na quantidade de água absorvida com o tempo (BEWLEY & BLACK, 1994; MARCOS FILHO, 2005).

A duração das fases de germinação depende de fatores relacionados à semente, como a permeabilidade do tegumento, a composição química e o tamanho, além das condições durante a embebição, como temperatura, composição do substrato e presença de reguladores vegetais (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

A resposta da germinação à luz pode variar conforme a espécie, sendo as sementes classificadas em três categorias, de acordo com a sua sensibilidade à luz branca, chamadas de fotoblastismo. A primeira categoria é denominada fotoblásticas positivas, em que as sementes germinam apenas sob luz branca, a segunda categoria refere-se às fotoblásticas negativas, quando as sementes necessitam da ausência de luz (escuro), e a terceira categoria, quando a luz não interfere no processo germinativo, as sementes são insensíveis à luz, denominadas não-fotoblásticas ou indiferentes (MAYER & POLJAKOFF MAYBER, 1989).

O fitocromo é o pigmento responsável pela fotorreação, controlando a germinação, sendo este uma cromoproteína sintetizada nos plastídios (KRETSCH et al., 2000). O fitocromo está presente no citoplasma do eixo embrionário e sua porção protéica é a responsável pela captação de sinais luminosos do ambiente

(KRETSCH et al., 2000; MARCOS FILHO, 2005), podendo ser apresentado na forma inativa (Fv), convertendo-se à forma ativa (Fve) ao absorver luz vermelha (660 nm). Porém, ao ser expostos a luz vermelho extrema (730 nm) ou permanecendo no escuro o fitocromo novamente assume a forma inativa (MARCOS FILHO, 2005).

Na forma ativa, o fitocromo atinge concentrações suficientes para disparar o processo de germinação, mediante a síntese de hormônios e o reinício da transcrição da mensagem genética (MARCOS FILHO, 2005). Conforme descrito por Taiz & Zeiger (2009) a luz vermelha realiza a ativação do fitocromo, havendo assim aumento da expressão do gene que codifica uma enzima chave na rota biossintética da giberelina, sugerindo que o fitocromo promove a germinação de sementes pelo aumento da biossíntese do hormônio, uma vez que a giberelina pode substituir a luz vermelha na promoção da germinação.

A temperatura é outro fator de importância para a germinação, pois influencia a velocidade de absorção de água total, a velocidade e a uniformidade da germinação e, portanto afeta as reações bioquímicas que determinam todo o processo germinativo. Assim, a germinação só ocorrerá dentro de determinados limites de temperatura definidos (mínimo, ótimo e máximo), que caracterizam sua distribuição geográfica, havendo, portanto espécies que respondem à temperatura constante e outras a temperatura alternada, sendo esta última, provavelmente, uma adaptação às flutuações naturais do ambiente (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000; RODRIGUES, 2010).

Existem sementes que mesmo viáveis não germinam, embora as condições de água, gases (O₂) e temperatura estejam aparentemente adequadas. Este bloqueio germinativo ocorre em virtude da estrutura ou composição química das sementes, sendo estas denominadas dormentes, o que torna necessário o uso de tratamentos especiais para assim possibilitar a germinação (MARCOS FILHO, 2005).

A dormência é uma forma natural de distribuir a germinação no tempo e no espaço, além de permitir que a semente inicie a germinação quando as condições ambientais vierem a favorecer a sobrevivência das plântulas (PEREZ, 2004). A dormência pode se apresentar de forma física (impermeabilidade do tegumento à água e gases), química (presença de fatores inibidores), mecânica (resistência do tegumento ao crescimento do embrião), morfológica (imaturidade do embrião) ou

fisiológica (mecanismos fisiológicos de inibição da germinação) (FOWLER & BIANCHETTI, 2000).

Os problemas de germinação são comuns no gênero *Passiflora* até mesmo com maracujá-amarelo, que é a espécie mais estudada (MELETTI et al., 2002). Para superar este problema, alguns trabalhos têm sido conduzidos com diferentes espécies e métodos para superar a dormência.

Segundo Morley-Bunker (1980), as passifloras estão incluídas no grupo de plantas cujas sementes apresentam dormência causada por mecanismos de controle da entrada de água para o interior da semente. No entanto, Ferreira (1998) ao determinar a curva de embebição em sementes de *Passiflora alata* Dryander, *P. edulis* Sims.f. *flavicarpa* Deg. e *P. giberti* N. E. Brown observou que estas espécies apresentavam permeabilidade à água constatando que a dormência deve estar relacionada a outros fatores fisiológicos da semente como, por exemplo, a presença de substâncias químicas que impedem a germinação.

Substâncias reguladoras de crescimento presentes no arilo que envolve as sementes agem de forma negativa na germinação das sementes de maracujá, pois contribuem para uma germinação desuniforme, desta forma o arilo deve ser adequadamente retirado visando, além da obtenção da máxima germinação, a emergência rápida das plântulas (PEREIRA & DIAS, 2000). Lopes et al. (2007) afirmam que a remoção completa do arilo das sementes favorece a porcentagem de germinação e reduz o número de sementes duras.

A necessidade do estudo dos efeitos de reguladores vegetais na germinação de sementes e no processo de formação de mudas de *Passifloras* é salientada por diversos autores, como Lima et al. (2009) e Zucareli et al. (2009). Tais reguladores estão envolvidos nos processos de crescimento e desenvolvimento de um órgão ou tecido vegetal, que, pode ser alterado de acordo com as condições fisiológicas da planta, podendo atuar como promotor ou inibidor no controle do processo germinativo de sementes (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os fitorreguladores também vêm sendo utilizados para a redução da dormência em sementes de *Passifloras*. Os hormônios como giberelinas, citocininas e etileno são promotores da germinação, enquanto outros, como o ácido abscísico, são indutores de dormência (TAIZ & ZEIGER, 2009). Em sementes de *Passiflora nitida* kunth, a aplicação do ácido giberélico a 1000 mg L⁻¹, associada ou não à luz, favoreceu a germinação (PASSOS et al., 2004). Em sementes *P. cincinnata* Mast. a

utilização de GA₄₊₇ + N-(fenilmetil)-aminopurina promoveu aumento significativo no processo de emergência e no desenvolvimento inicial (ZUCARELI et al., 2009).

A técnica de cultura *in vitro* também tem se mostrado eficiente para a germinação de sementes de *Passifloras*, porém para a realização deste procedimento Alexandre et al. (2009) sugerem a remoção total do tegumento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Caracterização morfológica de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip

Material vegetal de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip provenientes da área da fazenda experimental do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), foram coletados, propagados vegetativamente por estaquia e posteriormente cultivados em vasos alocados em casa de vegetação. A identificação taxonômica e caracterização morfológica foram realizadas de acordo com Killip (1938), cujos caracteres mais relevantes foram analisados. A terminologia morfológica empregada segue o sugerido por Vidal e Vidal (2000).

3.2. Avaliações do potencial fisiológico de sementes de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip

Sementes obtidas de frutos maduros tiveram seus arilos removidos com a utilização de cal hidratada e fricção em peneira de malha plástica, seguida de lavagem em água corrente. Sendo posteriormente dispostas sobre papel absorvente por 72 horas, à temperatura ambiente (25 °C), para secagem. Decorrido este período foram avaliados:

Teor de água - Determinado pelo método da estufa a 105 ± 3 °C por 24 horas. Foram utilizadas quatro repetições com 50 sementes, pesadas em balança com precisão de 0,0001 g e os dados foram expressos em porcentagem (BRASIL, 2009).

