



**ASPECTOS REPRODUTIVOS, CRESCIMENTO  
*in vitro* E DIVERGÊNCIA GENÉTICA POR  
MARCADOR MOLECULAR EM *Passiflora trintae*  
Sacco**

**FLÁVIO FLÔRES BRITTO**

2017

**FLÁVIO FLÔRES BRITTO**

**ASPECTOS REPRODUTIVOS, CRESCIMENTO *in vitro* E  
DIVERGÊNCIA GENÉTICA POR MARCADOR MOLECULAR EM  
*Passiflora trinitae* Sacco**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutor”.

Orientador:  
Cláudio Lúcio Fernandes Amaral

Co-orientadora:  
Eliane Mariza Dortas Maffei

VITÓRIA DA CONQUISTA  
BAHIA-BRASIL  
2017

B875a

Britto, Flavio Flôres.

Aspectos reprodutivos, crescimento in vitro e divergência genética por marcador molecular em *Passiflora trinitae* Sacco. / Flavio Flôres Gusmão, 2017.

123f. : il. (algumas color.).

Orientador (a): Dra. Cláudio Lúcio Fernandes Amaral.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Vitória da Conquista, 2017.

Inclui referência F. 89 – 109.

1. I. Maracujá vermelho – Cultivo. 2. Biologia floral – Maracujá. 3. Germinação. 4. Fitotecnia, cultura de tecidos. I. Amaral, Cláudio Fernandes. II. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. T. III.

CDD. 634.425

Catálogo na fonte: **Cristiane Cardoso Sousa – CRB 5/1843**

UESB – Campus Vitória da Conquista – BA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
Área de Concentração em Fitotecnia

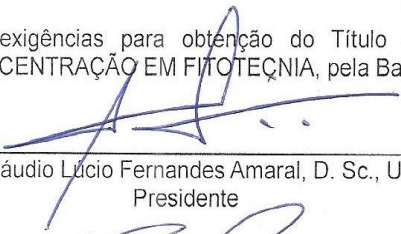
Campus de Vitória da Conquista - BA


DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

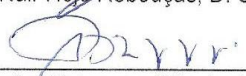
Título: "ASPECTOS REPRODUTIVOS, CRESCIMENTO *in vitro* E DIVERGÊNCIA GENÉTICA POR MARCADOR MOLECULAR EM *Passiflora trinitae* Sacco"

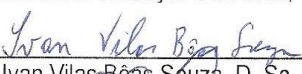
Autor: Flávio Flôres Britto


Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FITOTEÇNIA, pela Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, D. Sc., UESB  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Tiyoko Nair Hoje Rebouças, D. Sc., ABH

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Alcebiades Rebouças São José, D. Sc., UESB

  
\_\_\_\_\_  
Ivan Vilas Boas Souza, D. Sc., ABH

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Orlando Sílvio Caires Neves, D. Sc., UFBA

Data de realização: 26 de julho de 2017.

Estrada do Bem Querer, Km 4 – Caixa Postal 95 – Telefone: (77) 3425-9383 – Fax: (77) 3424-1059  
– Vitória da Conquista – BA – CEP: 45031-900

## AGRADECIMENTOS

Ao SUPREMO ARQUITETO DO UNIVERSO, invariável e ininterruptamente presente em minha vida.

À minha mãe, Riusa, e meu pai, José Britto, pelo apoio e colaboração em toda a minha vida, sendo a mãe que todos desejam, símbolo de vitalidade e fé, e o pai, generoso e trabalhador, referência de força.

Aos meus irmãos, Britto Filho e Josy Flôres, por acompanharem essa trajetória, dando-me incentivo, além de acreditarem, junto a mim, que somos o resultado das experiências que vivemos.

À minha esposa, Adriana Brito Marques (Dri), pelo amor, sentimento, que foi se consolidando em cada desafio, tornando meus dias mais significativos, pois demonstrava através do cuidado e da atenção que deveríamos ter um único foco, a união.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pela realização de minha formação profissional.

À Coordenação, aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade concedida e pela dedicação e manutenção da qualidade do curso.

Ao prof. *D.Sc.* Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, orientador deste trabalho, pela disponibilidade concedida para a realização desta tese e pelos ensinamentos importantes na minha vida profissional.

À prof.<sup>a</sup> *D.Sc.* Eliane Mariza Dortas Maffei, pela co-orientação, essencial à obtenção dos diagnósticos, e também pelo incentivo constante; ela foi responsável pelo meu retorno à Academia.

Ao *D.Sc.* Onildo Nunes e ao graduando em Biologia e Técnico do laboratório de Biologia Molecular Vandeson Sousa, pelos trabalhos realizados na Embrapa em Cruz das Almas-BA, bem como ao prof. *M.Sc.* Dilson Rocha pela micropropagação por meio de cultura de tecidos realizada na Universidade Federal da Bahia, campus Anísio Teixeira, em Vitória da Conquista-BA.

Ao colega e também amigo do curso Jerffson Lucas pela contribuição diferencial no desenvolvimento vegetativo dos maracujazeiros e germinação das sementes, pessoa fundamental nas análises, assim como Eduardo Ganem, amigo e colega no mestrado, que continuou me auxiliando nas horas necessárias.

Aos funcionários da Diretoria do Campo Agropecuário-DICAP, Carlos Rocha dos Santos (Due), Manoel Soares Santos, Gilberto Silva dos Santos (Beto), Adriano Santos de Oliveira, entre outros, pela ajuda na manutenção das plantas na casa de vegetação.

À Secretaria da Educação do Estado da Bahia, por ter concedido o afastamento das atividades docentes para a realização do curso. A todos que de forma direta ou indireta ajudaram. Muito obrigado!

**“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira?  
Aquilo que se sabe, saber que se sabe;  
aquilo que não se sabe, saber que não se sabe;  
na verdade é este o saber”  
Confúcio**

## RESUMO

BRITTO, F. F. **Aspectos reprodutivos, crescimento *in vitro* e divergência genética por marcador molecular em *Passiflora trintae* Sacco.** Vitória da Conquista-BA: UESB, 2017. 123 p. (Tese –Doutorado em Agronomia, Área de concentração em Fitotecnia).\*

A espécie *Passiflora trintae* Sacco apresenta potencial ornamental. O objetivo deste trabalho foi analisar os aspectos reprodutivos, a micropropagação *in vitro* e a diversidade genética por marcadores ISSR em *P. trintae* (maracujazeiro vermelho). Para biologia floral, foi calculada a taxa, pico e intensidade relativa do florescimento, índice de medida de autoincompatibilidade, relação pólen/óvulo, viabilidade polínica e receptividade estigmática; o comportamento meiótico foi analisado utilizando-se 40 botões florais. Para germinação, utilizou-se DIC em esquema fatorial 5 x 4 (concentrações de regulador x temperaturas). Os dados foram submetidos à análise de variância, com médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%, e foi aplicado o teste de regressão polinomial. Para a micropropagação, foi utilizado DIC, esquema fatorial 2 x 4 (fontes de carboidratos e concentrações de carboidratos) e cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e à regressão polinomial. Para análise molecular, 16 genótipos tiveram DNA genômico extraído, amplificado com *primer* ISSR e analisado pela matriz binária. A abertura floral ocorreu, em média, às 4h, e a senescência, às 23h. As plantas apresentaram-se quase autoincompatíveis, levemente compatíveis e autógamas facultativas. A viabilidade polínica foi superior a 70%. Houve receptividade estigmática ao longo do dia. A meiose apresentou normalidade (96%). Para germinação, ocorreu interação entre temperaturas e reguladores. Aos 20±1°C, associadas à concentração 400mg.L<sup>-1</sup>, as sementes apresentam os maiores valores quanto às taxas de germinação. Para crescimento *in vitro*, a sacarose na concentração 45g.L<sup>-1</sup> e glicose em 15g.L<sup>-1</sup> apresentaram maiores médias para número de brotações, comprimento de brotações, número de raízes e comprimento de raízes. Para divergência genética, os marcadores ISSR favoreceram a caracterização e estudo da diversidade genética de genótipos de *P. trintae*, o que possibilitou a detecção de polimorfismo.

**Palavras-chave:** maracujazeiro vermelho, biologia floral, germinação, cultura de tecido, ISSR.

---

\*Orientador: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, *D.Sc.*, UESB e Co-orientadora: Eliane Mariza Dortas Maffei, *D.Sc.*, UESB.

## ABSTRACT

BRITTO, F.F. **Reproductive aspects, *in vitro*, growth and genetic divergence by molecular marker in *Passiflora trintae* Sacco.** Vitória da Conquista-BA: UESB, 2017. 105 p. (Thesis - Doctorate in Agronomy, Area of concentration in Plant Science).\*

The species *Passiflora trintae* Sacco presents ornamental potential. The objective of this work was to analyze reproductive aspects, *in vitro* micropropagation and genetic diversity by ISSR markers in *P. trintae* (red passion fruit). For floral biology, the rate, peak and relative intensity of flowering, autoincompatibility index, pollen / ovule ratio, pollen viability and stigmatic receptivity were calculated; The meiotic behavior was analyzed using 40 floral buds. For germination DIC was used in factorial scheme 5 x 4 (concentrations of regulator x temperatures). The data were submitted to analysis of variance, with averages compared by the Tukey test at 5%, and the polynomial regression test was applied. For micropropagation, DIC, 2 x 4 factorial scheme (carbohydrate sources and carbohydrate concentrations) and five replicates were used. Data were submitted to analysis of variance and polynomial regression. For molecular analysis, 16 genotypes had genomic DNA extracted, amplified with primer ISSR and analyzed by the binary matrix. The floral opening occurred on average at 4:00h and senescence at 23:00h. The plants were almost autoincompatible, slightly compatible and autogamous facultative. Pollen viability was higher than 70%. There was stigmatic receptivity throughout the day. Means showed normality (96%). For germination, interaction between temperatures and regulators occurred. At  $20 \pm 1$  ° C associated with the concentration 400mg.L<sup>-1</sup>, the seeds presented the highest values regarding the germination rates. For *in vitro* growth the sucrose concentration of 45g.L<sup>-1</sup> and glucose in 15g.L<sup>-1</sup> presented higher averages for number of shoots, length of shoots, number of roots and length of roots. For genetic divergence the ISSR markers favored the characterization and study of the genetic diversity of genotypes of *P. trintae*, allowing the detection of polymorphism.

**Keywords:** red passion fruit, floral biology, germination, tissue culture, ISSR.

---

\*Adviser: Cláudio Lúcio Fernandes Amaral, *D.Sc.*, UESB e Coadviser: Eliane Mariza Dortas Maffei, *D.Sc.*, UESB.



## LISTA DE FIGURAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 2.1</b> - A) Casa de vegetação; B) Flor de <i>Passiflora trintae</i> Sacco.....  | 26  |
| <b>Figura 2.2</b> - (A) Incompatibilidade gametofítica, cruzamento (macho) S1S2 x S1S3(fêmea). (B) Incompatibilidade esporofítica, cruzamento (macho) S1S2 x S1S3(fêmea)..   | 39  |
| <b>Figura 2.3</b> - Modelo molecular da autoincompatibilidade esporofítica em Brassicaceae .....   | 40  |
| <b>Figura 2.4</b> - Modelo molecular da autoincompatibilidade gametofítica em Rosaceae.....  | 41  |
| <b>Figura 2.5</b> - (A) Grãos de pólen de <i>Passiflora trintae</i> Sacco; (B) Óvulos de <i>Passiflora trintae</i> Sacco.....  | 42  |
| <b>Figura 2.6</b> - Viabilidade polínica de G02 <i>P. trintae</i> .....  | 45  |
| <b>Figura 2.7</b> - (A) Grãos de polens viáveis de <i>P. trintae</i> ; (B) Grãos de polens viáveis e não viáveis de <i>P. trintae</i> .....  | 46  |
| <b>Figura 2.8</b> - Estigma de <i>P. trintae</i> , com bolhas, imerso em peróxido de hidrogênio.....   | 47  |
| <b>Figura 2.9</b> - (A) Telófase I normal do G18; (B) Telófase I normal do G02.....  | 48  |
| <b>Figura 2.10</b> - (A) Telófase I anormal do genótipo G18 com pontes citoplasmáticas; (B) Grão de polen com ponte citoplasmática do genótipo G18; (C) Genótipo G2 em telófase I com cromossomo solto; (D) Díade de genótipo G27..... | 49  |
| <b>Figura 3.1</b> - Primeira contagem (PC) e porcentagem de germinação (GERM) de semente de <i>P. trintae</i> submetidas a combinações entre GA4+7+N-(Fenilmetil)-aminopurina e temperaturas.....                                      | 64  |
| <b>Figura 3.2</b> - Porcentagem de sementes dormentes e mortas de <i>P. trintae</i> submetidas a combinações entre GA4+7+N-(Fenilmetil)-aminopurina e temperaturas.....  | 67  |
| <b>Figura 4.1</b> - Número e comprimento de brotações de explantes de <i>P. trintae</i> submetidos a diferentes doses de glicose e sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ ).....   | 76  |
| <b>Figura 4.2</b> - Plântulas de <i>P. trintae</i> submetidas a concentrações de $45\text{g.L}^{-1}$ de sacarose (A) e $15\text{g.L}^{-1}$ de glicose (B).....   | 77  |
| <b>Figura 4.3</b> - Número e comprimentos de raízes de explantes de <i>P. trintae</i> submetidos a diferentes doses de glicose e sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ ). .....   | 788 |
| <b>Figura 5.1</b> - Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos de amplificação ISSR com a utilização do Primer DiCA3'RG. M: Marcador de peso molecular 1kb Fermentas. Genótipos de <i>P. trintae</i> Pt (1-16). .....            | 90  |
| <b>Figura 5.2</b> - Dendrograma das relações genéticas entre genótipos de <i>P. trintae</i> obtidas por marcadores ISSR.....   |     |

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 2.1</b> - Análise química do solo horizonte A peneirado.....   | 27  |
| <b>Tabela 2.2</b> - Resumo da análise de variância das taxas de florescimento dos genótipos de <i>P. trintae</i> durante seis semanas.....   | 33  |
| <b>Tabela 2.3</b> - Taxa de florescimento (TF), pico de florescimento (PF) e mês de ocorrência do pico de florescimento e intensidade relativa de florescimento (%IRF) dos genótipos <i>P. trintae</i> Sacco. ....   | 333 |
| <b>Tabela 2.4</b> - Percentual de flores fertilizadas resultante de dois tipos de polinização (autopolinização e polinização cruzada) cruzadas em genótipos de <i>P. trintae</i> em cultivo protegido. ....  | 366 |
| <b>Tabela 2.5</b> - Número de pólen por flor, nº de óvulos por ovário, relação pólen/óvulo de diferentes genótipos de <i>Passiflora trintae</i> Sacco. ....  | 433 |
| <b>Tabela 2.6</b> - Percentagem de viabilidade polínica de genótipos de <i>P. trintae</i> em diferentes horários.. ....  | 455 |
| <b>Tabela 3.1</b> - A) Primeira contagem (%), e B) porcentagem de germinação de semente de <i>P. trintae</i> em diferentes temperaturas e concentrações de GA4+7+N-(Fenilmetil)-aminopurina e temperaturas.....  | 63  |
| <b>Tabela 3.2</b> - A) Porcentagem de sementes dormentes, e B) mortas de <i>P. trintae</i> em diferentes temperaturas e concentrações de GA4+7+N-(Fenilmetil)-aminopurina e temperaturas.....  | 66  |
| <b>Tabela 5.1</b> - Ano de crescimento dos genótipos analisados utilizando ISSR.....   | 85  |
| <b>Tabela 5.2</b> - Primers utilizados em <i>P. trintae</i> . Ta (Temperatura de anelamento); Nb (Nº de bandas); Nbm (Nº de bandas polimórficas); PIC (Conteúdo de informação de polimorfismo); NBF1 (Nº de bandas presentes em 1 genótipo); NBF 2 a 5 (Nº de bandas presentes em 2 a 5 genótipos); NBF 6 a 10 (Nº de bandas presentes em 6 a 10 genótipos); NBF11 a 15 (Nº de bandas presentes em 11 a 15 genótipos); NBF (Nº de bandas presentes nos 16 genótipos); NFA (Nº de falhas) ..... | 89  |
| <b>Tabela 5.3</b> - Coeficiente de similaridade genética entre genótipos de <i>P. trintae</i> .....  | 92  |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO 1</b>   |           |
| <b>1 Introdução Geral.....</b>  | <b>13</b> |
| <br>  |           |
| <b>CAPÍTULO 2: BIOLOGIA FLORAL E COMPORTAMENTO MEIÓTICO DE <i>Passiflora trintae</i> Sacco.....</b> | <b>16</b> |
| <b>1 Introdução.....</b>  | <b>16</b> |
| <b>2 Referencial Teórico.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>2.1 Cultura do maracujá e <i>Passiflora trintae</i> Sacco.....</b>                               | <b>17</b> |
| <b>2.2 Biologia Floral de <i>Passiflora</i>.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2.2.1 Sistemas de reprodução.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2.2.2 Relação pólen-óvulo.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>2.2.3 Viabilidade polínica.....</b>  | <b>22</b> |
| <b>2.2.4 Receptividade estigmática.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>2.3 Comportamento meiótico de <i>Passiflora</i>.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>3 Material e Métodos.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.1 Material vegetal.....</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.2 Fenologia do florescimento.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>3.3 Cruzamento controlado.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>3.3.1 Estudo da compatibilidade intraespecífica.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>3.3.1.1 Estimativa da taxa de autoincompatibilidade.....</b>                                     | <b>29</b> |
| <b>3.3.1.2 Classes de autoincompatibilidade.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>3.4 Relação pólen/óvulo (P/O).....</b>   | <b>29</b> |
| <b>3.5 Viabilidade polínica.....</b>  | <b>30</b> |
| <b>3.6 Receptividade estigmática.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>3.7 Comportamento meiótico.....</b>  | <b>31</b> |
| <b>4 Resultados e Discussão.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>4.1 Fenologia do florescimento.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>4.2 Cruzamentos controlados.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>4.3 Estimativa da taxa de autoincompatibilidade.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>4.4 Relação pólen/óvulo.....</b>   | <b>42</b> |
| <b>4.5 Viabilidade polínica.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>4.6 Receptividade estigmática.....</b>   | <b>47</b> |
| <b>4.7 Comportamento meiótico.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>5 Conclusões.....</b>  | <b>50</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO 3: GERMINAÇÃO E SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE <i>Passiflora trinitae</i> Sacco.....</b>     | <b>52</b> |
| <b>1 Introdução.....</b>  | <b>52</b> |
| <b>2 Referencial Teórico.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>2.1 Conservação de <i>Passiflora</i>.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>2.2 Testes de sementes de <i>Passiflora</i>.....</b>   | <b>56</b> |
| <b>2.3 Fatores influentes na germinação de sementes de <i>Passiflora</i>.....</b>                               | <b>58</b> |
| <b>3 Material e Métodos.....</b>  | <b>60</b> |
| <b>4 Resultados e Discussão.....</b>  | <b>61</b> |
| <b>5 Conclusões.....</b>  | <b>69</b> |
| <br>  |           |
| <b>CAPÍTULO 4: CRESCIMENTO <i>in vitro</i> EM <i>Passiflora trinitae</i> Sacco.....</b>                         | <b>70</b> |
| <b>1 Introdução.....</b>  | <b>70</b> |
| <b>2 Referencial Teórico.....</b>   | <b>71</b> |
| <b>3 Material e Métodos.....</b>  | <b>73</b> |
| <b>4 Resultados e Discussão.....</b>  | <b>74</b> |
| <b>5 Conclusões.....</b>  | <b>80</b> |
| <br>  |           |
| <b>CAPÍTULO 5: ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA POR MARCADORES ISSR EM <i>Passiflora trinitae</i> Sacco.....</b> | <b>81</b> |
| <b>1 Introdução.....</b>  | <b>81</b> |
| <b>2 Referencial Teórico.....</b>   | <b>82</b> |
| <b>3 Material e Métodos.....</b>  | <b>84</b> |
| <b>4 Resultados e Discussão.....</b>  | <b>86</b> |
| <b>5 Conclusões.....</b>  | <b>94</b> |
| <br>  |           |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>96</b> |

## CAPÍTULO 1

### 1 Introdução Geral

No Reino Plantae, encontra-se a divisão Magnoliophyta, que contém a classe Magnoliopsida, onde está a ordem Malpighiales, a qual pertence à família *Passifloraceae* (MILWARD-DE-AZEVEDO; BAUMGRATZ, 2004); esta, finalmente, abrange o gênero *Passiflora*. No Brasil, são 135 espécies desse gênero (BERNACCI e outros, 2013). Apenas uma espécie, *Passiflora edulis* Sims (maracujazeiro amarelo), ocupa aproximadamente 95% do mercado produtor de maracujá (MELETTI e outros, 2005a). Isso indica uso do gênero, quase exclusivamente, para produção de frutos. A variedade não condiz com a utilização ampla de *Passiflora*.

Por apresentar flores vistosas, o interesse pelo gênero com relação a essa característica pode aumentar. Devido ao elevado potencial ornamental da espécie (SOUZA; PEREIRA; VIEIRA, 2008), faz-se necessário mais estudos agrônômicos sobre a *Passiflora trintae* Sacco. A *P. trintae*, que ocorre naturalmente na Bahia, Brasil, é vulgarmente denominada de maracujazeiro vermelho; isso porque suas flores apresentam essa coloração forte e brilhante, razão pela qual se destaca no meio natural.

O conhecimento de uma espécie favorece sua conservação. Para que a diversidade genética das plantas seja observada, é importante fazer a caracterização para subsidiar estudos em programas de melhoramento (BORÉM; MIRANDA, 2009). O cultivo de *P. trintae* pode ser uma alternativa comercial e, ao mesmo tempo, levar a manutenção de áreas onde a espécie encontra-se.

A identificação de aspectos como número, período e horário de surgimento das flores, bem como de seus componentes férteis, através da análise da quantidade e viabilidade de grãos de pólen, relação pólen/óvulo e

receptividade dos estigmas, favorece a caracterização da espécie. A polinização, por exemplo, influencia na frutificação do maracujazeiro-amarelo, pois a quantidade de sementes está correlacionada com o número de grãos de pólen depositados sobre os estigmas (FRACASSO; SAZIMA, 2004); a relação pólen/óvulo é determinada para *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* em torno de 400 grãos de pólen por óvulo (OLIVEIRA; COLEMAN, 1996).

A busca pela identificação da microsporogênese e microgametogênese observadas em botões florais por meio da análise citogenética contribui para o sucesso de pesquisas que envolvem a técnica de cultura de anteras, em que um dos pontos de entrave é o estágio da microgametogênese, uma vez que, para a maioria das espécies, é necessária a manipulação da célula gamética uninucleada (ZHANG; LESPINASSE, 1992).

As formas de propagação, seja seminal ou por micropropagação *in vitro*, podem possibilitar a preservação de material cultivado. Contudo, geralmente, os problemas ocorridos no emprego de sementes de passifloráceas na produção de mudas pé-franco ou para porta-enxertos estão relacionados à heterogeneidade das mudas e à baixa porcentagem de germinação (MORLEY-BUNKER, 1980; RUGGIERO, 1998). Já a propagação vegetativa, via cultura de tecidos, apesar de acelerar as ações dos melhoristas que desejam viabilizar, para o mercado, produtos que possam ser mantidos por reprodução assexuada (OZAROWSKI; THIEMA, 2013), necessita do desenvolvimento de um protocolo para a espécie de interesse.

O uso de marcadores moleculares, como ISSR, auxilia na compreensão de informações genéticas através dos polimorfismos detectados nas amostras. A técnica de ISSR possui vantagens, como reprodutibilidade, fácil uso e baixo custo, em comparação com diversos outros tipos de marcadores moleculares (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo analisar os aspectos reprodutivos, a micropropagação *in vitro* e a diversidade genética por marcadores ISSR de maracujazeiro vermelho (*Passiflora trintae* Sacco).

## **CAPÍTULO 2**

### **BIOLOGIA FLORAL E COMPORTAMENTO MEIÓTICO DE *Passiflora trintae* Sacco**

#### **1 Introdução**

A família Passifloraceae possui distribuição tropical e subtropical e tem seu centro de diversidade na América do Sul. *Passiflora* L. (Passifloreae), o gênero mais diversificado da família, compreende mais de 525 espécies, classificadas em quatro subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora* L.

*Passiflora trintae* Sacco é uma das espécies nativas presentes em áreas de mata remanescente, como no município de Vitória da Conquista, localizado na região Sudoeste do estado da Bahia-BRASIL. Em razão das suas características florais, a espécie tem um alto potencial ornamental (SOUZA; PEREIRA; VIEIRA, 2008).

Os estudos da biologia da reprodução contribuem para a conservação e manejo sustentado das espécies (LENZI; ORTH; GUERRA, 2005) e interferem diretamente na escolha do método a ser utilizado nos programas de melhoramento genético. O fato de entender se a planta é autógama, alógama ou mista auxilia no manejo da espécie, já que diferentes práticas de polinização poderão ser adotadas.

A avaliação da viabilidade dos grãos de pólen, dentro da análise reprodutiva da planta, é importante para identificar possíveis problemas de esterilidade, uma vez que a viabilidade polínica relaciona-se diretamente com a normalidade durante a microsporogênese (RODRIGUEZ-RIANO; DAFNI, 2000) e, como consequência, quando irregular, leva à formação de grãos de pólen com ausência de citoplasma (grão de pólen vazio) e grãos de pólen contraídos. Normalmente, uma alta porcentagem de grãos de pólen viáveis



resulta de um alto percentual de tétrades normais e, conseqüentemente, indica que houve meiose regular.

Conhecer o período em que o estigma encontra-se receptivo ao grão de pólen também é fundamental para garantir o sucesso em todo e qualquer procedimento em que ocorra polinização artificial (BRUCKNER e outros, 1995). Além disso, quantificar o número de pólen por flor e estabelecer relação com as unidades de óvulo do ovário permite estimar o número de sementes que serão formadas. A maior parte das espécies perenes de plantas como *Erodium*, com características ornamentais, tem maiores índices de pólen/óvulo (P/O) do que espécies anuais do gênero, que são, muitas vezes, adaptadas a locais antropizados (CRUDEN, 1977).

Sendo assim, para entendimento dos aspectos citados, este trabalho teve como objetivo avaliar biologia floral e meiose de *P. trintae*.

## **2 Referencial Teórico**

### **2.1 Cultura do Maracujá e a *Passiflora trintae* Sacco**

A família Passifloraceae compreende 17 gêneros e mais de 650 espécies (BERNACCI e outros, 2013) distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta; a maior diversidade é encontrada na região neotropical (América) (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Passifloraceae engloba espécies trepadeiras, de herbáceas a arbustivas, e árvores lenhosas. Apresenta como principais características a presença de estípulas e gavinhas, folhas pecioladas alternadas; flores isoladas e axilares. As flores são bissexuais, pentâmeras, com alternância de pétalas (dialipétalas) e sépalas entre si, presença de filamentos de corona (CERVI, 1997; NUNES; QUEIROZ, 2006), androginóforo formado por gineceu e androceu e sementes ariladas (VANDERPLANK, 2000). A corona é usada para caracterização da

família, juntamente ao androginóforo, longo tubo floral de órgãos sexuais, femininos e masculinos, soldados e elevados (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

O gênero *Passiflora* é o mais importante da família, por possuir espécies que têm valor econômico e por apresentar maior diversidade de espécies, as quais possuem belas flores, de coloração intensa, (VANDERPLANK, 2000), número abundante de flores, florescimento mais de uma vez ao ano e diversidade no formato das folhas, bem como a presença da coroa (ABREU e outros, 2009), características estas que viabilizam o seu valor ornamental (ABREU e outros, 2009).

As passifloras podem ser cultivadas como ornamental na decoração de ambientes externos, como em cercas vivas, muros e pérgolas, ou de ambientes internos (PEIXOTO, 2005). A utilização das passifloras como plantas ornamentais teve início em 1625, na Europa, com o cultivo de *P. caerulea* e *P. incarnata*, em casa de vegetação (CERVI, 1997). A planta foi enviada para o velho mundo envolvida na aura mística criada pelos jesuítas, que a usavam para auxiliar na catequização dos índios como símbolo da Paixão de Cristo. As folhas trilobadas representariam as lanças dos soldados, e as 5 anteras eram símbolos das chagas de Cristo (PEIXOTO, 2005).

Várias são as possibilidades do uso das passifloras como plantas ornamentais. Elas podem ser cultivadas com efeito harmonioso entre vaso e planta, em ambientes sombreados, e associadas a uma poda cuidadosa (SOUZA, 2006). A produção de flores e plantas ornamentais no Nordeste do Brasil concentra-se, principalmente, nos estados de Pernambuco, Bahia, Ceará e Alagoas; ocupa áreas mais privilegiadas em termos climáticos e de oferta de água (BRAINER; OLIVEIRA, 2006) e abrange aproximadamente 1.766 produtores de flores e plantas ornamentais responsáveis por 180 ha (SOUZA, 2014).

As espécies silvestres e com potencial ornamental, que apresentam distribuição reduzida e/ou estão ameaçadas, merecem atenção especial, como *P. trintae*, que tem ocorrência restrita, encontrada no norte de Minas Gerais e no estado da Bahia (NUNES; QUEIROZ, 2001).

A espécie *P. trintae* foi descrita em 1966 por José da Costa Sacco, professor da Universidade Federal de Pelotas, depois de coleta realizada em Minas Gerais e na Bahia, onde ele prestou homenagem a Zomar Trinta, fazendo uso do nome desse botânico brasileiro para designar a espécie. Já em 1988, parecendo ignorar essa publicação, Linda Katherine Escobar, bióloga colombiana, descreveu a mesma espécie encontrada na Bahia, sob o nome de *Passiflora caatingae*, referente ao seu habitat (PASSIFLORA, 2004).

No Volume 14, da revista *Passiflora* (2004), especificamente na coluna Maracujás na Bahia, o suíço Reto Gamma e o alemão Axel Frank, especialistas em Passifloráceas, afirmam que a *Passiflora trintae* é uma planta vistosa que vale a pena ser cultivada. Ao contrário de outras espécies, também pode suportar longos períodos de déficit hídrico. Havia apenas duas plantas dessa espécie no local que visitaram, próximo a Vitória da Conquista, e alguns outros indivíduos, ao redor de locais em que buscas foram feitas.

## **2.2 Biologia floral de *Passiflora***

### **2.2.1 Sistema de reprodução**

O conhecimento acerca do sistema de reprodução das plantas possibilita que diferenciadas práticas de polinização sejam utilizadas (NUCCI; ALVES-JÚNIOR, 2017) e interfere na escolha do método de melhoramento a ser adotado (BORÉM; MIRANDA, 2009).

A estrutura de uma população autógena é caracterizada pela mistura de plantas homozigóticas, e a variedade melhorada é, às vezes, um simples genótipo que se reproduz fielmente. A cultura alógama pode ser comparada a

um *pool* de genes que se combinam de várias maneiras para formar diversos genótipos, geração após geração, pelos quais uma simples planta pode produzir muitos tipos de gameta que sempre se combinam ou, que, na maioria das vezes, associam-se com gametas de outras plantas (AMARAL e outros, 2005).

Nas passifloras, existem dois mecanismos principais que favorecem a alogamia: a deflexão dos estiletes (ENDRESS, 1994) e a autoincompatibilidade (LOSS e outros, 2006). A incompatibilidade em *Passiflora* já foi citada como gametofítica quando o grão de pólen carrega um alelo também presente no estigma e que inibe o desenvolvimento do tubo polínico.

Ao longo da antese, os filetes, antes eretos no botão, iniciam o movimento de curvatura para baixo, e ocorre também a movimentação das anteras, que ficam com face deiscente voltada em direção à corona e já com os grãos de pólen disponíveis (VARASSIN; SILVA, 1999). Essa movimentação de filetes pode acontecer em tempos diferentes ao deslocamento dos estiletes e favorecer, assim, a dicogamia funcional (VARASSIN; TRIGO; SAZIMA, 2001).

Para que ocorra o florescimento, o meristema caulinar vegetativo deve diferenciar-se em estruturas reprodutivas; nesse processo, diferentes sinais, indutores do florescimento (ambientais e fisiológicos), são detectados pelas folhas, produzindo estímulos florais no meristema apical ou induzindo diretamente o desenvolvimento dos primórdios florais (BOSS e outros, 2004).

É possível observar diferenças entre genitores, referente a parâmetros fenológicos do florescimento, como taxa, pico, intensidade relativa (%) e duração média de florescimento, número de flores/dia e precocidade de florescimento (ROZA e outros, 2005), dentre outros.

A maioria das espécies de *Passiflora* floresce abundantemente durante vários meses no ano. Os meses entre março e maio correspondem ao período de florescimento para *P. amethystina* e *P. suberosa*, enquanto que, para *P.*

*cincinnata*, é de março a dezembro (DUARTE e outros, 2009). Para o maracujá-amarelo, foi observada uma duração de nove meses de floração, de setembro a maio (BENEVIDES; GAGLIANONE; HOLFMANN, 2009). Em *P. setacea*, foi observado florescimento durante os meses de setembro a fevereiro; em *P. recurva* Mast., de agosto a dezembro; e, em *P. kermesina* Link., de fevereiro a novembro (NUNES; QUEIROZ, 2001).

Em muitas espécies, as flores permanecem abertas por um dia, como em *P. amethystina*, *P. suberosa*, *P. cincinnata* (DUARTE e outros, 2009); em outras, como *P. aurantia* G. Forster, *P. cinnabarina* Lindl, *P. herbertiana* Ker Gawle e *P. jorullensis* Kunthas, as flores permanecem abertas por até três dias (ULMER; MACDOUGAL, 2004). Os eventos fenológicos em *P. trintae* requerem maior conhecimento.

### **2.2.2 Relação pólen-óvulo**

O ovário de *Passiflora* é multiovulado, e seu número varia de espécie para espécie; em *P. coccinea*, o número de óvulo por flor encontrado fica em média de 437 (STORTI, 2002), enquanto que, para o maracujazeiro amarelo, uma média de 390 para as flores com três estigmas e 674,5 para as flores com quatro estigmas (SIQUEIRA e outros, 2009).

No maracujazeiro amarelo, o número de estigma polinizado (um, dois, três ou quatro) não interfere na formação de frutos. Pode interferir na qualidade de suas características, como números de semente, espessura da casca, peso e diâmetro do fruto, as quais estão correlacionadas ao maior número de óvulos da planta e ao recebimento do maior número de grãos de pólen, distribuídos de forma homogênea nos estigmas (SIQUEIRA e outros, 2009).

O estabelecimento da relação pólen/óvulo possibilita a estimativa da tendência reprodutiva das espécies, a qual é calculada a partir da estimativa do número médio de grãos de pólen por flor em relação ao número de óvulos por

flor, segundo parâmetro estabelecido por Cruden (1977), no qual se estipulam cinco classes distintas, quais sejam: cleistogamia (2,7-5,4), autogamia obrigatória (18,1-39,0), autogamia facultativa (31,9-396,0), xenogamia facultativa (244,7-2588,0) e xenogamia obrigatória (2108,0-195525,0), cujos valores refletem a eficiência da polinização. Segundo estimou Cruden, quanto mais eficiente a transferência de pólen, menor seria a razão pólen/óvulo (CRUDEN, 1977).

### ***2.2.3 Viabilidade polínica***

A busca de cultivares com características superiores é um dos princípios em programas de melhoramento genético; e um dos fatores responsáveis pelo sucesso desses programas é a seleção de genótipos, que serão utilizados em cruzamentos intra e interespecíficos. Dentre os vários fatores que influenciam diretamente na eficiência dos cruzamentos, está a viabilidade do grão de pólen (TECHIO; DAVID; PEREIRA, 2006).

A avaliação da viabilidade do grão de pólen pode ser feita usando-se os métodos de coloração, como o carmim acético, o método de Alexander (1980), o diacetato de fluoresceína, e o reagente de lugol. Os testes mais utilizados são a coloração com carmim acético e a coloração tripla de Alexander, as quais permitem observar, respectivamente, a integridade do grão de pólen e do núcleo e a integridade do citoplasma, da plasmalema e da parede celular.

O grão de pólen, na abertura da flor, necessita estar plenamente viável; geralmente, à medida que o tempo avança, a viabilidade do grão de pólen vai diminuindo e reduzindo sua eficiência na fertilização. Considerando-se que, em maracujazeiros, é comum a realização de polinização manual para uma boa produção de frutos, é de grande importância conhecer o período de viabilidade dos grãos de pólen, especialmente para utilizá-los em programas de hibridação (SOUZA; PEREIRA; MARTINS, 2002).

A viabilidade polínica é um fator importante para o melhoramento de plantas, pois, em espécies alógamas, cada grão de pólen leva consigo a carga genética consequente da heterozigose, o que faz com que essas plantas não transmitam para a próxima geração genótipos em que os genes estejam fixados ou em homozigose, mas sim o próprio gameta, tamanha a probabilidade de diferentes combinações entre os alelos. Considerando-se que a manifestação do genótipo de um indivíduo é o resultado da contribuição trazida pelos gametas masculino e feminino, quanto maior a viabilidade polínica, maior a possibilidade da formação de diferentes combinações entre alelos, e, em última análise, de variabilidade genética (SOUZA; PEREIRA; MARTINS, 2002).

A avaliação da viabilidade do pólen usado na polinização artificial e em experimentos de melhoramento genético é necessária (STONE; THOMSON; DENT-ACOSTA, 1995), assim como a compreensão dos problemas de esterilidade (RODRIGUEZ-RIANO; DAFNI, 2000), o que é, para qualquer espécie, como *P. trintaе*, não citada na literatura consultada, essencial para melhoristas e produtores de sementes (RIGAMOTO; TYAGI, 2002).

#### **2.2.4 Receptividade estigmática**

As flores podem apresentar estilete sem curvatura (SC), parcialmente curvo (PC) ou totalmente curvo (TC); em uma mesma planta, podem ser encontrados os três tipos (KILL e outros, 2010). A deflexão do estigma é utilizada para determinar o início da receptividade (FARIA; STEHMANN, 2010), porém foi verificado em *P. alata* que esse fenômeno independe da deflexão e pode estar receptivo com os estiletos flexionados ou não (VARASSIN; SILVA, 1999).

O conhecimento da receptividade estigmática permite programar o processo de polinização, em termos de tempo despendido e quantidade de pólen utilizado, uma vez que, devido à falta de informações sobre o período exato de

receptividade do estigma, as polinizações são feitas repetidas vezes, para assegurar produção de sementes (FREITAS; WOLOWSKY; SILIGIANO, 2010). Existem numerosas técnicas para estimar a receptividade do estigma (DAFNI, 1992; KEARNS; INOUE, 1993), uma delas é o uso de peróxido de hidrogênio, no qual ocorre a detecção da ação da peroxidase (OSBORN; KEVAN; LANE, 1998); este é um método simples e barato (MAUÉS; COUTURIER, 2002).

### **2.3 Comportamento meiótico de *Passiflora***

A caracterização citogenética contribui para diversas áreas da biologia vegetal e melhoramento de plantas, especialmente quanto à reprodução, e é um método eficiente para caracterização de germoplasma em pré- e pós-melhoramento genético (STEBBINS, 1971; MELO e outros, 2011). Além disso, pode auxiliar na conservação de recursos genéticos, quando, por exemplo, são identificados diferentes citótipos, cuja conservação é importante para a manutenção do *pool* gênico de determinado táxon (MELO e outros, 2011).

Existe, também, diferença de tamanho de grãos de pólen em várias espécies de *Passiflora*. A ocorrência de grãos de pólen muito grande está associada a irregularidades na segregação dos cromossomos durante a meiose; há nesse caso a formação de tríades ao invés de tétrades, como ocorre em *P. edmundoi* (SOUZA; PEREIRA; MARTINS, 2002).