Condutividade elétrica - Quatro repetições de 50 sementes foram pesadas com precisão de 0,0001 g, sendo posteriormente imersas em 75 mL de água destilada em copos de plástico (capacidade para 200 mL). As sementes foram mantidas em BOD a 25 °C, por 24 horas. Decorrido este período, foi determinada a condutividade elétrica da solução de embebição, por meio do condutivímetro modelo EC-1382 e os resultados, expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ (BARBOSA et al., 2012).

Dimensionamento das sementes - com auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,1mm, foram mensuradas as dimensões de comprimento, largura e espessura de 50 sementes. O comprimento foi medido da base ao ápice enquanto a largura e espessura foram medidas na região mediana das sementes, caracterizando-as conforme terminologia de Perez-Cortez (2002).

Curva de embebição - Conduzida à temperatura ambiente (25 °C), duas repetições de 50 sementes foram dispostas uniformemente sobre duas folhas de papel Germitest umedecidas com água destilada, na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco. As avaliações foram feitas a cada hora durante 12 horas, e posteriormente a cada 24 horas. A avaliação compara o teor de água absorvido em função do tempo.

Germinação *ex vitro* - Quatro repetições de 50 sementes intactas foram postas para germinar entre três folhas de papel Germitest e em placas de Petri forradas com duas camadas do mesmo papel, umedecidos com água destilada na proporção de 2,5 vezes a sua massa seca. Posteriormente as sementes foram mantidas em BOD regulada na temperatura constante de 25 e alternada de 20-30 °C, com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram realizadas aos 14 e 30 dias após a semeadura e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais e anormais (BRASIL, 2009).

Germinação *in vitro* - Os tegumentos foram totalmente removidos de forma manual com o auxílio de um mini-torno de bancada (ALEXANDRE et al., 2009) e em seguida as sementes foram levadas à câmara de fluxo laminar, para então serem submetidas ao processo de desinfestação com etanol 70% por um minuto e hipoclorito de sódio em concentração comercial (2,5% de cloro ativo) por 15 minutos.

Após cada processo foi realizada a tríplice lavagem das sementes em água destilada e autoclavada. Posteriormente as sementes foram semeadas em frascos de vidro contendo 50 mL de meio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG 1962), sendo dispostas em quatro repetições de 25 sementes. Para avaliar a germinação, foram aplicados como tratamentos às combinações dos seguintes fatores: temperaturas (25 e 20-30 °C) e qualidade de luz (branca, vermelho, vermelho extremo e ausência de luz). A determinação das temperaturas foi baseada na metodologia descrita para *P. edulis* nas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009). A luz branca foi produzida por quatro lâmpadas fluorescentes de 20 W, fixadas internamente na porta da BOD. O comprimento de onda vermelho foi obtido a partir de duas folhas de papel celofane vermelho, enquanto que para o vermelho extremo utilizou-se duas folhas de papel celofane azul seguidas de duas folhas de celofane vermelho. A ausência de luz foi alcançada pelo uso de sacolas pretas envolvendo os frascos de vidro (MENEZES et al., 2004). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial simples 2x4, sendo duas temperaturas (25 e 20-30 °C) e quatro qualidades de luz (branca, vermelho, vermelho extremo e ausência de luz). As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, com auxílio software GENES (CRUZ 2006).

Teste de tetrazólio - Cinco repetições de 50 sementes tiveram seus tegumentos removidos como descrito anteriormente e em seguida foram pré-condicionadas em água destilada por 12 horas, à temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, as sementes foram transferidas para recipientes com 20 mL da solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5 e 10 g L⁻¹, a qual foram acondicionados por duas horas em BOD reguladas nas temperaturas de 30; 35; 40 e 45 °C. Os recipientes foram protegidos com papel alumínio para evitar o contato da solução com a luz para que não ocorresse a fotodegradação da solução. Após este período as sementes foram lavadas e mantidas imersas em água destilada para assim realizar a excisão manual dos embriões, com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Em sequência os embriões foram digitalizados e avaliados, com o auxílio do microscópio estereoscópio Leica SGD, que possui aumento de 40X e câmera embutida Leica EC3. A intensidade da coloração e diferenciação da viabilidade dos embriões de *P. foetida* foram determinadas conforme Moore (1972), ou seja, vermelho brilhante ou rosa brilhante

(tecido vivo e vigoroso), vermelho carmim forte (tecido em deterioração) e branco leitoso ou amarelado (tecido morto).

Paralelamente ao TZ realizou-se um teste de germinação *in vitro* com a finalidade de associar os padrões de coloração às classes de vigor. Cinco repetições de dez sementes foram desinfestadas e semeadas como descrito anteriormente. Posteriormente os fracos foram mantidos em BOD com temperatura ajustada para 20-30 °C, na presença de luz branca e fotoperíodo de 12 horas por 30 dias. Decorrido esse período procedeu-se a avaliação das plântulas, sendo estas classificadas conforme seus diferentes estádios de desenvolvimento (Brasil 2009). Para avaliar a associação entre o TZ e o teste de germinação *in vitro*, foram calculados em cada repetição o número de embriões pertencentes a cada classe aplicando posteriormente o teste Qui-quadrado em nível de 5% de probabilidade, com auxílio software Bioestat 5.0 (AYRES et al., 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação e caracterização morfológica

Passiflora foetida var. *glaziovii* Killip. Publ. Field. Mus. Nat.Hist.Bot. 19: 503.1938.

Trepadeira herbácea; ramos cilíndricos, finos, estriados, vináceos; gavinhas axilares; estípulas pinatissectas; folhas 3-lobadas, 6,9-8,1 x 3,1-4,2 cm, lóbulo direito 2,0-3,1 cm larg., lóbulo esquerdo 2,3-3,0 cm larg., base cordada, ápice agudo, subhastadas, adpresso-hirsuta acima, densamente ciliada, face adaxial com tricomas tectores, face abaxial com tricomas glandulares, margem ondulada e ciliada com presença de tricomas glandulares; pecíolo 3,1-4,9 cm compr., ciliado, tricomas glandulares; 3-brácteas 2,0-2,5 cm compr., persistentes, bipinatissectas, segmentos mais curtos que a metade da altura do eixo principal não intimamente ligados, verdes, ciliadas, tricomas glandulares; hipanto curto-campanulado, verde; sépalas-5, oblongas, corniculadas, ápice agudo, presença de tricomas tectores, face abaxial verde, face adaxial alva; pétalas-5, oblongas, ápice arredondado, alvas; corona filiforme, alva e lilás; opérculo, membranáceo, margem denteada; límen, cupuliforme, membranáceo não envolvendo a base do androginóforo, margem lisa; anel nectarífero presente; androginóforo reto; ovário 3-carpelar, glabro, pluriovulado, globóide, hirsuto; estigmas-3; estames-5; fruto bacóide, elipsóide, glabro, verde;

sementes 1,95-2,29 x 4,24-4,93 mm, achatadas, oblongas, alveoladas, enegrecidas, ápice tridentado, ariladas, arilo alvo (Figuras 1).

Material examinado: BRASIL. Espírito Santo. São Mateus, Litorâneo, Campus do CEUNES, 01 II 2013, fl./fr., Costa, P. R. 01(VIES).

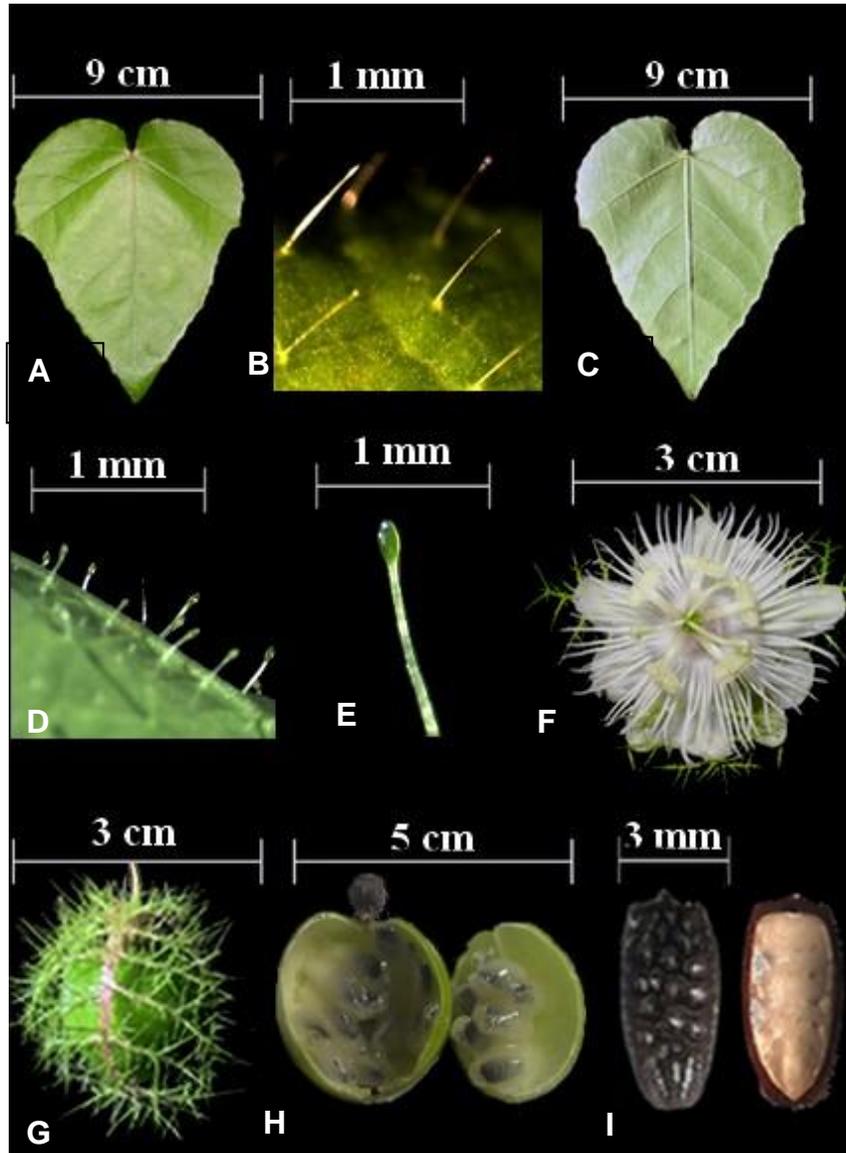


FIGURA 1. Caracterização morfológica de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip: face adaxial da folha (A); tricomas tectores localizados na face adaxial da folha (B); face abaxial da folha (C); tricomas tectores localizados na face abaxial da folha (D); tricoma glandular (E); flor (F); fruto verde com presença de brácteas (G); fruto maduro aberto demonstrando sementes cobertas por arilo (H); sementes intacta e semente após retirada parcial do tegumento demonstrando o endosperma (I).

Até o presente momento a *Passiflora foetida* var. *glaziovii* Killip, era conhecida apenas para o estado do Rio de Janeiro (Killip 1938) pelo material-tipo, sendo aqui registrada pela primeira vez no Espírito Santo.

Em regiões geográficas próximas ao Espírito Santo foram relatadas a presença de *P. foetida* L., *P. foetida* var. *gossypifolia* (Desv.) Mast. Trans. Linn. e *P. foetida* var. *fluminensis* (M. Roemer) Killip, no entanto estas variedades diferem da descrita neste estudo, principalmente devido à presença de tricomas localizados por toda a planta, à exceção do ovário de *P. foetida* var. *fluminensis*, que se apresentou glabro (Killip 1938), assim como em *P. foetida* var. *glaziovii* Killip.

4.2. Avaliações fisiológicas e bioquímica

As sementes de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip utilizadas no presente estudo apresentaram em média 10% de umidade e a condutividade elétrica igual a $0,694 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$. Estas sementes possuem tegumento rígido, com superfície na zona central ornamentada e reticulada. O ápice apresenta-se tridentado em ambas as faces, com a projeção mediana ligeiramente maior em relação às demais, a base é aguda e a margem estriada. As dimensões médias das sementes são iguais a: 4,67mm de comprimento, 2,15mm de largura e 1,24 mm de espessura.

O início da germinação se dá com a absorção de água pela semente e termina com o alongamento do eixo embrionário, em que a protrusão do embrião através do tegumento é o ponto crucial que identifica esse processo (BEWLEY e BLACK, 1994).

As fases de embebição das sementes de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip segundo o padrão trifásico de absorção de água, são representadas na Figura 2. Observa-se que a fase I do processo de embebição ocorre em duas horas, havendo elevação da umidade de 10 para 12%. Decorrido este período ocorre drástica redução na velocidade de absorção de água fato que perdura por 94 horas caracterizando a Fase II ou *leg* fase.

Após 96 horas há o aumento na velocidade de embebição e o teor de água passa de 12 para 13% em 24 horas. Este período caracteriza o início da fase III, na

qual ocorre absorção ativa de água pelas sementes, porém esta fase não é concluída, pois às 120 horas de embebição não é observada a protrusão radicular em *P. foetida* var. *glaziovii* Killip.

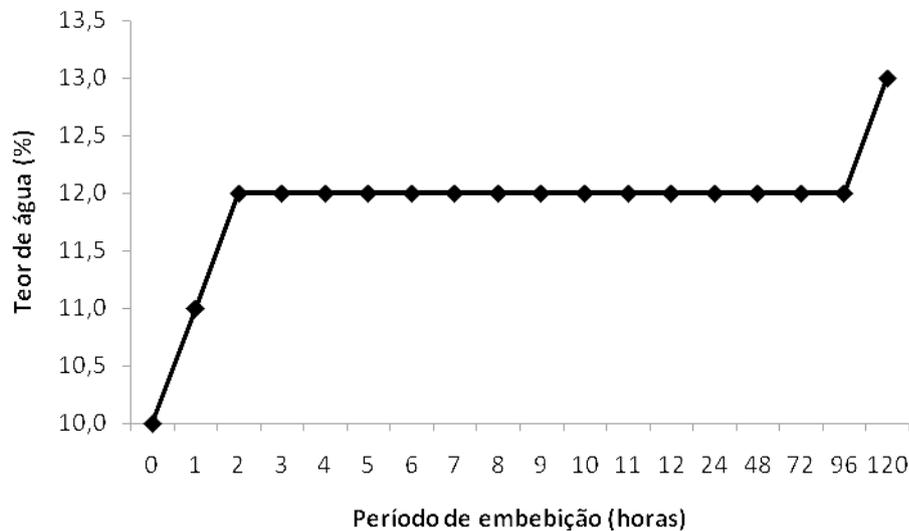


FIGURA 2. Curva de embebição de sementes de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip.