A meiose é considerada o mais importante evento citogenético entre os processos de diferenciação dos organismos e é o principal responsável pelo sucesso evolutivo da reprodução sexuada em eucariotos (HOLLIDAY, 1984). Na meiose, são produzidas células haploides que permitem que, após a fecundação, o número de cromossomos permaneça igual ao dos pais. É durante a meiose que ocorre também a recombinação dos genes, evento de máxima



importância na adaptação das populações e evolução dos seres vivos (GUERRA, 1988).

Muitos dos genes relacionados à esterilidade têm ação pré-meiótica, pois podem induzir a formação de anteras sem pólen, enquanto outros têm ação pós-meiótica, ou seja, o pólen é formado, mas não se desenvolve (ALCOCHETE, 2005). Como pode ser constatado por Moraes (2007), o fenômeno da esterilidade masculina é dado por um complexo sistema de regulação gênica.

Palma-Silva e outros (2004) analisaram o comportamento meiótico e a viabilidade polínica de 15 espécies pertencentes à família Bromeliaceae. As taxas mostraram pareamento regular dos bivalentes, assim como segregação regular cromossômica durante a meiose, o que pode ser confirmado pelo elevado índice de viabilidade polínica (88%). Porém, univalentes na metáfase I, cromossomos extras e divisão precoce dos centrômeros em metáfase II também foram observados.

O estudo da estabilidade meiótica, juntamente com a análise da viabilidade do grão de pólen, permite indicar o potencial para cruzamentos da planta e, dessa maneira, fornece subsídios para usos futuros em programas de seleção, cruzamento e produção de sementes viáveis (VARGAS e outros, 2004).

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Material vegetal**

Os genótipos de *P. trintae* foram desenvolvidos em cultivo protegido (Figura 2.1A), construída com telado antiafídeo nas laterais e plástico transparente na cobertura, no campus da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, em Vitória da Conquista-BA (UESB), situada a 14°53' de latitude Sul, 40°48' de longitude Oeste e 870 m de altitude.



Britto, F. F., 2017

**Figura 2.1** - A) Cultivo protegido; B) Flor de *Passiflora trintae* Sacco. Vitória da Conquista-BA, 2017.

As sementes para produção dos genótipos foram retiradas de frutos maduros, em fevereiro de 2016, encontrados em plantas de áreas de mata, próximas ao campus Anísio Teixeira, da Universidade Federal da Bahia, em Vitória da Conquista. Os dados de georreferenciamento do local de coleta são 14°87' de latitude Sul, 40°81' de longitude Oeste e 867m de altitude. A semeadura ocorreu em bandejas de polietileno de 100 células, e, posteriormente, as plântulas foram transplantadas para vasos de plástico de 39,5 L. Os vasos foram preenchidos com solo (Tabela 2.1) e adubo de caprinos, numa proporção de 3:1, respectivamente.

A adubação química, depois da análise do solo, foi realizada 30 dias após a transferência para este, com 2,5 g ureia, 1,5 g cloreto de potássio e 14 g superfosfato simples, por vaso, e, a cada 30 dias, com 2,5 g ureia e 1,5 g cloreto de potássio. A irrigação foi realizada diariamente através de regador (5L), sendo dois por dia para todas as plantas. As pragas e doenças foram controladas através de catação e também com o uso de produtos acaricidas, inseticidas e nematicidas, como Vertimec®, Pirate® e Ortus®. Ripas de madeira de 1,0m foram fincadas no solo-adubo, de forma vertical, amarradas a barbantes, e estes, a arames dispostos horizontalmente, numa altura de 2,5m. Essa estrutura serviu de suporte na condução das plantas.

**Tabela 2.1** - Análise química do solo horizonte A peneirado (Classe Textural Franco Arenosa). Vitória da Conquista-BA, 2017.

| Iden. | pH                 | mg/dm <sup>3</sup> |      | *cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> de solo |                  |                 |     |    |      |   |   |
|-------|--------------------|--------------------|------|---|------------------|-----------------|-----|----|------|---|---|
|       | (H <sub>2</sub> O) | P                  | K    | Ca <sup>2+</sup>                            | Mg <sup>2+</sup> | Al <sup>3</sup> | H   | Na | S.B. | t | T |
|       | 5,2                | 5                  | 0,14 | 1,6   | 0,7              | 0,1             | 2,1 | -  | -    | - | - |
|       | -                  | -                  | -    | -   | -                | -               | -   | -  | -    | - | - |

### 3.2 Fenologia do florescimento

O número de flores foi registrado diariamente, coletado de 25 plantas, entre novembro e dezembro de 2016, para obtenção dos seguintes dados: a) tempo (em dias) de duração do surgimento do botão à abertura da flor; b) horário da abertura da flor; c) número de flores abertas por planta/dia durante seis semanas de cada genótipo.

Com base nesses dados, foram calculados (DAFNI, 1992):

. Taxa de florescimento (TF): percentagem cumulativa de flores na antese.

$$TF = \frac{n^{\circ} \text{ total flores}}{n^{\circ} \text{ dias}}$$

. Pico de florescimento: maior n° de flores alcançadas em um dia.

. Intensidade relativa de florescimento (%IRF): incremento percentual cumulativo de flores ao dia:

$$\%IRF = \frac{n^{\circ} \text{ de flores dia pico}}{n^{\circ} \text{ total flores}} : n^{\circ} \text{ repetições} \times 100$$

As taxas de florescimento dos 25 genótipos (tratamentos) durante as seis semanas (repetições) de observação foram submetidas à análise de variância e a teste de médias (Tukey,  $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas no programa estatístico ASSISTAT versão 7.6 beta (SILVA, 2004).

### **3.3 Cruzamentos controlados**

#### ***3.3.1 Estudo da compatibilidade intraespecífica***

Os estudos de compatibilidade intraespecífica foram realizados mediante estimativas da taxa de autoincompatibilidade. Para isso, foram realizadas polinização cruzada e autopolinização controladas, com os quatro genótipos em melhores condições fitossanitárias, identificadas pela coloração verde escura das folhas.

Para estimativa da autopolinização controlada, botões florais próximos à antese foram protegidos com sacos de papel um dia antes da abertura. As flores foram autopolinizadas com auxílio de haste flexível e protegidas novamente por sacos de papel, por 24h após a polinização.

Para estimativa da polinização cruzada controlada, as flores foram emasculadas antes do momento da abertura e protegidas com sacos de papel. Os estigmas foram polinizados com pool de pólen de planta diferente (polinização cruzada), e as flores foram novamente protegidas por 24h. Para os quatro genótipos utilizados, os dois tipos de polinização foram realizados, sendo cinco flores para cada tipo. Depois de polinizadas, foram identificadas por fitas coloridas, e, cinco dias após a polinização, foi verificada a taxa de pegamento (BRUCKNER; OTONI, 1999).

Os valores obtidos foram utilizados nas estimativas das taxas de autopolinização e autoincompatibilidade. Os dados referentes ao percentual de frutos vingados em relação ao número de flores polinizadas por tipo de polinização foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias (Tukey,  $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas no programa estatístico ASSITAT versão 7.6 beta (SILVA, 2004).

### **3.3.1.1 Estimativa da taxa de autoincompatibilidade**

Foi utilizado o Index to measure Self-Incompatibility (ISI), de acordo com Dafni (1992):

$$ISI = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de frutos provenientes de autopolinização}}{\text{N}^{\circ} \text{ de frutos de polinização cruzada}}$$

Os valores de ISI refletem as seguintes possibilidades:

- a)  $\geq 1$  autocompatível;
- b)  $\geq 0.2 < 1$  parcialmente autoincompatível;
- c)  $< 0.2$  quase autoincompatível;
- d) 0 completamente autoincompatível.

### **3.3.1.2 Classes de autoincompatibilidade**

A taxa de pegamento (número de frutos), após autopolinização artificial, foi utilizada para definir as classes de autoincompatibilidade (Dafni, 1992):

- a) autoincompatível = 0-3%, classe 0;
- b) levemente autocompatível = >3-30%, classe 1;
- c) altamente autocompatível = >30%, classe 2.

### **3.4 Relação pólen/óvulo (P/O)**

Para estimar a quantidade de grãos de pólen produzidos por flor, anteras de flores diferentes (n=5) foram coletadas e armazenadas em álcool a 70%, em volume de 1,5mL. Os grãos de pólen da antera foram liberados por meio de agitação da solução, e, posteriormente, com pipeta calibrada, retiraram-se 100 $\mu$ L, que foram depositados em lâmina de vidro. Após a evaporação do álcool, procedeu-se à contagem, por meio de microscópio ótico 40x,e, posteriormente, efetuou-se a proporção para o volume inicial (KEARNS;

INOUYE, 1993). Uma vez estimado o número de grãos por antera, este foi multiplicado por cinco para estimar o número de grãos produzidos por flor.

O número de óvulos foi quantificado em 20 ovários, em observações diretas feitas em microscópio ótico 10x. O delineamento experimental inteiramente casualizado foi utilizado, com quatro plantas, selecionadas, como tratamentos e cinco repetições, em um total de 20 flores analisadas. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias (Tukey,  $p < 0,05$ ), através do programa estatístico ASSISTAT versão 7.6 beta (SILVA, 2004). O resultado médio foi usado para realizar a classificação da estimativa reprodutiva, segundo Cruden (1977).

### **3.5 Viabilidade polínica**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com esquema fatorial 4x5, sendo quatro plantas, em melhores condições fitossanitárias, e cinco horários de coleta. O início das coletas ocorreu às 6h30min, e foram concluídas às 18h:30min, em um intervalo de três horas entre a retirada dos pólenes. Os botões florais foram protegidos na antese com sacos de papel, um dia antes da abertura das flores, e recobertos depois da coleta. Em cada horário de coleta, as anteras foram transferidas para frascos de vidro. Após a coleta, foram preparadas as lâminas, nas quais foram contados 300 grãos de pólen por horário e repetição (cinco flores por planta), totalizando 30000 grãos de pólen analisados. Estes foram classificados em normais/viáveis (corados) e anormais/inviáveis (não corados ou com citoplasma retraído), com base na reação de coloração de grãos de pólen em carmim acético (DAFNI, 1992). Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de médias (Tukey,  $p < 0,05$ ), e foi aplicado teste de regressão polinomial para verificar a interação entre os fatores por meio do programa estatístico ASSISTAT versão 7.6 beta (SILVA, 2004).

### **3.6 Receptividade estigmática**

Para os estudos de receptividade, foram utilizadas 10 flores de cada genótipo (4). O delineamento experimental, a análise de variância e o teste de médias foram os mesmos utilizados para a viabilidade polínica. O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi usado para indicar receptividade pela presença de peroxidase (OSBORN; KEVAN; LANE, 1998) através da formação de bolhas de ar (PEARSE, 1972). Nesse processo, botões florais em pré-antese foram protegidos com sacos de papel. No dia seguinte à proteção, após abertura das flores, os estigmas foram coletados nos respectivos horários, transferidos para vidros com a solução – teste e mantidos totalmente submersos no peróxido de hidrogênio. Os estigmas foram classificados em receptivos se o filete estigmático atingisse a cor preta e houvesse formação de bolhas. Para obter resultados confiáveis, estigmas danificados ou com pólen na superfície não foram utilizados, a fim de evitar resultado falso positivo.

### **3.7 Comportamento meiótico**

Quarenta botões florais, de diferentes tamanhos, foram coletados de quatro genótipos em melhores condições fitossanitárias da população e fixados em etanol-acético 3:1 por 24h; em seguida, foram estocados em congelador a 8°C, antes da preparação das quarenta lâminas (GUERRA; SOUZA 2002). Foram lavados em água destilada, duas vezes, por 5 minutos cada e, em seguida, hidrolizados em HCl 1N, por 5-10 minutos, à temperatura ambiente. No momento do preparo da lâmina, os comprimentos dos botões com brácteas e anteras a serem maceradas foram medidos com auxílio do paquímetro (mm). As anteras de cada botão foram maceradas sobre a lâmina em orceína acética a 2%, como coradas com Giemsa a 3%, e, posteriormente, montadas com Bálsamo do Canadá, a fim de fossem observadas através do microscópio ótico Coleman, para o registro da fase meiótica e de irregularidades.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1 Fenologia do florescimento

Em *P. trintae*, o tempo (em dias) desde a formação do botão à abertura da flor foi de aproximadamente 20 dias. Esse tempo foi igual ao encontrado por Lawinsky (2010) ao estudar *P. alata* e semelhante, no mesmo trabalho, ao se analisar *P. cincinnata*, que floresceu em 25 dias após o aparecimento de botão. As flores de *P. trintae* abriram-se a partir das 4h e permaneceram até às 23h, quando o processo de senescência floral caracterizou-se pelo murchamento das pétalas. Esse tempo de abertura floral difere-se da maioria das espécies de *Passiflora*, que, dificilmente, apresentam períodos acima de oito horas, horário em que, geralmente, ocorrem a antese e o fechamento das flores adaptadas aos momentos de atividade de polinizadores (COSTA; MÔRO; OLIVEIRA, 2009).

O florescimento do maracujazeiro-amarelo, *P. edulis* f. *flavicarpa*, inicia-se por volta do meio-dia e vai até o final da tarde. Já o florescimento do maracujazeiro-roxo, *P. edulis* Sims, pode iniciar-se mais cedo, pela manhã, com certa variabilidade no horário de abertura da flor (OLIVEIRA, 1987; MELETTI e outros, 1992, BRUCKNER e outros, 1995). Souza (2014) encontrou, em uma espécie potencialmente ornamental, a *P. subrotunda*, que o horário de abertura floral ocorria entre 8h e 19h. Percebe-se que a *P. trintae* destaca-se por permanecer com suas flores por mais tempo abertas, aspecto que favorece o uso destas em casas noturnas, restaurantes ou outros estabelecimentos de lazer. A antese, ao se prolongar no período noturno, também tende a atrair insetos visitantes, o que favorece sua polinização em seu ambiente natural de ocorrência (SAZIMA; SAZIMA, 1978).

Podem existir diferenças em horários de antese para uma mesma espécie atribuídas a diferentes condições climáticas, diferenças genéticas entre as plantas e à combinação de ambos os fatores (DUARTE, 1996)



A análise de variância indicou que os genótipos apresentaram diferença altamente significativa (1%) quanto às taxas de florescimento (Tabela 2.3) durante seis semanas, demonstração da variabilidade genética da espécie, uma vez que as plantas estavam no mesmo ambiente.

**Tabela 2.2** - Resumo da análise de variância das taxas de florescimento dos genótipos de *P. trinta*e durante seis semanas. Vitória da Conquista, 2017.

| FV        | GL  | SQ       | QM      | F        |
|-----------|-----|----------|---------|----------|
| Genótipos | 24  | 15.10453 | 0.62936 | 1.9679** |
| Resíduo   | 125 | 39.97617 | 031981  |          |
| Total     | 149 | 55.08070 |         |          |

Os parâmetros fenológicos estão apresentados na Tabela 2.4. O maior valor médio da taxa de florescimento foi de 1.51 no genótipo 08, e o menor foi de 0.35 no genótipo 69. O pico de florescimento variou de duas, nos genótipos 32, 46, 50, 66, 68 e 69, a seis flores, nos genótipos 04 e 52. Para a maioria das plantas, o pico ocorreu em dezembro. A intensidade relativa de florescimento variou de 0,24, no genótipo 63, a 2,5, no genótipo 52.

**Tabela 2.3** - Taxa de florescimento (TF), pico de florescimento (PF) e mês de ocorrência do pico de florescimento e intensidade relativa de florescimento (%IRF) dos genótipos *P. trinta*e Sacco. Vitória da Conquista-BA, 2017.

| Espécie            | Genótipo | TF <sup>1</sup> | PF | Mês (PF) | %IRF |
|--------------------|----------|-----------------|----|----------|------|
| <i>P. trinta</i> e | 01       | 0.80 b          | 3  | Dez.     | 0,37 |
|                    | 02       | 1.28 a          | 5  | Dez.     | 0,29 |
|                    | 04       | 1.04 a          | 6  | Nov.     | 0,56 |
|                    | 08       | 1.51 a          | 5  | Nov.     | 0,27 |
|                    | 16       | 0.80 b          | 4  | Dez.     | 0,53 |
|                    | 24       | 0.64 b          | 3  | Nov.     | 0,50 |
|                    | 25       | 0.63 b          | 4  | Dez.     | 0,51 |
|                    | 32       | 0.42 b          | 2  | Dez.     | 0,52 |
|                    | 35       | 0.61 b          | 3  | Dez.     | 0,67 |
|                    | 36       | 1.04 a          | 5  | Dez.     | 0,32 |

|    |        |   |      |      |
|----|--------|---|------|------|
| 39 | 0.87 b | 4 | Dez. | 0,34 |
| 46 | 0.44 b | 2 | Dez. | 0,55 |
| 47 | 0.56 b | 3 | Dez. | 0,56 |
| 50 | 0.37 b | 2 | Nov. | 0,89 |
| 52 | 0.47 b | 6 | Dez. | 2,50 |
| 55 | 0.75 b | 3 | Dez. | 0,30 |
| 57 | 0.80 b | 3 | Dez. | 0,32 |
| 58 | 0.78 b | 4 | Nov. | 0,48 |
| 63 | 0.87 b | 4 | Dez. | 0,24 |
| 65 | 1.06 a | 4 | Dez. | 0,25 |
| 66 | 0.54 b | 2 | Nov. | 0,39 |
| 67 | 1.49 a | 5 | Dez. | 0,33 |
| 68 | 0.44 b | 2 | Dez. | 0,58 |
| 69 | 0.35 b | 2 | Nov. | 0,95 |
| 74 | 0.68 b | 3 | Nov. | 0,39 |

Nov. novembro; Dez. dezembro.

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma coluna não se diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A taxa de florescimento indica o número médio de flores durante os dias analisados, e a intensidade relativa de florescimento, o incremento percentual de flores ao dia (DAFNI, 1992), e estes apresentaram um baixo número cumulativo de flores nos genótipos de *P. trintae*. Lawinsky (2010) encontrou valores entre 0,11 e 2,41 para TF e 1,75 e 12,5 para % IRF em plantas da espécie *P. alata*. Considerando-se que *P. alata* já sofre domesticação e que os genótipos de *P. trintae* podem ter apresentado aclimação à condição de casa de vegetação, esse resultado é condizente. Britto (2013) encontrou pico de florescimento máximo para *P. quadrangularis* de seis flores, número também observado neste trabalho. O florescimento equivalente a outras espécies já cultivadas indica atributos significativos de um potencial ornamental. Os frutos resultantes de polinizações

e fertilizações, que venham a ser bem sucedidas em dias de picos de florescimento, são uma recompensa adicional ao caráter ornamental da espécie.

Mais estudos devem ocorrer para entendimento dos estímulos ao florescimento em *P. trintae*. De modo geral, acredita-se que a floração tenha sinal promotor transmitido da folha para o meristema apical da gema, onde a flor aparece. As folhas formam o florígeno (substância hipotética), que se move para o ápice caulinar e induz à floração. Os genótipos deste trabalho produziam mais flores, verificadas pela contagem do número de folhas, quando a massa vegetativa era mais significativa. O florígeno transloca-se pelo floema, o caminho seguido pela maioria das substâncias orgânicas e macromoléculas móveis nas plantas. Com base no comportamento de floração de mutantes de *Arabidopsis thaliana*, conhecem-se vários genes envolvidos na produção de um promotor de floração. Esses genes incluem *GI* (*GIGANTEA*), *CO* (*CONSTANS*) e *FT* (*FLOWERING LOCUS1*), que atuam nessa sequência (EVERT; EICHHORN; RAVEN, 2014).

A proteína GI está envolvida no funcionamento do relógio circadiano, enquanto a expressão do gene *CO* é regulada pelo relógio, o qual, em Passifloras, acredita-se estar caracterizado pelo estímulo ao florescimento em dias longos que alcancem o fotoperíodo crítico. Assim, mutações nos componentes do relógio, como o gene *GI*, afetam a expressão do gene *CO*. A proteína CO é necessária para a indução da expressão de *FT*, e, por sua vez, o gene *FT* codifica a proteína pequena FT- que hoje é conhecida como o florígeno (EVERT; EICHHORN; RAVEN, 2014).

Em plantas jovens de *Arabidopsis*, os genes *CO* e *FT* são expressos em células companheiras do floema das nervuras pequenas das folhas-fontes (exportadoras). A proteína FT produzida nas células companheiras é transferida para os elementos de tubos crivados, sai da folha na corrente de assimilados e é transportada pelo floema até o meristema apical das gemas. No meristema

apical, a proteína FT forma um complexo com o fator de transcrição FD. O complexo FT-FD inicia a floração ao ativar genes de identidade do meristema floral, como *APETALA1* (que tem como ortólogo em *Passiflora*, o *PasAPI*) e outros promotores florais, como *SOCI* (*SUPPRESSOR OF EXPRESSION OF CONSTANS1*). Uma vez iniciada a floração no meristema apical das gemas de *Arabidopsis italiana*; o processo é irreversível (EVERT; EICHHORN, 2014).

#### 4.2 Cruzamentos controlados

O maior percentual médio de flores fertilizadas com consequente produção de frutos em *P. trintae* ao longo do período de abertura da flor foi de 53,33% para polinização cruzada controlada, seguida da autopolinização controlada, 6,66% (Tabela 2.5). Estes valores ficaram próximos daqueles obtidos por Souza (2014), a qual encontrou o percentual médio de 43,33% para polinização cruzada controlada e de 11,66% para autopolinização controlada em *P. subrotunda*.

**Tabela 2.4** - Percentual de flores fertilizadas resultante de dois tipos de polinização (autopolinização e polinização cruzada) controladas em genótipos de *P. trintae*, em cultivo protegido, Vitória da Conquista-BA, 2017.

|                    | Tipos de Polinização |                        |
|--------------------|----------------------|------------------------|
|                    | Autopolinização(%)   | Polinização Cruzada(%) |
| <sup>1</sup> Média | 6,66 b               | 53,33 a                |

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma linha não se diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Britto (2013) encontrou médias de 66,67% e 56,67% para polinizações cruzadas controladas em *P. cincinnata* e *P. quadrangularis*, respectivamente. Porém, para as autopolinizações, as duas espécies tiveram resultados nulos, os quais reforçam a autoincompatibilidade encontrada no gênero. Os genótipos de

*P. trintae* analisados neste trabalho tiveram autopolinizações gerando frutos, o que compromete a definição de autoincompatibilidade total dessa espécie.

#### **4.3 Estimativa da taxa de autocompatibilidade**

O índice de autoincompatibilidade (ISI) encontrado em *P. trintae* foi igual a 0,125, indicação de que essa espécie apresenta índices de autoincompatibilidade. Ela foi classificada como: quase autoincompatível, uma vez que foi menor que 0,2 (DAFNI, 1992).

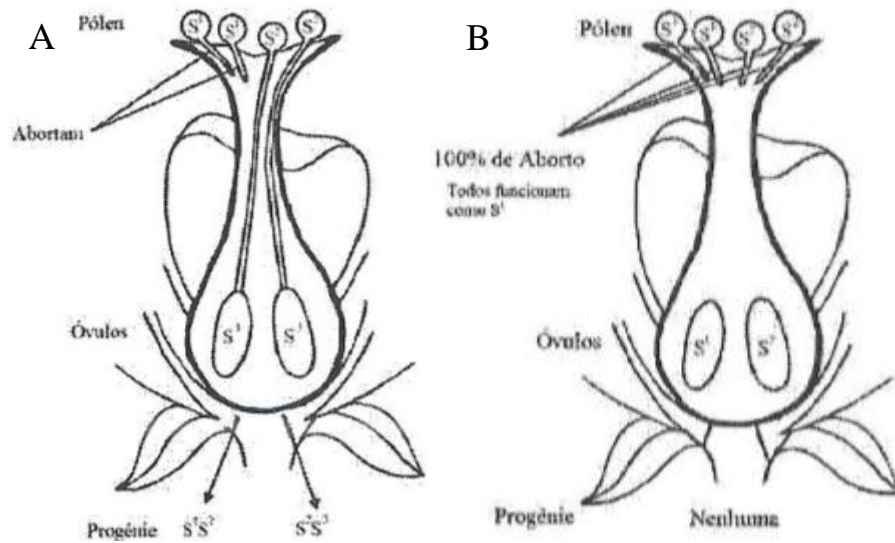
A taxa de fertilização após a autopolinização artificial foi de 6,66%, classificada, portanto, como levemente autocompatível, classe 1 (3-30%) (DAFNI, 1992). No trabalho de Souza (2014), a espécie *P. subrotunda* mostrou-se também ser levemente autocompatível, visto que foram obtidas flores fertilizadas por polinização cruzada controlada, assim como por autopolinização controlada, porém, nesta última, em menor percentual.

O baixo percentual de flores fecundadas por autopolinização com sucesso, tanto em *P. trintae* quanto em *P. subrotunda*, pode estar relacionado a alguma barreira à autofecundação, que condiciona a autoincompatibilidade. Desse modo, pode-se dizer que a *P. trintae* é, em parte, incapaz de produzir zigotos após a autopolinização; fato que resulta da redução na eficiência dos grãos de pólen da mesma planta de aderirem ou germinarem no estigma ou, também, na redução na eficiência dos tubos polínicos de penetrarem ou crescerem através do estilete (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002). Nesse caso, a autoincompatibilidade pode ser um mecanismo que favorece a alogamia, o que dificulta que plantas produtoras de gametas masculinos e femininos funcionais produzam sementes quando autopolinizadas (BRUCKNER e outros, 2005) e promovendo, dessa forma, a manutenção da variabilidade genética.

Nas Passifloras, a incompatibilidade já foi mencionada como gametofítica, quando o pólen carrega um alelo também presente no estigma e que inibe o desenvolvimento do tubo polínico (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNO, 2002), e, como esporofítica (HO; SHII, 1986) similar à anterior, porém determinada pelo genótipo da planta mãe do grão de pólen (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNO, 2002).

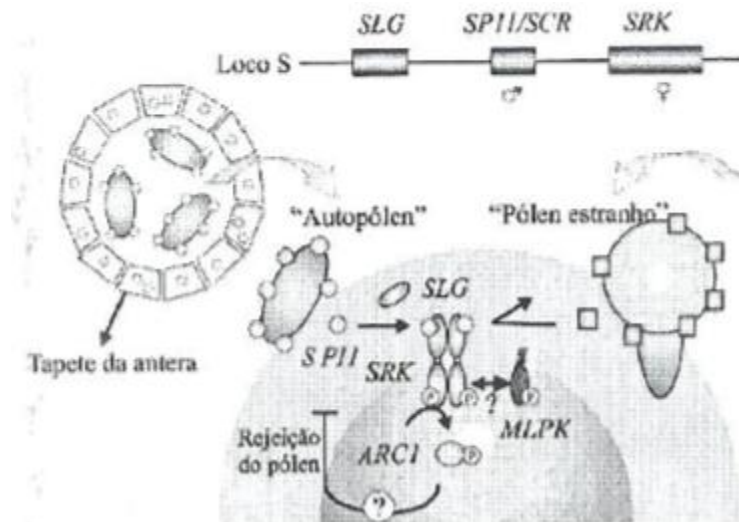
Cerca de metade das famílias das angiospermas hermafroditas – aproximadamente 150 famílias – representadas por mais de 3000 espécies, apresentam o fenômeno da autoincompatibilidade resultante do alelismo múltiplo/interação alélica por co-dominância ou dominância completa, e, entre elas, estão plantas de valor econômico como Rosáceas (ex. macieira), Bramáceas (ex. repolho), Fabáceas (ex. crotalária), Poáceas (ex. centeio), Esterculiáceas (ex. cacau), Solenáceas (ex. fumo) e, também, as Passifloráceas (RAMALHO e outros, 2012).

Faz-se necessário realizar mais pesquisas com *P. trintae*. Contudo, por meio de cruzamentos e análise do material hereditário de diversas famílias de plantas, sabe-se que a autoincompatibilidade é explicada, geneticamente, pela presença de uma série alélica. Os alelos dessa série são simbolizados pela letra S- self-incompatibility (Figura 2.2), que corresponde à auto-incompatibilidade, e são utilizados expoentes para identificar os diferentes alelos. A base molecular da incompatibilidade, em estudos já realizados, indica que cada alelo da série ( $S^1$ ,  $S^2$ ,  $S^3$ ,  $S^4$  ...) produz uma glicoproteína específica. Esta só é produzida nos tecidos da flor feminina, onde o pólen e o tubo polínico entram em contato, sendo quase a totalidade no estigma (RAMALHO e outros, 2012).



**Figura 2.2** - (A) Incompatibilidade gametofítica, cruzamento (macho)  $S^1S^2$  x  $S^1S^3$  (fêmea). (B) Incompatibilidade esporofítica, cruzamento (macho)  $S^1S^2$  x  $S^1S^3$  (fêmea). Vitória da Conquista-BA, 2017.

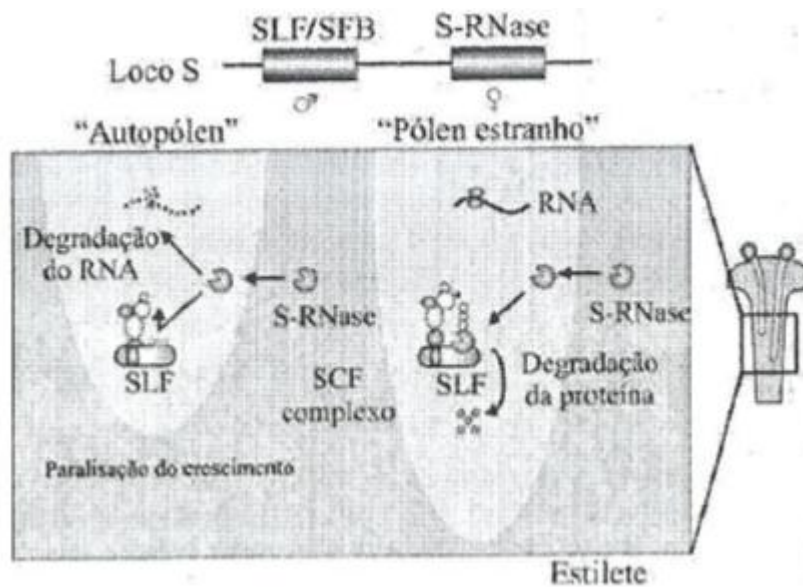
Na Brassicaceae, ocorrem de 30 a 50 alelos de autoincompatibilidade, e a rejeição do pólen dá-se pela falta de hidratação e a rápida paralização do crescimento do tubo polínico na superfície do estigma. O loco S consiste de três genes SLG, SRK e SP11. Os determinantes femininos são o SLG (glicoproteína do loco S) e a receptor kinase do loco S (SRK), que se localizam na membrana plasmática das células da papila do estigma. O determinante masculino é a proteína SP11, que se expressa predominantemente no tapete das anteras e se acumula na superfície do pólen durante a sua maturação. Na polinização, a SP11 penetra na parede celular da papila e se liga à SRK de forma específica. Essa ligação induz à autofosforilação da SRK e ativa uma cascata de sinais que resulta na rejeição do próprio pólen (Figura 2.3). A SLG não é essencial para o reconhecimento do pólen, mas aumenta a reação de autoincompatibilidade esporofítica em alguns genótipos (RAMALHO e outros, 2012).



**Figura 2.3** - Modelo molecular da autoincompatibilidade esporofítica em Cruciferae. Vitória da Conquista-BA, 2017.

Em Rosaceae, na autoincompatibilidade gametofítica, o loco S consiste de dois genes, S-RNase e SLF/SFB (Figura 2.4). O determinante feminino é a S-RNase, uma glicoproteína que é secretada em grandes quantidades na matriz extracelular do estigma. Na polinização, a S-RNase é absorvida pelo tubo polínico e funciona como uma citotoxina que degrada o RNA do pólen. Embora a S-RNase penetre no tubo polínico, independentemente de seu genótipo, a degradação do RNA ocorre somente no próprio pólen. A SLF/SFB é o determinante masculino e é membro de uma família de proteínas que, geralmente, funcionam como componentes de um complexo E3-ubiquitina ligase, que media a degradação de SRNases de diferentes genótipos, permitindo o crescimento do tubo polínico (RAMALHO e outros, 2012).



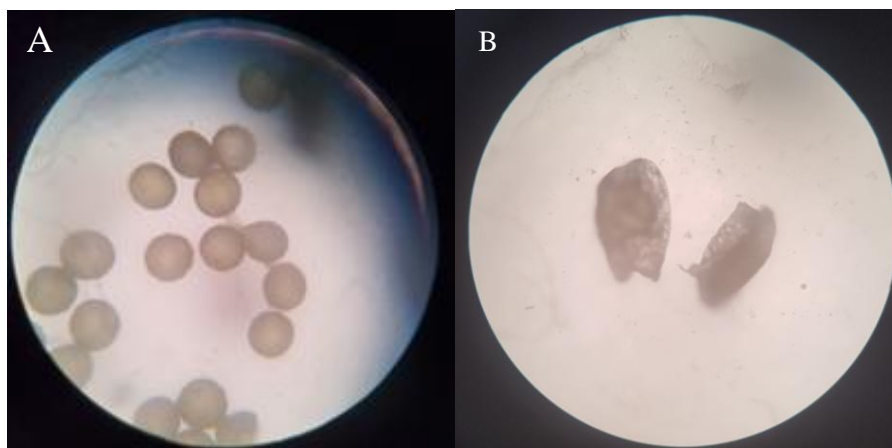


**Figura 2.4** - Modelo molecular da autoincompatibilidade gametofítica em Rosaceae. Vitória da Conquista-BA, 2017.

O conhecimento desse fenômeno é de grande importância. Em Passifloras, por exemplo, é comum ocorrerem genótipos incompatíveis, por isso há a necessidade de plantar indivíduos compatíveis para se conseguir a produção. É certo que, numa população de plantas, quanto maior o número de alelos da série, menor a possibilidade de ocorrerem cruzamentos incompatíveis e também falha na produção de sementes. O uso de fileiras alternadas com duas linhagens autofecundação artificial, na fase de botão floral, quando, provavelmente, ainda não se formou a glicoproteína no pistilo, e técnicas de cultura de tecidos (RAMALHO e outros, 2012) são alternativas para a autoincompatibilidade.

#### 4.4 Relação pólen/óvulo

O número médio de grãos de pólen (Figura 2.5A) por flor foi de  $9026 \pm 686$ , e não houve diferença entre os genótipos (Tabela 2.6). Quanto ao número de óvulos (Figura 2.5B), por ovário, o valor médio foi de  $110.6 \pm 21$ . Nesse caso, houve diferença, sendo que o genótipo 02 apresentou maior quantidade e, por isso, mais condições de originar mais sementes. Analisando a relação pólen/óvulo, nota-se que os genótipos não se distinguiram e a média foi igual a  $83.7 \pm 10.2$ . Diante desses números e de acordo com Cruden (1977), pode-se apontar a espécie *P. trintae* como autógama facultativa, apesar da estimativa da taxa de autoincompatibilidade (quase autoincompatível). Silva (2007) também, analisando uma planta hermafrodita, Alfavaca do campo (*Ocimum campechianum*), encontrou autogamia facultativa por meio da relação pólen/óvulo. Obteve relação média de 220:1 e informou que a planta poderia se reproduzir tanto por autofecundação quanto por fecundação cruzada.



Britto, F.F., 2017

**Figura 2.5** - (A) Grãos de pólen de *Passiflora trintae* Sacco; (B) Óvulos de *Passiflora trintae* Sacco. Vitória da Conquista-BA, 2017.

**Tabela 2.5** – Dados: nº de pólen por flor, nº de óvulos por ovário, relação pólen/óvulo de diferentes genótipos de *P. trintae*. Vitória da Conquista-BA, 2017.

| Genótipos | Nº de pólen por flor | Nº de óvulos por ovário | Relação pólen:óvulo |
|-----------|----------------------|-------------------------|---------------------|
| G02       | 10350 a              | 141,2 a                 | 74,97 a             |
| G18       | 8400 a               | 99,4 b                  | 86,91 a             |
| G27       | 8280 a               | 107,4 b                 | 76,30 a             |
| G73       | 9075 a               | 94,4 b                  | 96,94 a             |
| MEDIA     | 9026                 | 110,60                  | 83,70               |
| DMS(5%)   | 4894,19              | 28,98                   | 51,18               |
| CV(%)     | 29,94                | 14,47                   | 34,39               |

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma coluna não se diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A *P. trintae* tem entre 35 e 60 sementes em cada fruto, quantidade menor do que aquela encontrada em outras espécies de maracujá. A relação pólen/óvulo observada nesta pesquisa favorece a explicação desse número baixo de sementes. Nascimento e outros (2003), analisando frutos de maracujá amarelo, observaram em média 281 sementes, valor condizente com o número médio de óvulos ( $390.1 \pm 81.4$ ) por ovário, identificado por Siqueira e outros (2009) em *P. edulis* f. *flavicarpa*. Ainda, nesse último trabalho, o número médio de grãos de pólen por flor verificado foi de  $140595 \pm 34175$ , bem acima do encontrado em *P. trintae*.

Nas plantas com sementes, como Passifloraceae, o fenômeno sexual é um processo complexo, sujeito a situações aleatórias que atuam como agentes de pressão seletiva; estes conduzem a um espectro variado de processos fisiológicos e mecânicos, com o objetivo de uma maior eficiência para concretização da reprodução. A associação do pólen em polínias é um método que proporciona, durante a polinização, a chegada de abundantes grãos polínicos para abastecer a demanda equivalente de ginófitos; uma polinização por poucos grãos polínicos

pode fracassar o esforço reprodutivo (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Em razão de produzir menos pólen do que espécies do gênero, a *P. trinta* depende de maior número de pólen aderidos ao estigma para se alcançar sucesso na fecundação.

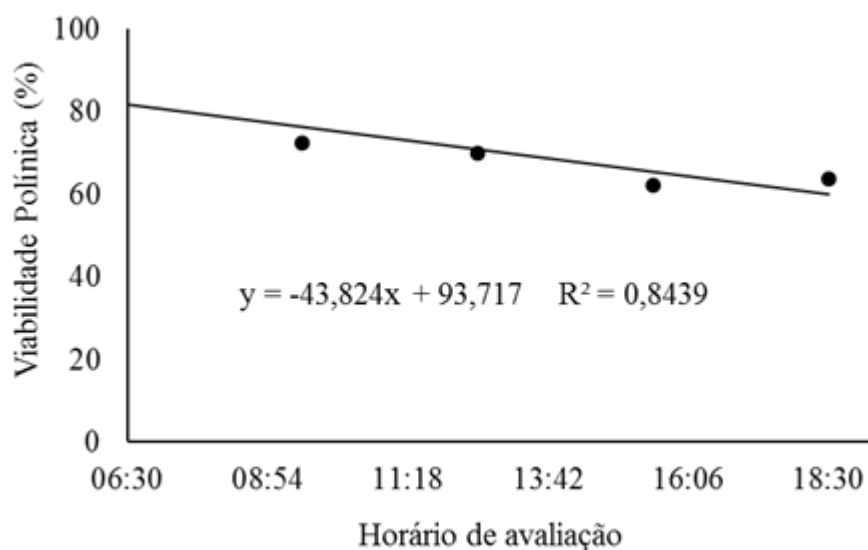
#### **4.5 Viabilidade polínica**

Observa-se que ocorreram interações significativas entre os genótipos e os horários para o parâmetro viabilidade polínica (Tabela 2.7), cujos menores valores foram encontrados no genótipo 02 e após as 9h, o que demonstra, nesse período do dia, em que houve baixas dos valores, ter ocorrido um efeito negativo com o aumento do horário (Figura 2.6). O resultado do genótipo 02 corrobora com o estudo feito por Souza, Pereira e Martins, Silva e Meletti (2002) com *P. edulis* f. *flavicarpa* e por Souza (2014) com *P. subrotunda* Mast, em que o horário de coleta também pode ter influenciado a viabilidade polínica, apresentando maiores valores médios percentuais no horário de abertura da flor. Essa informação deve ser levada em consideração por produtores, pois a baixa viabilidade de pólen reduz a formação de sementes. A inviabilidade polínica pode ser influenciada pelo ambiente, com a mudança da umidade, assim como ser ocasionada durante a androsporogênese, em que falhas no comportamento meiótico originam gametas com cromossomos desbalanceados ou anucleados (TWELL, 1995).