Em sementes de *P. alata* a fase III da germinação também é marcada por aumento no conteúdo de água a partir de 120 h, mas ao contrário de *P. foetida* var. *glaziovii*, em *Passiflora alata* após 120 h inicia-se o crescimento do embrião, culminando com a protrusão de raiz primária (FERRARI et al., 2008).

A dormência germinativa também pode ser observada nas avaliações de germinação *ex vitro*, tanto em rolo de papel quanto sobre papel, sendo que para ambos os testes apenas uma semente germinou à temperatura de 20-30 °C (Figura 3). Esta dormência é descrita por Soares et al. (2012), que afirmam que as sementes de *P. foetida* L. podem levar alguns meses para germinar.

A propagação *in vitro* pode ser uma estratégia eficiente para superar em parte a dormência germinativa. Desta forma, realizou-se um pré-teste, no qual sementes de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip com presença de tegumento apresentaram alto grau de contaminação, ao contrário das sementes que tiveram seus tegumentos totalmente removidos (Figura 3). Além disso, foi possível observar que as sementes sem tegumento, quando inoculadas *in vitro* iniciaram a protrusão radicular. O mesmo foi observado em *P. edulis* f. *flavicarpa*, no qual a remoção

completa dos tegumentos é indicada para a germinação *in vitro* (ALEXANDRE et al., 2009).

Assim como em *P. foetida* var. *glaziovii* Killip, as sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* não germinaram quando o seu tegumento foi mantido intacto, o que caracteriza algum tipo de dormência. Esta dormência em *P. edulis* esta ser ocasionada pelo tegumento, estando possivelmente relacionada aos mecanismos de controle de entrada de água para o interior das sementes ou às substâncias inibidoras do crescimento presentes ao envoltório das sementes.



FIGURA 3. Germinação de sementes de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip: sobre papel (A); em rolo de papel (B). Pré-teste de germinação *in vitro* (C): 1. sementes sem tegumento e 2. sementes com tegumento.

Na Figura 3 (A-B), pode-se observar a presença de exsudatos ao redor das sementes. Hilst et al. (2012) relatam que em sementes de *Coffea arabica* L. existe uma correlação negativa entre as tonalidades dos exsudatos e a qualidade fisiológica das sementes de café, porém ainda não há uma padronização para esta avaliação.

A partir dos resultados obtidos anteriormente, iniciou-se a avaliação da resposta germinativa das sementes de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip perante as diferentes qualidades de luz e temperaturas. A análise fatorial entre temperatura e qualidade de luz não foi significativa sendo, portanto, os tratamentos avaliados separadamente (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância para o teste de germinação *in vitro* em *P. foetida* var. *glaziovii* Killip em relação à qualidade de luz e temperatura (Temp.) para as variáveis plântulas normais aos 14 dias após montagem do teste, plântulas normais, plântulas anormais e comprimento de hipocótilo aos 30 dias após montagem do teste de germinação.

		Valores do Quadrado Médio			
FV	G.L.	14 dias	30 dias		
		Plântulas normais	Plântulas normais	Plântulas anormais	Comprimento de hipocótilo (cm)
Luz	3	307,17 ^{ns}	290,61 ^{ns}	55,20 ^{ns}	66,70 ^{**}
Temp.	1	312,5 ^{ns}	1287,78 ^{**}	1815,03 ^{**}	0,16 ^{ns}
Luz X Temp.	3	192,5 ^{ns}	98,11 ^{ns}	174,03 ^{ns}	0,16 ^{ns}
Resíduo	24	114,17	133,11	211,28	1,84
Média		34,87	39,91	44,78	7,69
CV (%)		30,64	28,91	32,46	17,62

Quadrado médio significativo a 1% (**) e não significativo (^{ns}).

Aos 14 dias após a semeadura não houve diferença entre as porcentagens de plântulas normais obtidas de sementes mantidas sob temperaturas de 25 e 20-30 °C (Tabela 2). Esse resultado, porém foi alterado após 30 dias da montagem do teste, sendo a porcentagem de plântulas normais superiores quando as sementes foram expostas à temperatura de 20-30 °C, sugerindo uma resposta correspondente a uma provável adaptação às flutuações naturais do ambiente (BORGES & RENA, 1993).

A temperatura alternada de 20-30 °C também foi a mais adequada para a germinação de *Passiflora cincinnata* Mast. (SANTOS et al., 1999), *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. (OSIPI & NAKAGAWA, 2005) e *Passiflora alata* Dryander (ZUCARELI et al., 2009).

TABELA 2. Porcentagem de plântulas normais e anormais e comprimento de hipocótilo (cm) de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip quando submetidas a diferentes temperaturas.

Temperaturas (°C)	Características avaliadas			
	14 dias	30 dias		
	Plântulas normais (%)	Plântulas normais (%)	Plântulas anormais (%)	Comprimento de hipocótilo (cm)
25	31,7 a*	33,5 b	52,3 a	7,7 a
20-30	38,0 a	46,2 a	37,2 b	7,6 a

*Médias de cada característica seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Para a germinação, a semente de *P. foetida* var. *glaziovii* mostrou-se indiferente à qualidade de luz (comprimento de ondas), em relação à porcentagem de plântulas normais e anormais como pode ser observado na Tabela 3, o que sugere um comportamento não-fotoblástico (Figura 4) (MAYER & POLJAKOFF MAYBER, 1989).

Essa característica possibilita que as sementes de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip germinem em ambientes com presença, pouca ou ausência de luz, ocupando, assim um micro-habitat na floresta, ou mesmo no solo coberto com camada de pedras ou acúmulo de folhas (VIEIRA et al., 2010). Os diferentes graus de luminosidade causam, em geral, mudanças morfológicas e fisiológicas na planta, sendo que o grau de adaptação é ditado por características particulares de cada espécie em interação com seu meio (SCALON et al., 2003).

TABELA 3. Porcentagem de plântulas normais e anormais e comprimento de hipocótilo (cm) de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip quando submetidas diferentes qualidades de luz.

Qualidade de luz	Características avaliadas			
	14 dias		30 dias	
	Plântulas normais (%)	Plântulas normais (%)	Plântulas anormais (%)	Comprimento de hipocótilo (cm)
Branca	33,5 a*	35,1 a	44,6 a	4,3 c
Vermelha	31,0 a	41,0 a	43,5 a	6,3 b
Vermelha extrema	31,0 a	35,5 a	48,5 a	9,1 a
Ausência	44,0 a	48,0 a	42,5 a	10,8 a

*Médias de cada característica seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.



FIGURA 4. Frascos contendo plântulas de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip após 30 dias de condicionamento em ambientes com qualidades de luz: branca (A); vermelho (B); vermelho extremo (C) e ausência (D).

Ao avaliar o comportamento germinativo de *Passiflora nitida* sob diferentes concentrações de ácido giberélico (GA_3), Passos et al. (2004) observaram que quando as sementes foram tratadas com 1000 mg L^{-1} não houve diferença na porcentagem germinativa das sementes, quando expostas ou não à luz, sendo este um comportamento similar ao observado em *P. foetida* var. *glaziovii*. Porém, em outras espécies como em *P. cincinnata* Mast. e *P. edulis* f. *flavicarpa*, a luz exerce efeito inibitório a germinação (MACIEL & BAUTISTA, 1997; ZUCARELI et al., 2009).

A avaliação do potencial fisiológico das sementes de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip pelo teste bioquímico de tetrazólio, foi realizada a partir de análises individuais dos embriões por meio de imagens possibilitaram uma avaliação mais apurada da coloração dos embriões, por permitir a ampliação, para assim diferenciar e classificar os embriões conforme o vigor.