**Tabela 2.6** - Percentagem de viabilidade polínica de genótipos de *P. trinta* em diferentes horários. Vitória da Conquista-BA, 2017.

| Genótipos      | Horários |         |         |         |         |
|----------------|----------|---------|---------|---------|---------|
|                | 6:30     | 9:30    | 12:30   | 15:30   | 18:30   |
| G2             | 85,94aB  | 72,52bB | 70,02Bb | 62,34Bb | 63,64bB |
| G18            | 93,52aA  | 92,56aA | 91,04Aa | 91,20Aa | 89,10aA |
| G27            | 97,18aA  | 98,72aA | 98,12Aa | 97,80Aa | 96,88aA |
| G73            | 97,86aA  | 98,80aA | 98,36Aa | 97,22Aa | 96,20aA |
| F Genótipos(G) | 93,36**  |         |         |         |         |
| F Horários(H)  | 3,83**   |         |         |         |         |
| F G x H        | 2,31*    |         |         |         |         |
| CV(%)          | 7,36     |         |         |         |         |

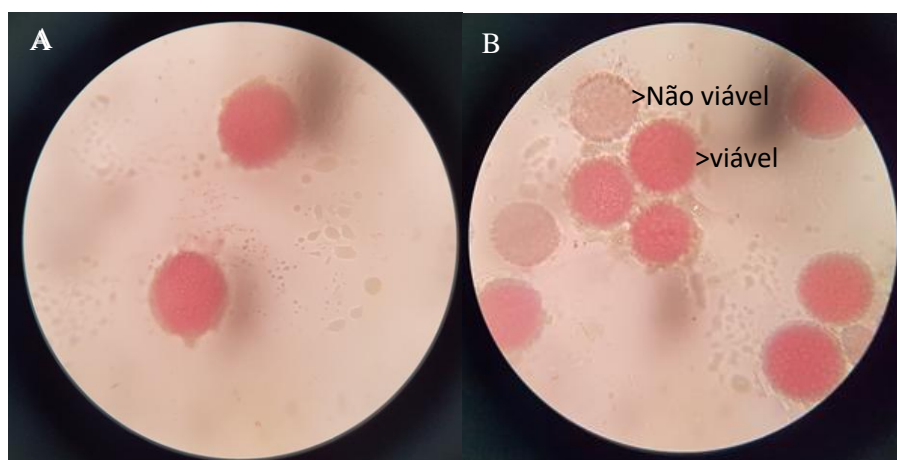
<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, dentro de cada fator, não e diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 1% e 5% de probabilidade.



**Figura 2.6** - Viabilidade polínica de G02 *P. trinta*. Vitória da Conquista-BA, 2017.

Entretanto, neste trabalho, os valores foram superiores a 70% (Tabela 2.7), percentual indicado por Souza, Pereira e Martins (2002) como alto para

maracujazeiros. Em *P. subrotunda*, no trabalho de Souza (2014), o percentual de grãos de pólen viáveis estimados foi alto, acima de 90%, utilizando-se a solução de Alexander, e chegando a 93%, com diacetato de fluoresceína. A conservação de uma espécie e os programas de melhoramento genético são enriquecidos com o conhecimento sobre a viabilidade polínica. Para iniciá-los, os melhoristas desejam alta viabilidade nas espécies de interesse, pois o pólen é o meio para transmitir às futuras progênes características que possam aprimorar ou, até mesmo, lançar novas cultivares (BRITO e outros, 2010).

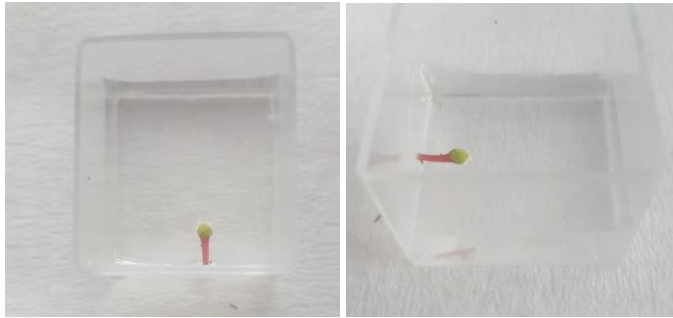


Britto, F.F., 2017

**Figura 2.7** - (A) Grãos de pólen viáveis de *P. trintae*; (B) Grãos de pólen viáveis e não viáveis de *P. trintae*. Vitória da Conquista-BA, 2017.

#### 4.6 Receptividade estigmática

Os estudos de receptividade apontaram que os genótipos analisados são receptivos nos diferentes horários investigados, sendo o comportamento semelhante das 6h30 às 18h30. Houve formação de bolhas de oxigênio (Figura 2.8), devido à reação da peroxidase, em atividade no estigma, com o peróxido de hidrogênio utilizado no teste, bem como o filete estigmático dos genótipos analisados atingiram cor preta, devido à oxidação de seus compostos orgânicos. Britto (2013) com *P. cincinnata* e *P. quadrangularis* e Lawinsky (2010) com *P. cincinnata* e *P. alata* obtiveram os mesmos resultados.



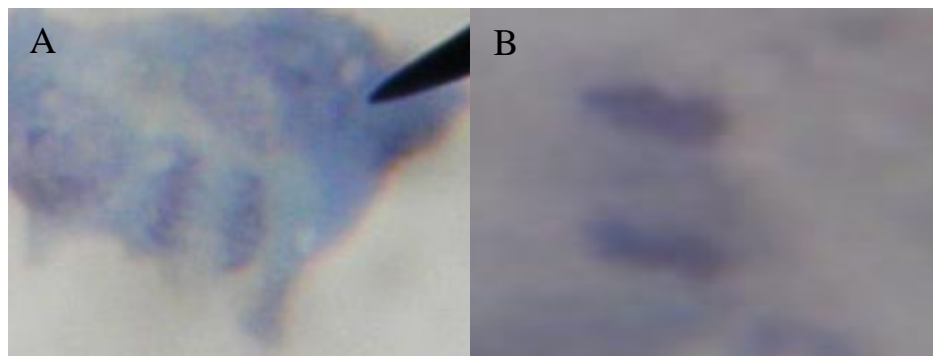
Britto, F. F., 2017

**Figura 2.8** - Estigma de *P. trintaе*, com bolhas, imerso em peróxido de hidrogênio. Vitória da Conquista-BA, 2017.

Duarte e outros (2009) relataram que, em *P. cincinnata*, durante a abertura da flor, o estigma já se encontrava receptivo. Também foi observado em *P. edulis* que a eficiência da polinização está associada às adaptações morfológicas das flores aos insetos visitantes e à sincronização temporal entre o horário de coleta dos polinizadores, abertura da flor e deflexão dos estiletes (SIQUEIRA e outros, 2009).

#### 4.7 Comportamento meiótico

Os genótipos de *P. trintae* apresentaram meioses regulares (96%) dentro da normalidade padrão (Figura 2.9). A média do tamanho dos botões florais analisados foi de 7,1mm, semelhante aos utilizados em *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener. (8mm) (SOUZA; PEREIRA; MARTINS, 2002) e em *P. quadrangularis* (6,4 mm) (BRITTO, 2013). Souza e outros (2017) observou nove pares cromossômicos nas células de *P. trintae*, confirmação de que a espécie é  $2n=18$ . Este número é encontrado em bivalentes neste trabalho. De acordo com Hansen e outros (2006), as espécies do subgênero *Passiflora* têm um número de cromossomos básicos representativo ( $x=9$  cromossomos). Embora as passifloras possam ser classificadas em quatro grupos cariológicos, representados por  $n=6$ ,  $n=9$ ,  $n=10$  e  $n=12$  (MELO; GUERRA, 2003), a maioria das espécies apresenta  $2n = 2x = 18$  cromossomos e são diploides.



Britto, F. F., 2017

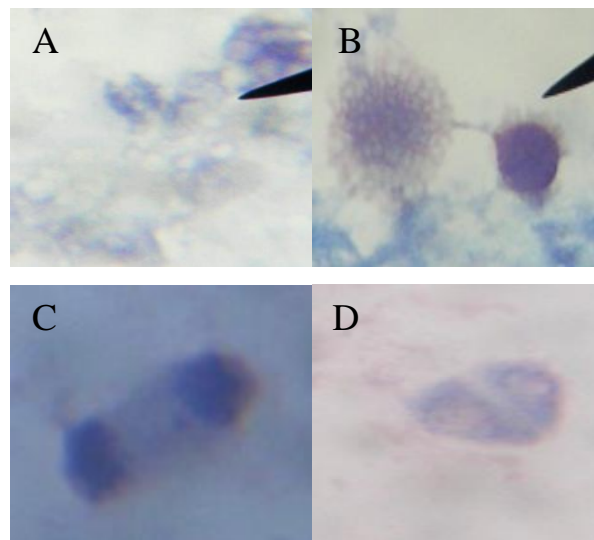
**Figura 2.9** - (A) Telófase I normal do G18; (B) Telófase I normal do G02. Vitória da Conquista-BA, 2017.

A fase meiótica mais observada foi a telófase I, que apresentou no genótipo G18 pontes cromossômicas (Figura 2.10). Também foram verificadas nesse mesmo genótipo pontes citoplasmáticas em grãos de pólen. Essas pontes representam a citomixia, migração de material celular por conexões, fenômeno



de origem diversa, como alteração fisiológica ou ação de agentes físico-químicos, com repercussão em desvios no número de cromossomos (SARVELA, 1958). Citomixia foi observada por Britto (2013) em *P. cincinnata* e *P. quadrangularis*, com redução da formação de pólen viáveis, efeito que não foi percebido neste trabalho.

O genótipo G02, que já havia apresentado regressão de viabilidade polínica ao longo de horários durante o dia, apresentou cromossomos soltos na telófase I, o que favorece microesporogêneses anormais. Gomes (1998) informou que presença de univalentes, bivalentes e alterações como cromossomos retardatários na placa metafásica ou cromossomos dispersos podem levar à formação de grãos de pólen imperfeitos. Registro de díades do genótipo 27 também foi constatado.



Britto, F. F., 2017

**Figura 2.10** - (A) Telófase I anormal do genótipo G18 com pontes cromossômicas; (B) Grão de pólen com ponte citoplasmática do genótipo G18; (C) Genótipo G2 em telófase I com cromossomo solto; (D) Díade de genótipo G27. Vitória da Conquista-BA, 2017.

As anormalidades da divisão meiótica mais comuns observadas em diversas espécies, e também em *P. trintae*, pelos cromossomos soltos, é a segregação cromossômica irregular, caracterizada pela migração precoce ou por cromossomos retardatários em metáfase I e anáfase I (PAGLIARINI, 2000). Segundo Picoli e outros (2003), as próprias condições de manejo das plantas podem alterar a meiose, visto que situações de estresse interferem no metabolismo dos indivíduos. Vírus e outros patógenos, temperatura elevada e poluição (HAROUN; SHEHRI; WADIE, 2004), além de erros aleatórios genéticos, são citados como causas de irregularidades meióticas.

Pelo fato de a espécie *P. trintae* não ser domesticada, era esperado que fosse apresentar um maior número de anomalias. Sendo assim, nota-se a importância da continuação de pesquisas sobre o uso da espécie para conservação dessa condição favorável a cruzamentos intra e interespecíficos.

Além da redução no conteúdo do DNA e das cromátides trocarem segmentos com suas homólogas, há ainda alguns fenômenos citogenéticos importantes na meiose, como a formação de quiasmas, o complexo sinaptonêmico e a formação de cromossomos plumosos (GUERRA, 1988). Embora citogeneticamente relevantes, esses fenômenos não são obrigatórios na meiose e podem ser mais investigados em *Passiflora*.

## **5 Conclusões**

Os genótipos estudados da espécie *P. trintae* apresentaram abertura floral às 4h e senescência às 23h. As plantas da espécie *P. trintae* apresentam-se quase autoincompatíveis quanto ao índice de autoincompatibilidade, levemente compatíveis quanto à classificação de autoincompatibilidade; e autógamas facultativas quanto à estimativa da tendência reprodutiva, sugerida pela relação pólen/óvulo. A viabilidade polínica superou 70%, e houve receptividade

estigmática ao longo do dia. Os genótipos de *P. trinta*e apresentaram meiose dentro da normalidade (96%).

### CAPÍTULO 3

## GERMINAÇÃO E SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE *Passiflora trintae* Sacco.

### 1 Introdução

O gênero *Passiflora* (Passifloraceae) é composto por plantas herbáceas e distribuído na região tropical. O Brasil, além de ser o maior centro de diversidade genética do gênero *Passiflora*, é também o maior centro de origem, com aproximadamente 135 espécies (BERNACCI e outros, 2013). Dos 17 gêneros aceitos atualmente para a família Passifloraceae, quatro deles ocorrem no Brasil: *Ancistrothrysus* Harms, *Mitostemma* Mast., *Dilkea* Mast. e *Passiflora* L. (CERVI e outros, 2012).

Devido à sua diversificada utilização e sua aceitação no mercado internacional e também por sua alta produtividade, a cultura do maracujazeiro ocupa importante lugar no setor agrícola. Cerca de 70 espécies produzem frutos que podem ser utilizados como alimento *in natura* ou na indústria alimentícia (COSTA; TUPINAMBA, 2005); essa cultura também é utilizada na indústria de cosméticos e para fins medicinais e ornamentais (MELETTI, 2011). No entanto, o cultivo do maracujazeiro destina-se principalmente à alimentação, por meio do seu uso como fruta fresca ou industrializada, na forma de sucos, sorvetes, doces, licores e geleias (MELETTI, 2011).

Atualmente, o valor ornamental das passifloras tem despertado interesse, principalmente pela beleza de suas flores e folhagens para utilização na ornamentação de interiores e jardins. A distinção das cores e formas das flores das passifloras atrai a atenção para um cenário em franca expansão do agronegócio de plantas ornamentais (ABREU e outros, 2009).

A espécie *Passiflora trintae* Sacco, popularmente conhecida como "maracujá vermelho", é nativa do Brasil e amplamente encontrada no Estado da

Bahia. Possui frutos pequenos e doces e um alto potencial ornamental devido às suas flores vistosas (SOUZA; PEREIRA; VIEIRA, 2008). Contudo, o conhecimento sobre o comportamento reprodutivo da espécie, especialmente seminal, não se encontra na literatura consultada.

Os maracujazeiros podem ser propagados por meio de sementes ou assexuadamente por meio de enxertia, estacas ou cultura de tecidos, porém a propagação por sementes é a mais utilizada (PANTANO, 2007). No entanto, as sementes da maioria das Passifloraceae têm baixa taxa de germinação, o que pode ser devido à existência de dormência (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; PANTANO, 2007); é necessária, portanto, a superação para a continuidade dos outros processos da germinação.

Para superar a dormência, fatores podem ser utilizados, inclusive combinados, como reguladores e temperatura. Zucarelli e outros (2009) concluíram que os reguladores vegetais GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina nas concentrações de 300, 400 e 500 mg.L<sup>-1</sup> são eficientes na superação da dormência das sementes de *P. cincinnata* Mast, bem como o uso de GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina na concentração de 400 mg.L<sup>-1</sup> amplia os limites de temperatura de germinação, e a temperatura alternada de 20-30°C é a mais adequada para a germinação de sementes de maracujá-do-mato.

A presença de reguladores vegetais contribui para o desenvolvimento da semente, devido à sua interferência na germinabilidade (BOTELHO; PEREZ, 2001). A temperatura apresenta, também, grande influência na germinação, atuando na porcentagem e na velocidade de 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 (BEWLEY; BLACK, 1994).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a germinação de sementes de *P. trintae* submetidas a diferentes combinações entre GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina e temperaturas.

## 2 Referencial Teórico

### 2.1 Conservação de *Passiflora*

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de maracujá, abrangendo em torno de 61 mil hectares de área colhida, com produção superior a 923 mil toneladas por ano (IBGE, 2016). A fruta é rica em vitamina C, cálcio e fósforo. São utilizados também na farmacologia, a exemplo de *P. alata*, que é citada na Farmacopeia Brasileira nas suas 1ª, 2ª e 3ª edições e é constituinte de diversos medicamentos fitoterápicos, como a maracujina, passiflorina e calmofilase, comercializadas no Brasil como calmantes (OLIVEIRA e outros, 1994). Entretanto, a maioria das espécies de *Passiflora*, entre elas a *P. trintae*, ainda não foi estudada quanto às suas diversas propriedades, porque não foi devidamente conservada *in situ* ou *ex situ*.

Programas de conservação *ex situ* podem ser beneficiados por modernas técnicas que permitam o estabelecimento de estratégias eficientes para conservação e uso do germoplasma de *Passiflora*. Uma alternativa para conservar a biodiversidade é estabelecer um plano de conservação que abranja os diversos níveis de conservação *in situ*, *ex situ* e *on farm* (CLEMENT e outros, 2007; PEREIRA; RIBEIRO, 2007; SCARIOT; SEVILHA, 2007).

O Brasil, sendo considerado o centro de diversidade das passifloras, possui um amplo banco genético *in vivo* do gênero, que pode servir de matéria-prima para programas de melhoramento. Para isso, é preciso que o germoplasma seja devidamente caracterizado, para que o pesquisador possa utilizar informações inerentes à planta (CROCHEMORE; MOLINARI; VIEIRA, 2003; MELETTI e outros, 2005a; MEDEIROS e outros, 2009). No entanto,

modificações de biomas por causas antrópicas têm causado erosão genética de diversas espécies vegetais, inclusive das passifloráceas; e algumas espécies, como *P. racemosa* e *P. malacophylla*, são consideradas em extinção (HERBÁRIO IAC, 2014). Grande parte do potencial genético encontrado dentro de *Passiflora* está sendo perdido (FERREIRA, 2005). Além de ser fonte de genes de importância agrônômica, espécies de *Passiflora* silvestres possuem outras tantas características interessantes, como longevidade e período de florescimento ampliado (MELETTI; SOARES-SCOTT; BERNACCI, 2005b; JUNQUEIRA e outros, 2005).

As *Passiflora* são potenciais plantas ornamentais pela reunião de fatores como: (i) flores com características excêntricas; (ii) capacidade de florescimento durante todo o ano; (iii) flores abundantes; e (iv) folhagens exuberantes (ABREU e outros, 2009).

Embora o Brasil possua uma grande variabilidade genética intra e interespecífica do gênero *Passiflora* (SOUZA, 2006), a utilização das espécies desse gênero como planta ornamental é praticamente inexistente; o que se vê, esporadicamente, na região Sudeste é a utilização da *P. alata* ou *P. edulis* em pérgulas ou cerca viva, e o uso de *P. alata* é substituído por *P. coccinea* e *P. cincinnata*, nas regiões Norte e Nordeste (PEIXOTO, 2005). Geralmente, os programas de melhoramento de *Passiflora* no Brasil visam a avaliar os índices de compatibilidade genética entre espécies e a obtenção de híbridos, voltando-se para melhorar a produtividade do maracujazeiro comercial, bem como a resistência a doenças e pragas (JUNQUEIRA e outros, 2005).

Contudo, o mercado de plantas ornamentais, uma alternativa atraente nos últimos anos, é extremamente dinâmico e demanda lançamento de novidades constantemente. O valor comercial de uma nova cultivar inclui não somente a beleza da planta como um todo, representada por boa coloração das flores e folhas, tamanho e número de flores e boa formação de folhas, mas

também vantagens culturais como facilidade de cultivo, tempo de desenvolvimento, durabilidade da flor, resistência às condições adversas e resistência às pragas e doenças (FILLIETTAZ, 2007).

Nos países da Europa e América do Norte, a utilização de *Passiflora* com fins ornamentais apresenta-se como um mercado em crescimento (VANDERPLANK, 2000); além disso, o público europeu e o anglosaxônico valorizam e demonstram interesse por espécies nativas (FISCHER e outros, 2007). Entretanto, apesar de ser o principal centro de diversidade de espécies de *Passiflora*, a utilização de passifloras no Brasil, com a finalidade exclusiva de ornamentação, é muito baixa (PEIXOTO, 2005).

## **2.2 Testes de sementes de *Passiflora***

Como a propagação do maracujazeiro é feita principalmente por sementes, torna-se interessante obter sementes que apresentem elevado potencial de germinação, ou seja, que apresentem germinação rápida e uniforme (RIBEIRO, 2016).

Para monitorar a qualidade das sementes obtidas nos cruzamentos testados nos programas de melhoramento genético, utiliza-se o teste de germinação. As Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009) recomendam, para fins de comercialização de lotes, que esse teste seja conduzido com 400 sementes; porém, para fins de pesquisa, o teste pode ser conduzido com amostras de 200 sementes, geralmente em quatro repetições de 50 sementes.

Em estudos, é variado o número de repetições e de sementes utilizados nos testes de germinação e emergência. Autores como Martins, Silva e Melletti (2005), estudando a qualidade das sementes sob armazenamento, utilizaram no trabalho quatro repetições com 50 sementes por unidade experimental; da mesma forma que, Alexandre e outros (2004), ao estudarem a germinação de



genótipos de maracujazeiro. Por outro lado, Lopes e outros (2007), avaliando a germinação em decorrência dos estádios de maturação dos frutos, utilizaram quatro repetições com 25 sementes, e Ferreira e outros (2007) estudaram o efeito das concentrações de bioestimulantes nas sementes e utilizaram cinco repetições de 24 sementes por parcela.

Todavia, devido à baixa produção de sementes por fruto, como observada em genótipos de *P. trintae*, contendo de 35 a 60 sementes, torna-se necessário reduzir o tamanho da amostra para realização do teste, alterando o número de sementes e/ou o número de repetições para a condução do teste de germinação. Essa taxa de produção de sementes pode estar relacionada à autoincompatibilidade; dessa forma, é necessária a diversidade genética de genótipos em relação à autoincompatibilidade para que a polinização seja mais eficiente e haja aumento na frutificação (BRUCKNER e outros, 2005, SUASSUNA e outros, 2003).

É importante destacar que as Regras para Análise de Sementes recomendam a condução do teste de germinação sob ausência de luz como tratamento indicado para a superação da dormência em diversas *Passiflora* (BRASIL, 2009). Foi observado efeito inibidor da luz sobre a germinação de sementes de *P. cincinata* (ZUCARELLI e outros, 2009) e *P. incarnata* (ZUCARELLI; HENRIQUE; ONO, 2015).

Em razão da propagação de *Passiflora* ser feita, de forma geral, por sementes, e das germinações serem baixas e desuniformes, isso cria uma dificuldade à formação de mudas, o que representa um problema enfrentado pelos produtores (SOUZA; MELETTI, 1997). Assim, é essencial conhecer os aspectos que afetem a germinação das sementes. Dentre esses, destacam-se os de origem genética (variação entre espécies e cultivares), de pré e pós-colheita (injúrias mecânicas durante a colheita, problemas fitossanitários, variações

climáticas, secagem, armazenamento), morfológicos, fisiológicos (dormência, maturidade, vigor), dentre outros.

### **2.3 Fatores influentes na germinação de sementes de *Passiflora***

A propagação do maracujazeiro pode ser sexuada ou vegetativa empregando-se estaquia, enxertia (RUGGIERO, 1998) e cultivo *in vitro* (GRATTAPAGLIA e outros, 1991). O método mais usual no estabelecimento de pomares comerciais ainda é o de mudas formadas de propagação sexual, devido ao menor custo de produção (LEONEL; PEDROSO, 2005), embora com elevada desuniformidade (BRUCKNER e outros, 1995).

O uso de reguladores vegetais tem sido preconizado nas diversas etapas da propagação de *Passiflora*, seja com o objetivo de aumentar a porcentagem e uniformidade de germinação das sementes (CONEGLIAN e outros, 2000; ROSSETTO e outros, 2000; FERREIRA, FOGAÇA, MORO, 2001; FOGAÇA, FERREIRA, BLOEDORN, 2001), seja o de promover o crescimento de plântulas pé-franco ou porta-enxerto (OLIVEIRA e outros, 2005). Cabe salientar que determinadas *Passiflora* são consideradas resistentes à fusariose (MENEZES e outros, 1994) e à morte prematura de plantas e são empregadas como porta-enxerto em enxertia tradicional, hipocotiledonar (RUGGIERO, 1998) e de mesa (SILVA e outros., 2005).

Os reguladores vegetais são utilizados de modo individualizado, em combinações entre si ou em misturas com outros compostos de natureza bioquímica, como aminoácidos, micronutrientes e vitaminas (CASTRO; VIEIRA, 2001). Têm influência sobre vários órgãos da planta, cujo efeito depende da espécie, do estágio de desenvolvimento, da concentração, da interação entre reguladores e de vários fatores ambientais (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As giberelinas são utilizadas principalmente para estimular a germinação, promover o alongamento de caule, aumentar o crescimento e a produção de partes aéreas das plantas (SHUKLA; FAROOQI, 1990; TAIZ; ZEIGER, 2004). As auxinas têm sua principal ação no alongamento celular e na indução da formação de frutos e raízes (DAVIES, 1995; TAIZ; ZEIGER, 2004). As citocininas são caracterizadas principalmente por induzirem a divisão celular (CROZIER e outros, 2001), atuarem na indução de brotação de gemas laterais e retardarem a senescência foliar (DAVIES, 1995).

Vários estudos demonstram a influência dos reguladores vegetais tanto na germinação de sementes como no desenvolvimento de espécies de certos tipos de maracujazeiros (OLIVEIRA e outros, 2005), mas existe carência de pesquisas referentes ao *P. trintae* com o uso desse fator de superação de dormência.

A temperatura, que tende a aumentar linearmente a velocidade de germinação, pelo menos, dentro de um limite definido, e diminuir sob temperaturas elevadas (ALVARADO; BRADFORD, 2002), não apresenta uso em teste feito com *P. trintae* na literatura consultada. Segundo Osipi e Nakagawa (2005), a temperatura tem grande influência na superação de dormência em sementes de *P. alata*. Temperaturas alternadas foram testadas nas sementes das espécies *P. giberti* (OLIVEIRA e outros, 1998), *P. alata* (OSIPI; NAKAGAWA, 2005) e *P. edulis* e *P. sativa* (BRASIL, 2009), favorecendo o processo germinativo.

Em sementes de maracujazeiro azedo, o teste é conduzido em germinador, sob temperaturas alternadas, 20°C por 16h e 30°C por 8h, ou à temperatura constante de 25°C, conforme instruções das RAS; sendo que, em sementes de *P. incarnata*, Zucarelli, Henrique e Ono (2015) verificaram maiores porcentagens de germinação em temperaturas alternadas de 20/30 °C.

O tratamento térmico influencia no total, na velocidade e na uniformidade de germinação, na velocidade de absorção da água e, portanto, nas reações bioquímicas que determinam todo o processo. Assim, a germinação só ocorrerá dentro de determinados limites de temperatura, os quais englobam uma temperatura, ou faixa de temperaturas, em que o processo ocorre com máxima eficiência. Por outro lado, um grande número de espécies apresenta reação germinativa favorável sob temperaturas semelhantes às que acontecem ao natural, em que as temperaturas diurnas são mais altas e as noturnas, menores. Algumas hipóteses tentam explicar as razões dessa resposta das sementes a temperaturas alternadas, mas nenhuma é totalmente satisfatória (CARVALHO; NAKAGAWA, 1988); tal fato demonstra a necessidade de mais experimentos, com plantas não testadas, como maracujazeiro vermelho, para mais conclusões.

### **3 Material e Métodos**

As sementes foram obtidas, em março 2017, de frutos maduros de plantas desenvolvidas em cultivo protegido do campus da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB, em Vitória da Conquista- BA. Após a extração das sementes, estas foram lavadas para a retirada da mucilagem e colocadas para secar em papel toalha à temperatura de 25° por 72h. Em seguida, as sementes foram armazenadas em geladeira a 5°C, durante três meses. Por ocasião da implantação dos experimentos, foi determinado o grau de umidade das sementes pelo método da estufa a 105°C±3 por 24 horas (Brasil, 2009); apresentou-se 8,73 % de água, condutividade elétrica de 157,07 ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) e peso de mil sementes de 14,03 g.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, seguindo o esquema fatorial 5 x 4 (concentração de reguladores vegetais x temperatura); foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes por parcela. Os tratamentos constituíram-se da combinação entre a testemunha (sementes

embebidas em água) e das concentrações de 200, 400, 600 e 800 mg.L<sup>-1</sup> de GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina e quatro temperaturas controladas por B.O.D (20±1°C, 25±1°C, 30±1°C e 20/30±1°C). Nos tratamentos com alternância de temperatura (20/30±1°C), foi utilizado um período de 16 horas para a primeira temperatura e oito horas para a segunda. As sementes permaneceram imersas nas soluções durante cinco horas, sob aeração constante. Como fonte de reguladores vegetais, foi utilizado o produto comercial Promalin®, composto por 1,8% de GA<sub>4+7</sub> e 1,8% N-(Fenilmetil)-1H-6-aminopurina.

Após a embebição, a semeadura foi realizada em placas de Petri, sobre duas folhas de papel germitest, umedecidas com água destilada na proporção de duas vezes e meia a massa do papel (BRASIL, 2009). As placas foram envolvidas em sacos plásticos e mantidas em câmaras de germinação. A primeira contagem de germinação foi realizada aos 14 dias após a instalação dos testes, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentaram emissão de radícula com aproximadamente 5mm de comprimento. Ao final de 28 dias, foram determinadas as porcentagens de germinação, sementes dormentes e mortas.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias, quando significativas, foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. E foi aplicado teste de regressão polinomial para verificar a interação entre os fatores, por meio do software estatístico Sisvar® versão 5.6 (FERREIRA, 2014).

#### **4 Resultados e Discussão**

Verifica-se, nas Tabelas 3.1A e 3.1B, que houve interação entre temperaturas e reguladores vegetais em todos os parâmetros avaliados, fato também observado por Zucarelli e outros (2009), ao avaliarem *P. cincinnata*

Mast. As sementes não tratadas com os reguladores apresentaram baixas médias na primeira contagem aos 14 dias e na porcentagem de germinação aos 28 dias.

Com a adição de reguladores, houve estímulo significativo à germinação, sobretudo à temperatura de  $20\pm 1^\circ\text{C}$ . Sementes tratadas com  $400\text{mg.L}^{-1}$  GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina e submetidas à temperatura de  $20\pm 1^\circ\text{C}$  apresentaram valores médios maiores. Esses resultados com relação aos hormônios estão de acordo com Botelho e Perez (2001), os quais relatam a interferência dos reguladores vegetais na germinação de sementes, quando estas são submetidas a condições adversas, como o estresse hídrico. A identificação de uma faixa de temperatura na germinação de sementes de maracujazeiro vermelho, obtidas neste trabalho, poderá facilitar a disponibilidade de mudas da espécie pelos produtores.

Sementes tratadas com  $400\text{ mg.L}^{-1}$  GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina e submetidas à temperatura alternada,  $20\text{-}30^\circ\text{C}$ , promoveram baixa germinação em *P. trintae*, mas apresentaram as maiores médias em *P. cincinnata* Mast. (ZUCARELLI e outros, 2009). O maracujazeiro vermelho difere-se de várias espécies de passifloráceas, que são favorecidas pela temperatura alternada na germinação, como *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener (SANTOS e outros, 1999), *P. giberti* N.E. Brown (DUARTE FILHO e outros, 2000) e *P. alata* Dryander (OPISI; NAKAGAWA, 2005).

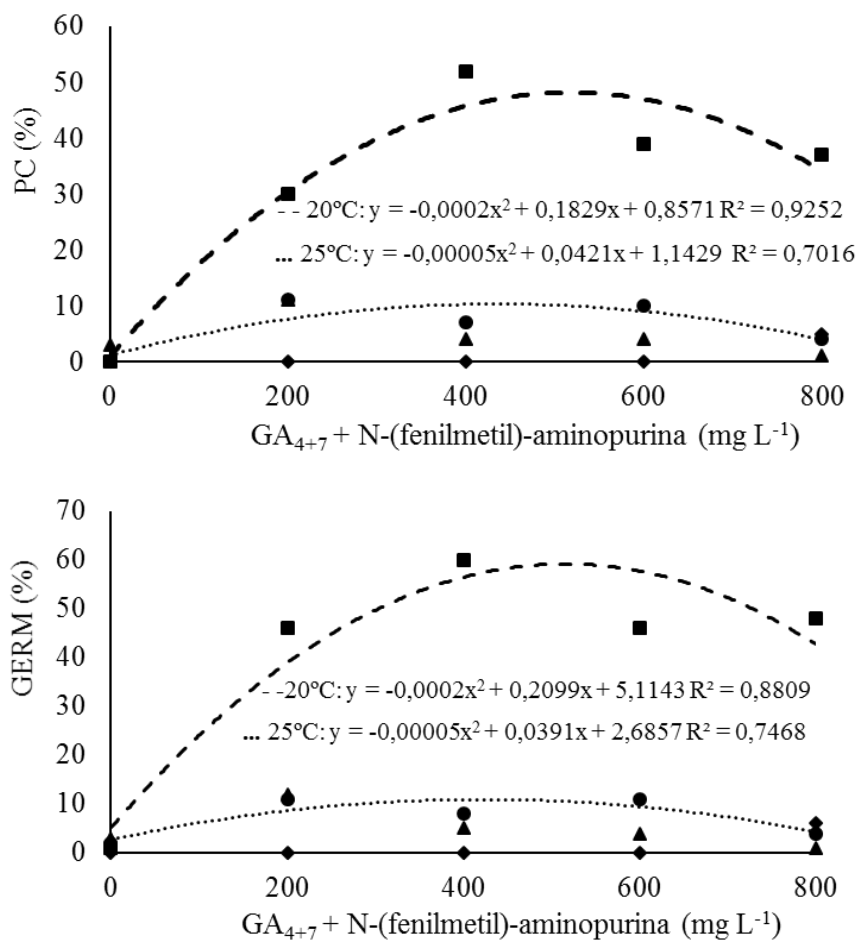
**Tabela 3.1** - A) Primeira contagem aos 14 dias (%) e B) porcentagem de germinação de semente de *P. trinta*e aos 28 dias em diferentes temperaturas e concentrações de GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina. Vitória da Conquista-BA, 2017.

| A)          |       | GA <sub>4+7</sub> + N-(fenilmetil)-aminopurina (mg.L <sup>-1</sup> ) |        |         |        |  |
|-------------|-------|--|--------|---------|--------|--|
| Temperatura | 0     | 200  | 400    | 600     | 800    |  |
| 20/30°C     | 3,0 a | 11,0 b   | 04,0 b | 04,0 b  | 01,0 b |  |
| 20°C        | 0,0 a | 30,0 a   | 52,0 a | 39,0 a  | 37,0 a |  |
| 25°C        | 0,0 a | 11,0 b   | 07,0 b | 10,0 b  | 04,0 b |  |
| 30°C        | 0,0 a | 00,0 c   | 00,0 b | 00,0 b  | 05,0 b |  |
| C.V. (%)    | 49,69 |  |        |         |        |  |
| B)          |       | GA <sub>4+7</sub> + N-(fenilmetil)-aminopurina (mg.L <sup>-1</sup> ) |        |         |        |  |
| Temperatura | 0     | 200  | 400    | 600     | 800    |  |
| 20/30°C     | 3,0 a | 12,0 b   | 05,0 b | 04,0 bc | 01,0 b |  |
| 20°C        | 1,0 a | 46,0 a   | 60,0 a | 46,0 a  | 48,0 a |  |
| 25°C        | 2,0 a | 11,0 b   | 08,0 b | 11,0 b  | 04,0 b |  |
| 30°C        | 0,0 a | 00,0 c   | 00,0 b | 00,0 c  | 06,0 b |  |
| CV (%)      | 40,87 |  |        |         |        |  |

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não se diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Ocorreu variação dos efeitos das dosagens de GA<sub>4+7</sub>+N- (Fenilmetil)-aminopurina na temperatura de 20°C, quanto ao percentual de sementes de *P. trinta*e germinadas na primeira contagem, aos 14 dias e quanto à porcentagem de germinação, aos 28 dias (Figura 3.1). A taxa mais alta para a primeira contagem, na equação, foi verificada quando a concentração de GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina variou entre 400 e 600mg.L<sup>-1</sup>, sendo possível observar em 457,25mg.L<sup>-1</sup> o máximo do percentual de sementes germinadas (42,67%) sugerido pela parábola. Já para a porcentagem de germinação, 60,18% é máximo

da equação, nas concentrações entre 400 e 600mgL<sup>-1</sup>(524,75mg.L<sup>-1</sup>) dos reguladores. Quanto à temperatura de 25±1°C, os picos foram de 10% para a primeira contagem e de 10,32% para a germinação, no intervalo de GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina entre 400 e 600mg.L<sup>-1</sup>(421mg.L<sup>-1</sup>) e 200 e 400mg.L<sup>-1</sup>(391mg.L<sup>-1</sup>), respectivamente.



**Figura 3.1** - Primeira contagem (PC) aos 14 dias de semeadura e porcentagem de germinação (GERM) de semente de *P. trinta*e submetidas a combinações entre GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina e temperaturas. Vitória da Conquista-BA, 2017.



Os resultados obtidos para a porcentagem de sementes dormentes (Tabela 3.2) corroboram os dados obtidos para a germinação, demonstrando a eficiência dos reguladores vegetais  $GA_{4+7}+N$ -(Fenilmetil)-aminopurina na superação da dormência das sementes, principalmente quando aplicada a dosagem de  $400\text{mg.L}^{-1}$ . Zucarelli e outros (2009) observaram que essa concentração do regulador diminuiu acentuadamente a porcentagem de sementes dormentes à medida que aumentavam a temperatura.

As maiores porcentagens de sementes mortas foram observadas em temperaturas mais elevadas, em todos os tratamentos. Possivelmente, os reguladores vegetais foram suficientes para a superação do processo de dormência, no entanto o uso de temperaturas mais elevadas para a espécie, ou alternadas que envolvam  $30^{\circ}\text{C}$ , causa a morte dos embriões. Essa temperatura também reduziu os percentuais de germinação deste trabalho. Esse fato pode estar relacionado à disponibilidade de oxigênio, pois os autores Come e Tissaoui (1973 apud CUNHA; CASALI, 1989), ao estudarem a germinação de sementes de maçã, demonstraram que, em temperaturas acima de  $25^{\circ}\text{C}$ , o oxigênio torna-se progressivamente menos solúvel em água e atinge o embrião em menores quantidades. As sementes submetidas à temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ , durante o teste, apresentaram incidência de fungos, o que corrobora com relatos de Ferraz Grande e Takaki (2006) de que sementes incubadas acima da temperatura máxima extravasam substâncias para o meio, o que possibilita o desenvolvimento de microorganismos, indicação de sua deterioração.