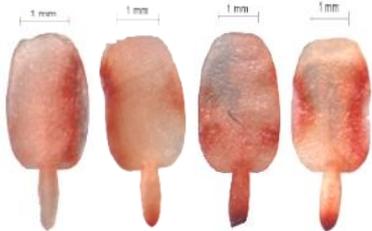
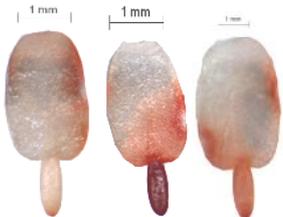
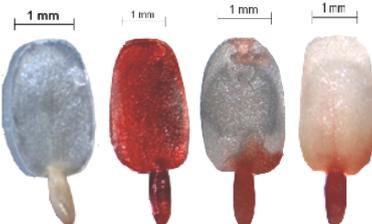
Após a aplicação dos diferentes tratamentos do TZ foi possível identificar treze padrões principais de coloração, e a avaliação das plântulas obtidas pela germinação *in vitro* resultou na identificação de quatro estádios de crescimento, permitindo assim propor um padrão de avaliação com quatro classes de vigor.

A definição das classes de vigor foi realizada a partir da associação da coloração dos embriões com o desenvolvimento das plântulas. Embriões que apresentaram coloração vermelho, rosa brilhante ou ambas foram classificados como de vigor alto, originando plântulas com sistema radicular e parte aérea bem desenvolvidos (Classe 1) (Tabela 4). Quando os embriões apresentaram coloração rosa claro, menos de 50% dos cotilédones sem coloração ou a extremidade do eixo embrionário com coloração vermelha forte foram caracterizados como de vigor baixo podendo originar plântulas com parte aérea e hipocótilo pouco desenvolvidos, ou ainda, plântulas com cotilédones ainda fusionados ou sementes que somente apresentavam protrusão de raiz primária (Classe 2) (Tabela 4).

Embriões que apresentavam cotilédones com 50% ou acima deste percentual sem coloração, eixo embrionário branco ou vermelho carmim forte, originam plântulas anormais sem sistema radicular ou em formato de rosetas (Classe 3) (Tabela 4). No decorrer das avaliações notou-se a presença de lesões laterais nos cotilédones, ocasionadas pela pressão do mini-torno no momento de remoção do tegumento, sendo essas lesões, portanto desconsideradas no momento da avaliação, conforme recomendação das regras de Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009).

Além disso, a retirada do tegumento possibilita maior obtenção de maior uniformidade no procedimento da coloração dos tecidos (SILVA et al., 2012). No entanto, conforme Cervi et al. (2009), a retirada dos tegumentos pode acarretar prejuízos no resultado das avaliações devido à ocorrência de danos ao embrião.

TABELA 4. Padrões de coloração de embriões de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip, observados no teste de tetrazólio e classes de vigor correspondente ao grau de desenvolvimento de plântulas cultivadas *in vitro*.

Padrão de coloração	Classe / Vigor	Grau de desenvolvimento
<p>Vermelho brilhante, rosa brilhante ou ambas.</p> 	1 / Alto	<p>Parte aérea e radicular bem desenvolvidas.</p> 
<p>Rosa claro; menos de 50% dos cotilédones sem coloração; extremidade do eixo embrionário vermelho intenso.</p> 	2 / Baixo	<p>Parte aérea e hipocótilo pouco desenvolvido; cotilédones fusionados; apenas a presença de raiz.</p> 
<p>50% ou mais dos cotilédones sem coloração; eixo embrionário branco ou vermelho carmim forte.</p> 	3 / Inviável	<p>Anormais</p> 
<p>Embrião sem coloração; embrião vermelho carmim; embrião metade branco e a outra metade vermelho carmim.</p> 	4 / Morto	<p>Embriões sem desenvolvimento.</p> 

A inexistência de um padrão de avaliação para sementes de espécies do gênero *Passiflora* dificulta a adequação dos resultados obtidos no TZ. Em alguns trabalhos foi feita a avaliação da viabilidade de sementes de Passifloraceae, como em *P. giberti* (FERREIRA et al., 2002), *P. alata* (FERREIRA et al., 2005; ZUCARELI et al., 2003) e *P. setacea* (PADÚA et al., 2011), mas não apresentaram imagens que pudessem servir de comparação para as outras espécies como a do presente estudo (*P. foetida* var. *glaziovii* Killip). Um exemplo da importância destas imagens é demonstrada no trabalho de Hosomi et al. (2011), tornando possível a avaliação de sementes de *Cattleya sanguiloba* e *Cattleya granulosa* após o TZ e assim as separando em sementes em viáveis, não viáveis ou vazias.

A desuniformidade no processo de avaliação do TZ em passifloras pode ser observada quando se realiza a comparação de diferentes estudos. Em sementes duras de *P. alata* avaliadas por meio do TZ, para determinação da porcentagem de sementes dormentes e mortas, foram considerados como viáveis os tecidos de coloração vermelha ou rosa e inviáveis os de coloração branco-leitoso ou vermelho intenso (ZUCARELI et al., 2003). Já Padúa et al. (2011), ao avaliarem sementes de *P. setacea* observaram que as viáveis apresentaram coloração rósea em pelo menos metade dos cotilédones e de todo o eixo embrionário.

A presença da cor vermelha carmim é característica de tecidos em deterioração que permitem maior difusão da solução de tetrazólio, por meio de suas membranas celulares comprometidas (CORTE et al., 2010). Desta forma, a presença ou a ausência de coloração no eixo hipocótilo-radícula demonstra que há intensa desuniformidade no tecido, afetando em ambos os casos a região vascular e o cilindro central do embrião, onde estão localizados os vasos que conectam o eixo embrionário aos cotilédones, que transportam substâncias de reserva nas fases iniciais de germinação e emergência das plântulas o que impossibilita a formação de plântulas normais ou até mesmo impede o desenvolvimento do embrião.

Os valores referentes à associação entre o TZ e o teste de germinação *in vitro* são apresentados na Tabela 5. Ao aplicar o teste de Qui-quadrado foi possível realizar comparações entre as frequências de cada tratamento do TZ com as frequências da germinação *in vitro*, obtendo assim valores percentuais de probabilidade, que superiores a 5% demonstram não haver diferença estatística entre as frequências. Assim, ao comparar as frequências de embriões viáveis e inviáveis, verifica-se que os pré-condicionados por 12 horas à temperatura ambiente

em água destilada e acondicionadas nas concentrações de 10 e 5 g L⁻¹ de tetrazólio e mantidas às temperaturas de 30 e 35 °C por duas horas, respectivamente, apresentaram 83,03% de probabilidade, sendo, portanto, as que melhor corresponderam às frequências obtidas no teste de germinação *in vitro* (Tabela 5).

TABELA 5. Comparações entre frequências do número (N°) e porcentagens (%) de embriões viáveis e inviáveis obtidas no teste de tetrazólio com as do teste de germinação *in vitro*.