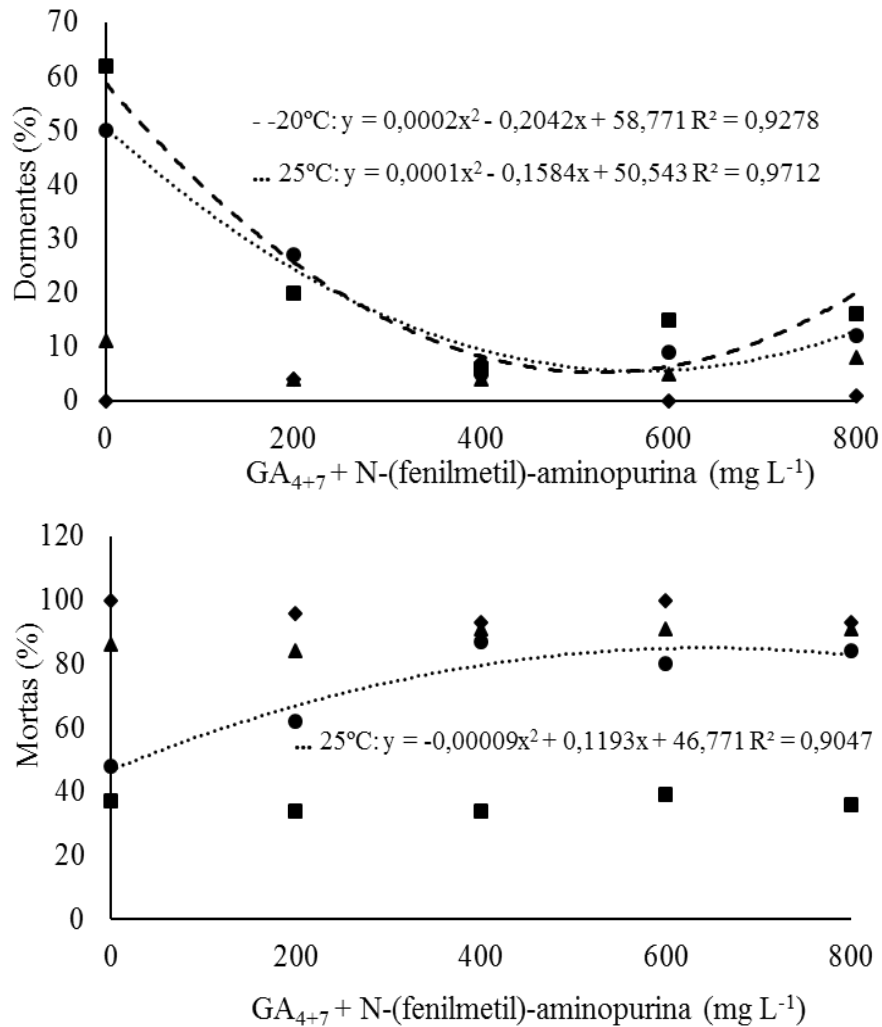
**Tabela 3.2** - A) Porcentagem de sementes dormentes e B) mortas de *P. trinta*e aos 28 dias da semeadura em diferentes temperaturas e concentrações de GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina e temperaturas. Vitória da Conquista-BA, 2017.

| A)          | GA <sub>4+7</sub> + N-(fenilmetil)-aminopurina (mg.L <sup>-1</sup> ) |        |        |          |         |
|-------------|--|--------|--------|----------|---------|
| Temperatura | 0  | 200    | 400    | 600      | 800     |
| 20/30°C     | 11,0 b   | 4,0 b  | 4,0 a  | 05,0 ab  | 08,0 ab |
| 20°C        | 62,0 a   | 20,0 a | 6,0 a  | 15,0 a   | 16,0 a  |
| 25°C        | 50,0 a   | 27,0 a | 5,0 a  | 09,0 ab  | 12,0 ab |
| 30°C        | 00,0 b   | 04,0 b | 7,0 a  | 00,0 b   | 01,0 b  |
| C.V. (%)    | 53,38  |        |        |          |         |
| B)          | GA <sub>4+7</sub> + N-(fenilmetil)-aminopurina (mg.L <sup>-1</sup> ) |        |        |          |         |
| Temperatura | 0  | 200    | 400    | 600      | 800     |
| 20/30°C     | 86,0 a   | 84,0 a | 91,0 a | 091,0 ab | 91,0 a  |
| 20°C        | 37,0 b   | 34,0 c | 34,0 b | 039,0 c  | 36,0 b  |
| 25°C        | 48,0 b   | 62,0 b | 87,0 a | 080,0 b  | 84,0 a  |
| 30°C        | 100,0 a  | 96,0 a | 93,0 a | 100,0 a  | 93,0 a  |
| CV (%)      | 12,04  |        |        |          |         |

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não se diferem entre si pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Evidencia-se que a superação da dormência das sementes de *P. trinta*e é influenciada significativamente pelas dosagens de GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina associadas às temperaturas de 20°C e 25°C (Figura 3.2), uma vez que houve variação no valor de sementes dormentes em função desses tratamentos. Constatou-se que, entre 400 e 600 mg.L<sup>-1</sup>, a porcentagem de sementes dormentes apresentou no vértice da parábola os menores valores, de 6,65% (em concentrações de 510,5 mg.L<sup>-1</sup>) para 20°C e 6,01% (em concentrações de 569,88 mg.L<sup>-1</sup>) para 25°C. Nota-se, também, que a

temperatura de 25°C está relacionada à variação da porcentagem de sementes mortas, na medida em que essa muda de acordo com a alteração da concentração de GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina, e ocorre, pela equação, a maior taxa (86,3%) entre 600 e 800 mg.L<sup>-1</sup>(662,77 mg.L<sup>-1</sup>).



**Figura 3.2** - Porcentagem de sementes dormentes e mortas de *P. trintaе* aos 28 dias da semeadura submetidas a combinações entre GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina e temperaturas. Vitória da Conquista-BA, 2017.

A dormência das sementes de *P. trinta*e parece apresentar um balanço desfavorável entre promotores e inibidores de germinação, pois as concentrações de GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina induziram o desenvolvimento do embrião. A temperatura ambiente (25°C) ou, principalmente, um pouco abaixo dela (20±1°C) oferece condições para ação dos reguladores. A composição do regulador (giberelina e citocinina) favorece o uso das reservas nutritivas presentes nas sementes, o que pode ter ocorrido nas sementes de *P. trinta*e.

Os fitormônios são promotores de mudanças celulares que levam ao desenvolvimento da planta. As citocininas são substâncias que promovem divisão celular, mas também têm efeito de alongamento. O aumento das células deve-se à entrada de água causada pelo decréscimo do potencial osmótico da célula, promovido pela conversão de lipídeos, mediada pela citocinina, em açúcares redutores. Aliado a esse fato, a citocinina tem relação com o aumento na extensibilidade mecânica da parede celular, afrouxando esta, que favorecerá a expansão celular e levará, em consequência, ao crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2009). Por ser uma espécie silvestre, encontrar concentrações de reguladores pode auxiliar no cultivo de *P. trinta*e.

Em outra frente, diversos genes que codificam fatores de transcrição e atuam especificamente no controle da germinação já foram identificados. Parte desses fatores atua como inibidores da germinação, e as giberelinas parecem promover a germinação suprimindo a ação de tais polipeptídeos. Vários transcritos “inibidores” da germinação (como o RGL2) desaparecem sob tratamento com giberelina exógena. Em contrapartida, foram identificados genes (CTS) ativados pelas giberelinas que atuam na promoção da germinação (FERREIRA; BORGHETTI, 2004). As giberelinas promovem síntese de enzimas envolvidas no enfraquecimento dos tegumentos (endo-B-mananases, expansivas) e/ou a hidrólise de reservas (amilases), eventos relacionados principalmente à protrusão de radícula. Esses processos indicam que as

giberelinas agem na quebra da dormência, promovendo progressão do alongamento embrionário por promoverem a síntese de enzimas envolvidas na mobilização de reservas (FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

São essas atividades bioquímicas, na medida adequada, associadas a condições térmicas favoráveis, que podem ter levado as sementes de *P. trinta*e a quebrarem sua dormência.

## **5 Conclusões**

Temperaturas e regulador vegetal (GA<sub>4+7</sub>+N-(Fenilmetil)-aminopurina) interagem na germinação de *P. trinta*e. Aos 20±1°C associados à concentração 400mg.L<sup>-1</sup>; as sementes apresentaram os maiores valores quanto às taxas de germinação. A temperatura de 30° C causa morte dos embriões.

## CAPÍTULO 4

### CRESCIMENTO *in vitro* EM *Passiflora trintae* Sacco

#### 1 Introdução

Os estudos de cultura de tecidos em *Passiflora* iniciaram-se no final da década de 60 com Nakayama analisando *P. caerulea* (NAKAYAMA, 1966) e se estende até os dias atuais, quando a aplicação da biotecnologia no melhoramento de espécies frutíferas tem sido crescente e com ampla possibilidade de aplicação. Contudo, a utilização de modernas técnicas biotecnológicas no melhoramento de plantas depende da existência de protocolos eficientes para a regeneração (OTONI, 1995; APPEZZATO-DA-GLÓRIA e outros, 2005; SILVA e outros, 2009).

A propagação de plantas *in vitro* do gênero *Passiflora* tem se mostrado viável para a produção comercial de plantas com características desejáveis. A cultura de tecidos vegetais é uma alternativa promissora de propagação do maracujazeiro devido à importância da cultura no país (OZAROWSKI; THIEMA, 2013).

Métodos de propagação *in vitro* são úteis em programas de melhoramento genético, pois possibilitam o suprimento constante e homogêneo de material vegetal com elevada qualidade, embora requeiram também métodos eficientes para a regeneração de plantas *in vitro* (YANG; ZHANG, 2010).

A organogênese *in vitro* é uma via de regeneração cuja célula e tecidos são induzidos a sofrer mudanças, que originam uma estrutura unipolar conhecida como primórdio caulinar (calogênese) ou de raiz (rizogênese), no qual o sistema vascular está frequentemente conectado ao tecido parental (THORPE, 1994).

Segundo Otoni e outros (2013), várias espécies de maracujá têm sido submetidas a sistemas de propagação *in vitro*, principalmente via organogênese,

por meio de uma grande variedade de condições de crescimento e tipos de explantes.

Com o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais, as plantas perdem parcialmente o autotrofismo e, conseqüentemente, necessitam de uma fonte exógena de carboidratos (FARIA e outros, 2006; PEREA; TIRADO, 2011). A sacarose é o açúcar mais comum encontrado na seiva do floema da maioria das plantas e, não por acaso, a principal fonte de carbono utilizada em culturas de tecidos (CID e outros, 2014), porém a glicose também pode ser utilizada.

Assim, neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono (sacarose e glicose) e das concentrações desses açúcares na propagação *in vitro* por organogênese de *P. trintae*.

## **2 Referencial Teórico**

As técnicas de cultura de tecidos vêm proporcionando maior disponibilidade de plantas de boa qualidade fitossanitária, sendo utilizadas em escala comercial para várias espécies de fruteiras. Monteiro-Hara (2000) revela a propagação clonal a partir de matrizes superiores, a micropropagação de porta-enxertos e limpeza fitossanitária de clones, como contribuições imediatas das técnicas de cultivo *in vitro* na cultura do maracujazeiro.

Em geral, o tipo de explante mais utilizado na micropropagação do maracujazeiro são os segmentos nodais (KANTHARAJAH; DODD, 1990; DREW, 1991; KAWATA e outros, 1995; FARIA; SEGURA 1997a) e ápices caulinares (FARIA; SEGURA, 1997b; JUNGHANS; VITAL; SOUZA, 2002). A grande vantagem desses tipos de explante é que, por envolverem órgãos meristemáticos pré-formados, propiciam uma maior estabilidade genética das plantas micropropagadas.

A regeneração de plantas *in vitro* a partir de outros tipos de explante, tais como cotilédone, disco foliar, hipocótilo, também pode ser utilizada para a

micropropagação, desde que a morfogênese ocorra por organogênese ou embriogênese somática de forma direta, ou seja, sem que ocorra a formação de calo, evitando-se assim a ocorrência de variantes somaclonais (FARIA, 2008).

Para o êxito do cultivo *in vitro*, devem ser levados em consideração os principais fatores que influenciam a expressão da morfogênese, tais como o tipo de explante, genótipo do material cultivado, meio de cultura e condições ambientais onde a cultura será mantida (FARIA, 2008).

As fontes carbônicas, como componente do meio de cultura, são indispensáveis para o crescimento celular *in vitro* (AIRES e outros, 2007). O tipo e a concentração dos carboidratos no meio de cultivo têm importante influência da morfogênese de tecidos vegetais. A sacarose (P.A.) é parcialmente hidrolisada em glicose e frutose na passagem pela autoclave. A presença desses compostos é essencial para o crescimento das plantas, visto que a fotossíntese da planta ou do explante é limitada (CID, 2014). Porém, glicose e frutose raramente são incluídas no meio de cultivo (CID, 2014); isso abre uma oportunidade para o estudo das concentrações e tipos de carboidratos que podem ser empregados para se obter um desenvolvimento satisfatório de plantas micropropagadas.

O estabelecimento *in vitro* de plantas consiste em introduzir os explantes no meio para início do desenvolvimento. Cada espécie ou variedade possui um protocolo adequado para o seu estabelecimento. (FARIA, 2008).

Esse protocolo é formado pelo conjunto de procedimentos biotecnológicos que envolvem o estabelecimento *in vitro*. Nele, deve constar o meio de cultura adequado com todas as concentrações de nutrientes (FARIA, 2008).

Esses protocolos poderão ser diferentes da espécie, variedade e tipo de explante usado. Portanto, devem estar disponíveis na literatura protocolos de assepsia para explantes obtidos para germinação de sementes das diversas espécies, protocolos de regeneração *de novo* de plantas a partir de cotilédones,



hipocótilos, folhas e de segmentos intermodais e desenvolvimento de plantas a partir de ápices meristemáticos e gemas (FARIA, 2008).

Para a micropropagação de *Musa paradisiaca* L., Folliot e Marchal (1993) constataram que a substituição da frutose por sacarose e o aumento da concentração de 40 para 80 g.L<sup>-1</sup> favoreceram o crescimento. Romano, Noronha e Martins-Loucao (1995) verificaram que o requerimento de carboidratos durante o processo de micropropagação dependeu da fase do cultivo, em que a sacarose (30 g.L<sup>-1</sup>) e a glicose (40 g.L<sup>-1</sup>) foram as melhores fontes de carbono, respectivamente, durante a fase de proliferação e a de enraizamento de *Quercus suber* L.

O estabelecimento de maracujá *in vitro* pode ser um grande aliado do melhoramento genético de plantas, devido à sua importância na produção de clones superiores e ao aproveitamento da variação somaclonal, além da produção de plantas saudáveis em larga escala. Os explantes vegetativos podem ser obtidos no campo ou em casa de vegetação (FARIA, 2008).

### **3 Material e Métodos**

O experimento foi conduzido, em abril e maio de 2017, nos Laboratórios de Botânica da Universidade Federal da Bahia (UFBA)/Campus Anísio Teixeira, em Vitória da Conquista- BA, e de Fisiologia Vegetal da UESB. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, seguindo o esquema fatorial 2 x 4 (fonte de carboidrato x concentração de carboidrato) e sendo utilizadas cinco repetições por tratamento, constituídas de um frasco com quatro explantes. Os tratamentos constituíram-se pelas fontes de carboidratos (glicose e sacarose) com as concentrações (0, 15, 30, 45g.L<sup>-1</sup>).

Utilizaram-se como explantes segmentos caulinares com uma gema, sendo dois entrenós, obtidos de plântulas de 10 cm, de maracujazeiro vermelho (*P. trintae*), desenvolvidas em cultivo protegido na Universidade Estadual do

Sudoeste da Bahia. A desinfestação dos explantes foi realizada com solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) com 1 gota de tween 20 para auxiliar na remoção das impurezas. Em seguida, os explantes foram submetidos a três enxagues com água destilada e autoclavada. Todo o processo foi conduzido em câmara de fluxo laminar.

Os explantes foram inoculados em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionados de 100 mg.L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BAP (Benzilaminopurina). O pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,8 antes da inclusão do ágar na concentração de 7 g.L<sup>-1</sup> e, posteriormente, autoclavado a 121°C e 1,5 atm por 20 minutos.

Foram utilizados frascos de vidro com capacidade para 200 mL, com 30 mL de meio de cultura por frasco. Os frascos foram fechados com filme de PVC transparente e, após a inoculação, permaneceram em BOD com temperatura constante de 25 ± 1°C e luminosidade artificial de lâmpadas fluorescentes brancas frias, com fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons de 27 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (CID, 2014).

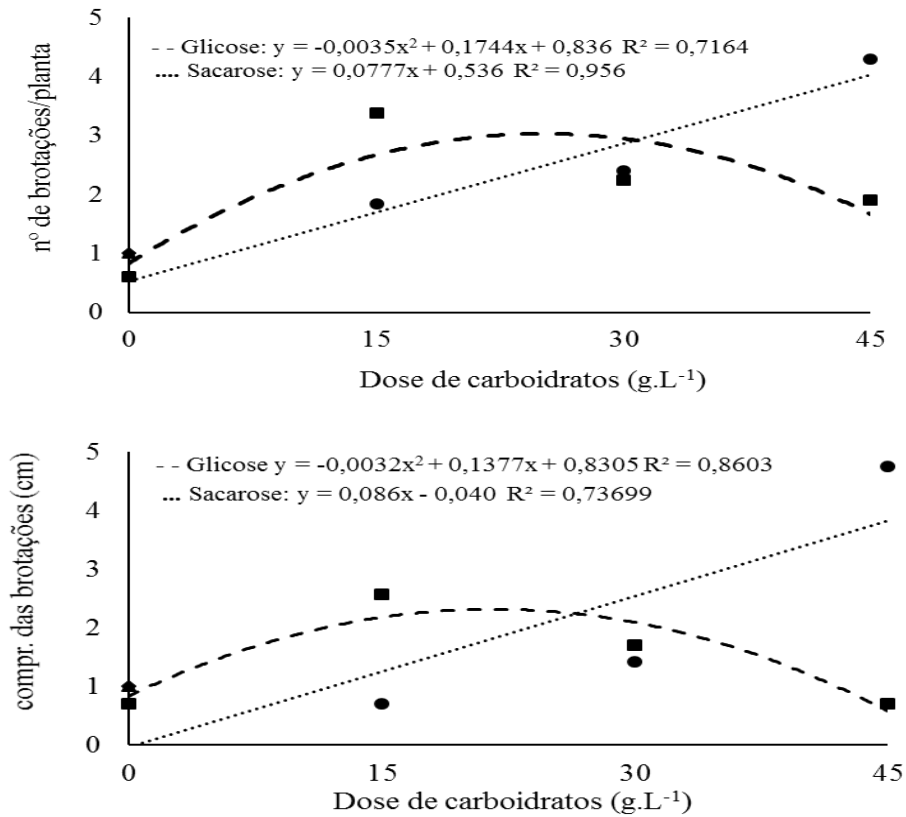
Aos 60 dias de cultivo, foi avaliado o número médio medido por paquímetro digital de brotações, comprimento médio das brotações (cm), número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz (cm), como realizado por CID (2014).

Os dados foram submetidos à análise de variância, e foi aplicado teste de regressão polinomial para as doses de carboidratos utilizando-se o programa estatístico ASSISTAT versão 7.6 beta (SILVA, 2004).

#### **4 Resultados e Discussão**

Observou-se diferença significativa para as diferentes fontes de carbono e suas dosagens na propagação *in vitro* de plantas de maracujazeiro vermelho (Figura 4.1). Para a variável número médio de brotações, a adição de sacarose na

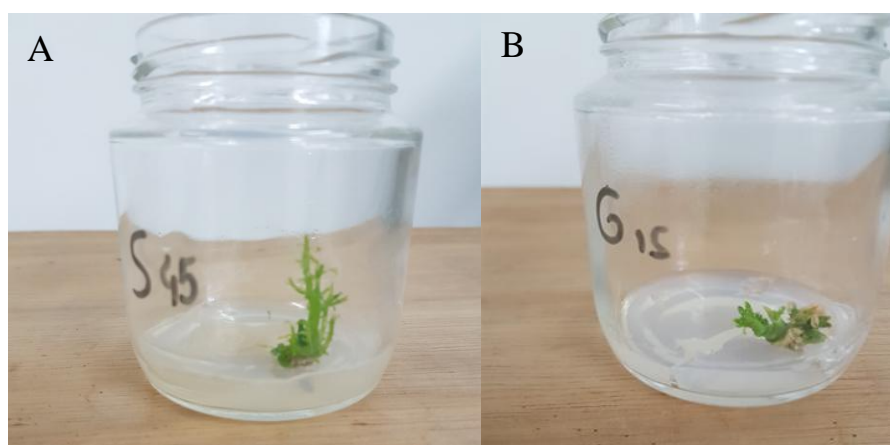
dosagem de  $45 \text{ g.L}^{-1}$  obteve as maiores médias, promovendo a formação de 4,03 brotações. A glicose, que é fonte de energia, na concentração  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , alcançou os maiores valores com, aproximadamente, 3 brotações. Copatti, Costa e Mello-Farias (2016) encontraram a concentração de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose para a maior produção de brotações em *P. edulis*. Nicoloso e outros (2003) verificaram que, tanto na metade da dose ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ) como na usualmente recomendada ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ), a sacarose promoveu o menor número de brotações, o que não ocorreu com *P. trintaë* com relação a essa última concentração. Segundo Grattapaglia e Machado (1998), a sacarose é a fonte de carbono mais utilizada nos protocolos de cultivo *in vitro* e considerada a melhor fonte para a diferenciação celular e o desenvolvimento de plantas cultivadas *in vitro*. Pela figura 4.1, observa-se que o número médio de brotações cresce com o aumento das concentrações de sacarose, já com a glicose, atinge um ponto máximo e, depois, decresce.