Temperatura (°C)	Tetrazólio (g L ⁻¹)	Teste de Tetrazólio					
		Número de sementes	Embriões viáveis (N°) (%)		Embriões inviáveis (N°) (%)		Probabilidade (%)
30	2,5	50	2	4	48	96	0,14
	5,0	50	23	46	27	54	14,93*
	7,5	50	32	64	18	36	0,13
	10,0	50	17	34	33	66	83,03
35	2,5	50	11	22	39	78	49,40
	5,0	50	17	34	33	66	83,03
	7,5	50	31	62	19	38	0,26
	10,0	50	25	50	25	50	6,62
40	2,5	50	19	38	31	62	52,62
	5,0	50	27	54	23	46	2,58
	7,5	50	34	68	16	32	0,03
	10,0	50	25	50	25	50	6,62
45	2,5	50	32	64	18	36	0,13
	5,0	50	19	38	31	62	52,63
	7,5	50	9	18	41	82	24,17
	10,0	50	30	30/60	20	40	0,49
20-30	-	50	15	30	35	70	-

*Valores de p > 5% não diferem estatisticamente do teste de germinação *in vitro*.

A escolha de metodologia adequada para o emprego do TZ deve se basear na facilidade para a diferenciação de tecidos viáveis e inviáveis e lotes de qualidade fisiológica distintas. Além disso, o TZ deve representar o teste de germinação, ou seja, fornecer uma ideia aproximada da germinação de determinado lote de sementes (KRZYZANOWSKI & FRANÇA NETO, 1999). Segundo Azerêdo et al. (2011) e Clemente et al. (2012), os resultados de viabilidade obtidos no TZ e de germinação devem ser semelhantes, permitindo diferenças de até 5% entre ambos, o que também pode ser observado na Tabela 5 para os tratamentos citados acima.

A associação do teste de germinação *in vitro* com o padrão de coloração de sementes pelo TZ já foi utilizado com o buriti (SPERA et al., 2001). O mesmo foi feito com sementes de macaúba (RIBEIRO et al., 2010) e *ex vitro* para sementes de *P. setacea* (PÁDUA et al., 2011).

Em sementes de *Eulophia alta*, os resultados apresentados no TZ foram inferiores aos do teste de germinação (JOHNSON et al., 2007). Possivelmente a diferença entre os resultados deve-se à aplicação de padrões metodológicos que não foram adequados para a espécie estudada. Sendo este um exemplo da importância de estudos voltados à adequação de metodologias para realização do TZ.

Em sementes de outras Passifloraceas as metodologias empregadas são distintas, como em *P. alata*, em que as sementes são cortadas transversalmente e acondicionadas em solução de tetrazólio a 1 g L⁻¹, durante três horas, na ausência de luz e na temperatura de 35 °C (ZUCARELI et al., 2003). Já para sementes armazenadas de *P. setacea*, o condicionamento foi de 24 horas à 30 °C, seguido de corte na extremidade do eixo embrionário e acondicionamento em 7,5 g L⁻¹ de tetrazólio por três horas à temperatura de 30 °C (PADÚA et al., 2011).

Ao comparar a frequência obtida no TZ com o teste de germinação (Tabela 6) pôde-se observar que o condicionamento dos embriões na concentração de 10 g L⁻¹ de tetrazólio sob temperatura de 30 °C apresentou o maior porcentual de significância sendo este igual a 60,40%, quando comparado ao teste de germinação *in vitro*. Este resultado reafirma o obtido na Tabela 5, podendo, portanto considerar o tratamento em questão como o mais adequado para a realização do teste de tetrazólio em sementes de *P. foetida* var. *glaziovii* Killip.

TABELA 6. Comparação do número (N°) e porcentagem (%) de embriões avaliados pelo teste de tetrazólio que podem dar origem a plântulas normais e anormais com as plântulas obtidas no teste de germinação *in vitro*.

Temperatura (°C)	TZ (g L ⁻¹)	Número de sementes	Plântulas normais		Plântulas normais		Morto		Probabilidade (%)
			N°	%	N°	%	N°	%	
30	2,5	50	2	4	5	10	43	86	0,00
	5,0	50	23	46	25	50	2	4	1,16
	7,5	50	32	64	17	34	1	2	0,03
	10,0	50	17	34	25	50	8	16	60,40*
35	2,5	50	11	22	35	70	4	8	2,88
	5,0	50	17	34	26	52	7	14	44,39
	7,5	50	31	62	15	30	4	8	0,36
	10,0	50	25	50	16	32	9	18	12,34
40	2,5	50	19	38	28	56	3	6	4,16
	5,0	50	27	54	11	22	12	24	2,17
	7,5	50	34	68	15	30	1	2	0,00
	10,0	50	25	50	15	30	10	20	11,27
45	2,5	50	32	64	15	30	3	6	0,13
	5,0	50	19	38	23	46	8	16	52,98
	7,5	50	9	18	34	68	7	14	8,46
	10,0	50	30	60	15	30	5	10	0,84
Teste de germinação <i>in vitro</i>									
20-30	-	50	15	30	23	46	12	24	-

*Valores de p > 5% não diferem estatisticamente do teste de germinação *in vitro*.

5. CONCLUSÃO

Primeiro registro da espécie *Passiflora foetida* var. *glaziovii* Killip no estado do Espírito Santo.

As sementes de *Passiflora foetida* var. *glaziovii* Killip são classificadas como não-fotoblásticas e devem ser germinadas *in vitro* em temperatura alternada de 20-30 °C, estando totalmente desprovidas de tegumento.

Para avaliação do vigor das sementes de *Passiflora foetida* var. *glaziovii* Killip pelo teste de tetrazólio recomenda-se a retirada total do tegumento, o pré-condicionamento por doze horas em água destilada a temperatura ambiente de 25 °C e condicionamento pela imersão em solução de 10 g L⁻¹ de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio a temperatura de 30 °C, por duas horas em ambiente escuro.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R. S.; COUTO, F. A. D' A.; DIAS, J. M. M.; OTONI, W. C.; CECON, P. R.; GOMES, S. B. de S. Factors affecting *in vitro* germination of passion fruit seeds. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 5, p. 27-35, 2009.

ANANDAN, R.; JAYAKAR, B.; MANAVALAN, R. Atividade hepatoprotetora da decocção dos frutos de *Passiflora foetida* Linn em CCL4 a lesão hepática induzida em ratos. **Journal of Pharmacy Research**, v.2, n.12, p. 1857-1859, 2009.

APGIII. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal the Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.

ARAÚJO, D. ; ALVES, M. Variabilidade morfológica de *Passiflora foetida* L.: Quantas variedades existem no estado de Pernambuco? **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 852-854, 2007.

AZERÊDO, G. A. de; PAULA, R. C. de; VALERI, S. V. Viabilidade de sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth. pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 1, p. 61-68, 2011.

AYRES, M.; AYRES-JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. **Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas**. Versão 5.0. Belém, Pará: Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, 2007. 324p.

BALANGUERA, H. E.; ÁLVAREZ, J. G.; CÁRDENAS, J. Efecto de la estratificación fría y la cobertura plástica en semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) para la obtención de plántulas. **Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica**, v. 13, n. 2, p. 89-97, 2010.

BARROS, D. I.; DIAS, D. C. F. dos S.; BHERING, M. C.; DIAS, L. A. dos S; ARAÚJO, E. F. Uso do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de

sementes de abobrinha. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 165-171, 2005.

BARROS, D. I.; DIAS, D. C. F. dos S.; BHERING, M. C.; DIAS, L. A. dos S.; ARAÚJO, E. F. Uso do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de abobrinha. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 165-171, 2005.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Germination ecophysiology of herbaceous plant species in a temperate region. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 75, n. 2, p. 286-305, 1988.

BELLON, G.; FALEIRO, G. F.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FONSECA, K. G.; BRAGA, M. F. Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores rapd. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 197-202, 2009.

Bernacci, L.C.; Cervi, A.C.; Milward-de-Azevedo, M.A.; Nunes, T.S.; Imig, D.C.; Mezzonato, A.C.. *Passifloraceae* in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

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

BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PINÁ-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B. **Sementes florestais tropicais**. Abrates, Brasília, p. 83-135, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009, 395p.

BRIGNANI F. NETO. Produção integrada de maracujá. **Biológico**, São Paulo, v. 64, n. 2, p.195-197, 2002

CARVALHO, F. K. de L.; MEDEIROS, R. M. T. de; ARAUJO, J. A. S. de; RIET-CORREA, F. Intoxicação experimental por *Passiflora foetida* (Passifloraceae) em caprinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 477-481, 2011.

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

CERVI, A. C. **Passifloraceae do Brasil**. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. Ed: Fontqueria, v. 45, p. 1-92, 1997.

CERVI, F.; MENDONÇA, E. A. F. Adequação do teste de tetrazólio para sementes de algodoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 177-186, 2009.

CLEMENTE, A. da C. S.; CARVALHO, M. L. M. de; GUIMARÃES, R. M. Suitability of the tetrazolium test methodology for recently harvested and stored coffee seeds. **Ciência Agrotecnica**, v. 36, n. 4, p. 415-423, 2012.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. de L. e; PEREIRA, B. L. C. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de sementes de *Melanoxylon brauna* Schot. **Cerne**, v. 16, n. 3, p. 415-421, 2010.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: Biometria. Editora UFV. Viçosa (MG), 2006, 382p.

CUSTÓDIO, C. C.; DAMASCENO, R. L.; MACHADO NETO, N. B. Imagens digitalizadas na interpretação do teste de tetrazólio em sementes de *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2, p. 334-341, 2012.

DANTAS, A. C. V. L. Implantas o pomar. In: DANTAS, A. C. V. L.; LIMA, A. A.; GAÍVA, H. N. (eds.). **Cultivo do maracujazeiro**. Brasília: LK Editora e Comunicação, p.9-97, 2006.

DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. **O teste de tetrazólio para viabilidade da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103p.

DIAS, J. M. M.; COUCEIRO, M. A.; VENTURA, G. M.; SIQUEIRA, D. L. de; LIMA, J. C. de. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes do maracujazeiro. **Revista Ceres**, v. 50, n. 291, p. 549-564, 2003.

Faria F.S.; Stehmann, J.R. Biologia reprodutiva de *Passiflora capsularis* L. e *P. pohlii* Mast. (Decaloba, Passifloraceae.). **Acta Botanica Brasilica**, v.24, n.1, p. 262-269, 2010.

FERRARI, T. B; FERREIRA. G.; MISCHAN, M. M; PINHO, S. Z. de. Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis): fases e efeito de reguladores vegetais. **Revista Biotemas**, v. 21, n. 3, p. 65-74, 2008.

FERREIRA, G. Propagação do maracujazeiro. **Informe Agropecuário**, v. 21, p. 18-24, 2000.

FERREIRA, G. **Estudo da embebição e do efeito de fitoreguladores na germinação de sementes de Passifloráceas**. 1998, Tese (Doutorado em Horticultura), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

FERREIRA, G.; DETONI, A. M.; TESSER, S. M.; MALAVASI, M. M. Avaliação de métodos de extração do arilo e tratamento com ethephon em sementes de *Passiflora giberti* N. E. Brown pelos testes de germinação e tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 248-253, 2002.

FERREIRA, G.; OLIVEIRA, A. de; RODRIGUES, J. D.; DIAS, G. B.; DETONI, A. M.; TESSER, S. M.; ANTUNES, A. M. Efeito de arilo na germinação de sementes de *Passiflora alata* Curtis em diferentes substratos e submetidas a tratamentos com giberelina. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 2, p. 277-280, 2005.

FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A. **Dormência em sementes florestais**. Colombo: EMBRAPA-Florestas, doc.40, 2000.

GARCÍA, M. T. A.; HOC, P. S. Biología floral de *Passiflora foetida* (Passifloraceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 46, n. 2, p. 191-202, 1998.

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Concentração da solução de tetrazólio e período de coloração do teste para sementes de mamoneira. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 3, p. 38-47, 2009.

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 160-167, 2009.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis. **Acta Botânica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.

GRZYBOWSKI, C. R. de S.; OHLSON, O. de C.; SILVA, R. C. da; PANOBIANCO, M. Viability of barley seeds by the tetrazolium test. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1 p. 47-54, 2012.

HILST, P. C; DIAS, D. C. F. DOS S.; ALVARENGA, E. M; SOUZA, B. L. de. Test of exudates color hues for evaluating the physiological potential of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 2, p. 212-217, 2012.

HOSOMI, S. T.; CUSTÓDIO, C. C.; SEATON, P. T.; MARKS, T. R. ; MACHADO-NETO, N. B. Improved assessment of viability and germination of *Cattleya* (Orchidaceae) seeds following storage. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 48, p. 127-136, 2012.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International rules for testing seeds. **Seed Science and Technology**, Supplement. 2004.

JOHNSON, T. R.; STEWART, S. L.; DUTRA, D.; KANE, M. E.; RICHARDSON, L. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Eulophia alta* (Orchidaceae) - preliminary evidence for the symbiotic culture advantage. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 90, p. 13-323, 2007.

KILLIP, E. P. **The American species of Passifloraceae**. Field Museum of Natural History Botanical Series, Chicago. v. 19, 1938. 613p.

KRAMER, P. J.; KOZLOWSKI, T. **Fisiologia das árvores**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1972, 745p.

KRETSCH, T.; POPPE, C.; SCHAFER, E. A new type of mutation in the plant photoreceptor phytochrome B causes loss of photoreversibility and an extremely enhanced light sensitivity. **The Plant Journal**, v. 22, n. 3, p. 177-186, 2000.

Krzyzanowski F C, França Neto J B and Henning A A. 1991. Relato dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, v.1, n.2, p. 15-20.

KUGLER, E. E.; KING, L. A. A brief history of the passionflower. In: ULMER, T.; MacDOUGAL, J. M. **Passiflora: passionflowers of the World**. Portland: Timber, p. 15-26, 2004.

LIMA, A. A. (Coord.). O cultivo do maracujá. **Circular Técnica 35**, Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 1999, 130 p.

LIMA, C. S. M.; BETEMPS, D. L.; TOMAZ, Z. F. P.; GALARÇA, S. P.; RUFATO, A. R. Germinação de sementes e crescimento de maracujá em diferentes concentrações do ácido giberélico, tempos de imersão e condições experimentais. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 15, n. 1-4, p. 43-48, 2009.

LOPES, J. C.; BONO, G. A.; ALEXANDRE, R. S.; MAIA, V. M. Germinação e vigor de plantas de maracujazeiro-amarelo em diferentes extratos de maturação do fruto, arilo e substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 5, p. 1340-1346, 2007.

MACIEL, N.; BAUTISTA, D. Efeitos da luz sobre a germinação das sementes de maracujá. **Agronomia Tropical**, v. 47, n. 4, p. 397-408, 1997.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Jr. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005, 495p.

MARLIÉRE, L. D. P.; RIBEIRO, A. Q. R.; BRANDÃO, M. das G. L.; KLEIN, C. H.; ACURCIO, F. de A. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.18, supl., p. 754-60, 2008.

MAYER, A.C.; POLJAKOFF MAYBER, A. **The germination of seeds**. 4.ed. Oxford: Pergamon Press, 1989. 270p.

MELETTI, L. M. **Propagação de frutíferas tropicais**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 239p.

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

MENDEZ, A.S.L.; SIMIONATO, N.O.; VALDUGA, A.T.; REGINATTO, F.H. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.1, p. 105-111, 2011.

MENEZES, N. L. de; FRANZIN, S. M.; ROVERSI, T.; NUNES, E. P. Germinação de sementes de *Salvia splendens* Sellow em diferentes temperaturas e qualidades de luz. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 32-37, 2004.

MORLEY-BUNKER, M. J. S. Seed coat dormancy in *Passiflora* species. **Annual Journal Royal New Zealand Institute of Horticulture**, v. 8, p. 72-84, 1980.

MOORE, R. P. Interpretation of color differences in tetrazolium testing. **Seed Technologist News**, v. 44, n. 3, p. 22-24, 1972.

MOHANASUNDARI, C.; NATARAJAN, D.; SRINIVASAN, K.; UMAMAHESWARI, S.; RAMACHANDRAN, A. Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. – a common exotic medicinal plant. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 23, p. 2650-2653, 2007.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NATARAJAN D.; MOHANASUNDARI C.; SRINIVASAN, K. Anti-dermatophytic activity of *Passiflora foetida* L.: an exotic plant. **International Journal of Phytopharmacy Research**, v. 2, n. 2, p. 72-74, 2011.

OSIPI, E. A. F; NAKAGAWA, J. Efeito da temperatura na avaliação da qualidade fisiológica de sementes do maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 179-181, 2005.

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

PASSOS, I. R. da S.; MATOS, G. V. da C.; MELETTI, L. M. M.; SCOTT, M. D. S.; BERNACCI, L. C.; VIEIRA, M. A. R. Utilização do ácido giberélico para a quebra de dormência de sementes de *passiflora nitida* Kunth germinadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 2, p. 380-381, 2004.

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

PEREZ, S. C. J. G. A. Envoltórios. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. **Porto Alegre: Artmed**, 2004. p. 125-134.

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

PIRES, M. V.; ALMEIDA, A. F. de; FIGUEIREDO, A. L. de; GOMES, F. P.; SOUZA, M. M. Germination and seedling growth of ornamental species of *Passiflora* under artificial shade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, n. 1, p. 67-75, 2012.

RIBEIRO, L. M.; GARCIA, Q. S.; OLIVEIRA, D. M. T.; NEVES, S. C. Critérios para o teste de tetrazólio na estimativa do potencial germinativo em macaúba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 4, p. 361-368, 2010.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 15, p. 65-70, 2005.

RASOOL, S. N.; JAHEERUNNISA S.; JAYAVEERA K. N.; SURESH KUMAR, C. *In vitro* callus induction and *in vivo* antioxidant activity of *Passiflora foetida* L. leaves. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2011.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RODRIGUES, A. P. D. C.; LAURA, V. A.; PEREIRA, S. R.; SOUZA, A. de L.; FREITAS, M. E. de. Temperatura de germinação em sementes de estilosantes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4, p. 166-173, 2010.

ROSA, Y. B. J.; DORNELAS, M. C. *In vitro* plant regeneration and de novo differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L. (Passifloraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 108, n. 1, p. 91-99, 2012.

SANTOS, J. F.; SANCHES, M. F. G.; BARBOSA, M.; LEÃO, E. F.; VIEIRA, R. D. Optimising tetrazolium test procedures to evaluate the physiological potential of peanut seeds. *Seed Science and Technology*, v. 40, n. 2, p. 215-228, 2012.

SANTOS, C. M. dos; SOUZA, G. R. L. de; SILVA, J. R. da; SANTOS, V. L. M. dos. Efeitos da temperatura e do substrato na germinação da semente do maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 21, n. 1, p. 1-6, 1999.

SATHISH, R.; SAHU, A.; NATARAJAN, K. Antiulcer and antioxidant activity of ethanolic extract of *Passiflora foetida* L. *Indian Journal of Pharmacology*, v. 43, n. 3, p. 336-339, 2011.

SCALON, S. P. Q.; MUSSURY, R. M.; RIGONI, M. R.; SCALON FILH, H.. Crescimento inicial de mudas de *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns sob condições de sombreamento. *Revista Árvore*, v. 27, n. 6, p. 753-758, 2003.

SILVA, K. S. da; MACHADO, S. L. de O.; MENEZES, N. L. de; URBAN, L. J. K.; ALVES, M. V. P. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para sementes de *Hymenachne amplexicaulis*. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 5, p. 1819-1824, 2012.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, L. F.; SOUZA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Revista Brasileira Farmacognosia*, v. 16, p. 455-62, 2006.

SILVA, C. de P.; SILVA-ALMEIDA, M. de F. O uso medicinal do maracujá. In: A cultura do maracujazeiro. *Informe Agropecuário*, v. 21, n. 206, p. 86-88, 2000

SOARES, W. S; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BARROSO, P. A.; NASCIMENTO, K. S.; FERREIRA, K. T. Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 14, n. esp., p. 138-142, 2012.

SOUZA, C. R. de; OHLSON, O. de C.; PANOBIANCO, M. Avaliação da viabilidade de sementes de aveia branca pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 32, n. 4, p. 174-180, 2010.

SPERA, M. R. N.; CUNHA, R. da; TEXEIRA, J. B. Quebra de dormência, viabilidade e conservação de sementes de buriti (*Mauritia flexuosa*). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 36, n. 12, p. 1567-1572, 2001.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.

THE	INTERNATIONAL	PLANT	NAMES	INDEX.
Passifloraceae	<i>Passiflora foetida</i> L. var. <i>glaziovii</i> Killip.		Disponível	em: <
http://www.ipni.org > Acesso em: 01 abr. 2013.				

TROPICOS. ORG. *Passiflora foetida* var. *glaziovii* Killip. <<http://www.tropicos.org>>. Acesso em: 01 fev. 2013.

VASCONCELLOS, M. A. S.; DUARTE FILHO, J. Ecofisiologia do maracujazeiro. **Informe Agropecuário**, v. 21, n. 206, p. 18-24, 2000.

VERDAM, M. C. dos S.; SILVA, C. B. da. O estudo de plantas medicinais e a correta identificação botânica. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 1, p. 7-13, 2010

VIDAL, W.N.; VIDAL, M.R.R. **Botânica**: organografia. 4.ed. Viçosa: UFV, 2000. 114p.

ZERAIK, M.L.; PEREIRA, C.A.M.; ZUIN, V.G.; YARIWAKE, J.H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, p. 459-471, 2010.

ZUCARELI, C.; CASTRO, M. M.; OLIVEIRA, H. R.; BRANCALIÃO, S. R.; RODRIGUES, J. D.; ONO, E. O.; BOARO, C. S. F. Fitoreguladores e germinação de sementes de maracujá doce em condições de laboratório. **Scientia Agraria**, v. 4, n. 1-2, p. 9-14, 2003.

ZUCARELI, V.; FERREIRA, G.; AMARO, A. C. E.; ARAÚJO, F. P. de. Fotoperíodo, temperatura e reguladores vegetais na germinação de sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 3, p.106-114, 2009.

WAGNER JÚNIOR, A.; ALEXANDRE, R. S.; NEGREIROS, J. R. da S.; PIMENTEL, L. D.; SILVA, R. R. da; PIMENTEL, L. D.; SILVA, J. O. da C. e; BRUCKNER, C. H. Influência do substrato na germinação e desenvolvimento inicial de plantas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg). **Ciência Agrotecnica**, v. 30, n. 4, p. 643-647, 2006.