**Figura 4.1** - Número e comprimento de brotações de explantes de *P. trintae* submetidos a diferentes concentrações de glicose e sacarose (g.L<sup>-1</sup>). Vitória da Conquista-BA, 2017.

O comprimento das brotações foi mais influenciado pela adição da sacarose na concentração de 45 g.L<sup>-1</sup>, promoveu crescimento médio das brotações de 3,83cm e de glicose na concentração 15 g.L<sup>-1</sup> (Figura 4.2) e formou brotações em valores para essa fonte de carboidrato de 2,17cm, acompanhando o resultado referente ao número médio de brotações. Nicoloso e outros (2003), estudando ginseng brasileiro, verificaram que a altura média das brotações foi maior quando a sacarose foi a fonte de carbono utilizada nas concentrações de 30, 45 e 60 g.L<sup>-1</sup>. Faria e outros (2006) observaram que os meios de cultura

suplementados com 15 e 30 gL<sup>-1</sup> de sacarose, combinados com 10 e 20 gL<sup>-1</sup> de sorbitol, proporcionaram maiores comprimentos das brotações, a maior média encontrada na combinação de 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose com 10 g.L<sup>-1</sup> de sorbitol. Segundo os autores, esses dados indicam que a presença da sacarose no meio de cultivo foi fundamental para manter o desenvolvimento das plantas, fato também observado neste trabalho.

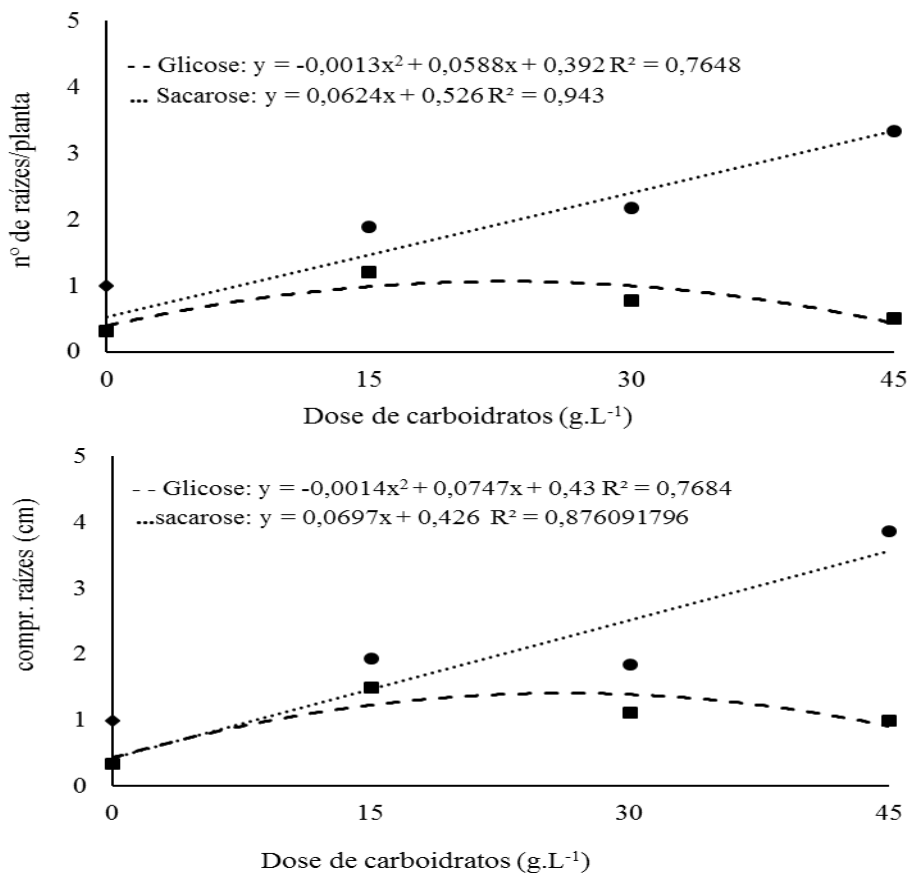


Britto, F. F., 2017

**Figura 4.2** - Plântulas de *P. trintae* submetidas a concentrações de 45 gL<sup>-1</sup> de sacarose (A) e 15gL<sup>-1</sup> de glicose (B). Vitória da Conquista-BA, 2017.

Com relação às variáveis número médio de raízes e comprimento médio da maior raiz de *P. trintae*, ocorreu semelhança entre os dois resultados quanto ao comportamento das concentrações dos carboidratos (Figura 4.3). A concentração de 15 g.L<sup>-1</sup> de glicose apresentou para essa fonte de carboidrato em torno de uma para o número de raízes e 1,23cm para o comprimento da maior raiz. A concentração de 45 g.L<sup>-1</sup> de sacarose foi efetiva na produção, originando 3,33 raízes, e no crescimento dessas, uma vez que alcançaram 3,56cm. Essa dosagem também teve efeito no número e comprimento de raiz em *P. edulis* no trabalho de Copatti, Costa e Mello-Farias (2016). Faria e outros (2006)

constataram que, em meio de cultivo acrescido com sacarose, ocorre favorecimento no desenvolvimento radicular de plantas de *P. gilberti*. Faria e Segura (1997a) obtiveram altas taxas de enraizamento para a espécie *P. edulis* em meio MS suplantado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Santana (2003), estudando os fatores que afetam o enraizamento *in vitro* em brotações e estacas de *Annona glabra* L., obteve os maiores percentuais de enraizamento em meio de cultura suplantado com 20g.L<sup>-1</sup> de sacarose.



**Figura 4.3** - Número e comprimentos de raízes de explantes de *P. trintae* submetidos a diferentes doses de glicose e sacarose (g.L<sup>-1</sup>). Vitória da Conquista-BA, 2017.

A principal dificuldade da cultura de tecidos é identificar, para cada espécie, qual o meio de cultura mais apropriado para que ocorra a divisão celular e, sobretudo, para “ligar” e “desligar” os genes, no momento e no local apropriado (RAMALHO e outros, 2012). A sacarose, na concentração  $45\text{g.L}^{-1}$ , parece ser um componente importante no meio de cultura para micropagação de *P. trintaë*. Especula-se que a adição de sacarose ao meio de cultura favoreça a manutenção das plântulas *in vitro* por maior período de tempo. Riquelme, Guiñazu e Tizio (1991) estudaram o efeito da sacarose (0 a  $60\text{g.L}^{-1}$ ) na etapa de pré-condicionamento *in vitro* de plântulas de morangueiro, batata, menta e videira. Os resultados demonstraram que doses de 30 a  $45\text{g.L}^{-1}$  foram mais adequadas para o pré-condicionamento *in vitro* e posterior sobrevivência durante a fase de aclimação.

As soluções de açúcares que compõem os meios de cultura podem não exercer efeito puramente nutritivo, mas exercem influência direta no crescimento celular e na morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996). Os principais fatores que influenciam o potencial hídrico em plantas são concentração, pressão e gravidade. A concentração é conhecida como determinante do potencial osmótico, e este representa o efeito de solutos dissolvidos sobre o potencial hídrico. Os solutos, como a sacarose, reduzem a energia livre da água por diluição desta. Esse é primariamente um efeito de entropia, onde a mistura de solutos e água aumenta a desordem do sistema e, portanto, reduz a energia livre (potencial hídrico). A água vai mover-se do potencial hídrico alto para o baixo. À medida que a água entra na célula, a parede celular é distendida pelo conteúdo do protoplasto e, assim, influencia o crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2009).

## **5 Conclusões**

Sacarose na concentração  $45 \text{ g.L}^{-1}$  e a glicose  $15 \text{ g.L}^{-1}$  apresentam maiores médias para número de brotações, comprimento de brotações, número de raízes e comprimento de raízes no cultivo *in vitro* de *P. trintaе*.



**CAPÍTULO 5**  
**ANÁLISE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA POR MARCADORES ISSR**  
**EM *Passiflora trintae* Sacco.**

**1 Introdução**

A conservação de *Passiflora* e sua caracterização são essenciais para subsidiar estudos taxonômicos, filogenéticos e evolutivos, o que permite o planejamento e a seleção de genótipos adequados para os programas de melhoramento genético. Nesse sentido, a conservação *ex situ* tem importante papel como fonte de genes, mas a indicação do uso do recurso genético conservado depende da caracterização desse germoplasma. Uma das maneiras de caracterizar germoplasmas é por meio do uso de marcadores moleculares. O polimorfismo genético obtido por meio desses marcadores pode ser usado na caracterização do germoplasma e no estudo genômico comparativo (XI e outros, 2008).

Os avanços da biotecnologia, sobretudo o desenvolvimento dos marcadores de DNA, têm permitido estudar e caracterizar a variabilidade genética em diferentes níveis (OLIVEIRA, 2006). Os marcadores moleculares têm sido utilizados como ferramentas auxiliares indispensáveis nas diferentes etapas do melhoramento genético, desde a caracterização do germoplasma até as etapas finalísticas de desenvolvimento e seleção de plantas melhoradas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares, por acessarem informações contidas no DNA, tornam-se ferramentas poderosas para o conhecimento da variabilidade disponível. Por meio da análise molecular, é possível entender e utilizar a distância genética entre indivíduos como um instrumento importante em programas de melhoramento, por servir de ligação entre ações de conservação e utilização de recursos genéticos disponíveis. Além disso, a estimativa da distância genética pode ajudar na organização do germoplasma, auxiliar na

escolha de genitores, definição de cruzamentos e incorporação de genes de germoplasma exótico (VIEIRA e outros, 2007).

O marcador molecular ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) revela o polimorfismo multiloco com a utilização de apenas um *primer*, ancorado ou sem âncora, baseado em regiões SSRs (Simple Sequence Repeats). O polimorfismo observado pode ser utilizado na inferência da diversidade genética e no estudo evolutivo e taxonômico (BORNET; BRANCHARD, 2002; REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002; ISSHIKI; IWATA; KHAN, 2008). A técnica de ISSR possui vantagens como reprodutibilidade, fácil uso e baixo custo em comparação com diversos outros tipos de marcadores moleculares (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar diferenças genéticas entre genótipos de *P. trintaë*, por meio de marcadores ISSR.

## **2 Referencial teórico**

Os Marcadores moleculares, sendo tecnologias de análise da variabilidade do DNA, permitem determinar pontos de referência nos cromossomos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores genéticos baseiam-se num conjunto de marcas que podem detectar polimorfismo de DNA em nível de um loco específico ou no nível de um genoma completo (VARSHNEY; GRANER; SORRELLS, 2005). Variadas técnicas moleculares são utilizadas rotineiramente, tanto como marcadores codominantes (polimorfismos de isoenzimas, microssatélites) quanto dominantes, dentre eles, ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002; GANGA e outros, 2004; ISSHIKI; IWATA; KHAN, 2008; OLIVEIRA e outros, 2008).

ISSR é uma dentre muitas técnicas de fingerprinting baseada em PCR (Polymerase Chain Reaction) que utilizam *primers* de sequência simples repetitiva para amplificar regiões entre sequências-alvo. Essa técnica tem a capacidade de gerar um grande número de marcadores multiloci e pode ser aplicada para analisar praticamente qualquer organismo, mesmo aqueles para os quais se dispõe de pouca ou nenhuma informação genética prévia (ARCADE e outros, 2000). O uso de marcadores ISSR em plantas superiores ou animais é conhecido por ser altamente reprodutível, polimórfico, informativo, rápido e pouco oneroso (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994; BORNET, BRANCHARD, 2002; BORNET e outros, 2002).

Os *primers* utilizados na amplificação de ISSR codificam pequenas regiões entre dois microssatélites similares, com 100-3,000 pb (GUASMI e outros, 2006). Estudos comparativos entre diferentes espécies de *Passiflora* têm obtido grande sucesso ao utilizarem marcadores moleculares do tipo RAPD (VIANA e outros, 2003; VIANA e outros, 2010), ISSR (SANTOS e outros, 2011) e genes cloroplastídicos (YOCKTENG; NADOT, 2004). No entanto, estudos com marcadores microssatélites para a caracterização de germoplasma de *Passiflora* envolvendo várias espécies ainda são incipientes.

Várias técnicas de análise molecular têm sido utilizadas ao nível de DNA em estudos de variabilidade em plantas, com a finalidade de identificar e determinar relações ao nível de espécies e cultivares. Uma delas foi a utilização de marcadores do tipo RAPD com sucesso em culturas de importância econômica, tais como açaizeiro (OLIVEIRA e outros., 2007) e seringueira (BICALHO e outros, 2008). O método de ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) tem sido amplamente utilizado nesses estudos por ser uma técnica simples, eficiente, possuir alta reprodutibilidade e gerar altos índices de polimorfismo (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002).

*Primers* de ISSR têm sido usados para caracterização e manutenção de germoplasma de cacau (CHARTERS; WILKINSON, 2000), para distinguir entre várias cultivares de crisântemo (WOLFF; ZIETKIEWICZ; HOFSTRA, 1995) e também para distinguir plantas derivadas de micrósporos daquelas oriundas de tecidos somáticos em cultura de anteras em linho no estágio de plântulas (CHEN e outros, 1998). Marcadores ISSR podem auxiliar nas análises genéticas em *P. trintae*, e o princípio da técnica pode permitir amplificar segmentos de DNA presentes entre duas regiões de microssatélites em direções opostas (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). A variabilidade genética, quando acentuada na espécie, torna-se uma ferramenta valiosa para ações de melhoramento em busca de genótipos mais adequados ao sistema intensivo de cultivo.

### **3 Material e Métodos**

As análises foram realizadas em maio e junho de 2017, no Laboratório de Biologia Molecular, na unidade da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em Cruz das Almas-BA.

O DNA genômico de 16 genótipos de *P. trintae* (Tabela 5.1) foi extraído de plantas em cultivo protegido de *Passiflora* da Universidade Estadual de Sudoeste da Bahia (UESB), em Vitória da Conquista-BA, Brasil. Os genótipos que tiveram desenvolvimento vegetativo em 2016 foram oriundos de sementes retiradas de frutos presentes na mata remanescente encontrada no entorno do campus Anísio Teixeira da Universidade Federal da Bahia, em Vitória da Conquista-BA. E os genótipos que cresceram em 2017 são resultantes das germinações ocorridas com sementes originadas de polinizações cruzadas controladas na casa de vegetação.

**Tabela 5.1** - Ano de crescimento dos genótipos analisados utilizando-se ISSR. Vitória da Conquista-BA, 2017.

| Ano  | Genótipos                              |
|------|--|
| 2016 | 01, 04, 10, 14, 15, 16                 |
| 2017 | 02, 03, 05, 06, 07, 08, 09, 11, 12, 13 |

Para a extração do DNA genômico, foi utilizado o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990). Folhas jovens foram maceradas em nitrogênio líquido e condicionadas em tampão de extração CTAB 2% [1.4 MNaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl; 0.4%βMercaptoetanol; 1.0%PVP] por 40 minutos a 65° C. O isolamento de ácidos nucleicos foi realizado com a solução (24:1) clorofórmio:álcool isoamílico, bem como álcool isopropílico, e a ressuspensão do DNA com a utilização de tampão TE [10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA].

A verificação da concentração do DNA genômico foi realizada pela comparação com 100 ng de DNA lambda (Invitrogen®) em eletroforese em gel de agarose 1% e corado com bromofenol (Invitrogen®). O DNA genômico foi diluído para a concentração de 10 ng/μl em tampão TE.

As amplificações ISSR foram realizadas através da utilização de 16 Primers ISSR em solução de 25 ng de DNA genômico, 10 mM de tampão 10X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3μM de Primer, 0,2 mM dNTP e 1 U Taq DNA Polimerase para o volume final de 15μl de reação. As amplificações foram realizadas em termociclador (Eppendorf® Mastercycle) e submetidas à seguinte programação: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos, cada qual composto de desnaturação por 40 segundos a 94°C, anelamento por 40 segundos a 48°C, extensão por 1 minuto a 72 °C e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos amplificados na reação de ISSR foram corados com bromofenol (Invitrogen®) e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,5%,

separados a 100V por 4 horas, com tampão 5X diluído para 1X TBE [27,5g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 54g NaOH; 25mL EDTA0,5M].

A análise dos dados foi realizada com a elaboração da matriz binária referente à presença (1) e à ausência de bandas (0). Para a análise de similaridade entre os genótipos, foi utilizado o software GENES (CRUZ, 2001), no qual foi calculado o coeficiente de Jaccard. A matriz obtida foi empregada para a construção de dendrograma utilizando o software MEGA 6.0 (TAMURA e outros, 2007), e, como método de agrupamento, foi utilizado o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (CC) do gráfico para a verificação da representação gráfica com a matriz original de similaridade.

#### **4 Resultados e discussão**

Dos 64 *Primers* ISSR testados, 20 deles apresentaram amplificação satisfatória na população em estudo, totalizando 31,25% (Tabela 5.2). O número de bandas amplificadas variou entre quatro para os *Primers* TriGTG3'YC e TriACG 3'RC e 10 para o *Primer* TriCAC3'YC. O total de 133 bandas ISSR foram amplificadas, sendo 6,6 o número médio de bandas por *Primer*.

A obtenção de marcadores moleculares ISSR em culturas de importância agronômica como tomate (TIKUNOV; KHRUSTALEVA; KARLOV, 2003), berinjela (ISSHIKI; IWATA; KHAN, 2008) e maracujá azedo (SANTOS e outros, 2011) evidenciou resultados importantes por meio de análise da diversidade genética intraespecífica para a utilização desses recursos genéticos na conservação e no melhoramento genético. No entanto, apesar da larga utilização do marcador ISSR em plantas, pouco tem sido relatado sobre sua aplicação em passifloras, principalmente para espécies silvestres (SANTOS e outros, 2011) como *P. trintae*.

Neste trabalho, foi observada a maior amplificação de *Primers* baseados em trinucleotídeos. A riqueza de repetições SSR trinucleotídicas no genoma de *P. edulis* Sims foi constatada através da amplificação de *Primers* ISSR baseados em sequências trinucleotídicas para o estudo da diversidade genética de acessos comerciais (SANTOS e outros, 2011). Contudo, de modo geral, a presença de dinucleotídeos SSR no genoma de plantas é a repetição mais comum, como, por exemplo, em *Arabidopsis thaliana* Heyhn com sequências dinucleotídicas distribuídas em abundância em regiões codificantes (CASACUBERTA; PUIGDOMEN; MONFORT, 2000).

Houve aproximadamente 60% de polimorfismo para os genótipos de *P. trintae*. Esse número foi semelhante à análise intraespecífica realizada com marcadores RAPD, que revelou médio percentual de polimorfismo em *P. nitida* HBK (63,8%) (GANGA e outros, 2004). Porém, esses valores ficam abaixo da análise intraespecífica com marcadores ISSR com *P. alata* Curtis, que revelou alto polimorfismo (98%) (SANTOS e outros, 2011), fator indicativo de elevada variabilidade genética (CERQUEIRA-SILVA e outros, 2012). Entretanto, o percentual com o maracujazeiro vermelho foi animador, pois, em razão das plantas terem sido obtidas de locais próximos, a diferença entre os genótipos favorece a continuação das coletas para o aumento dos germoplasmas a serem utilizados em pesquisas.

O PIC (“Polymorphism Information Content”) dos marcadores variou de 0,1 a 0,33 no loco DiGA’5CY, com média de 0,2 nos genótipos de *P. trintae*. Ao avaliarem uma amostra de 43 plantas de 12 diferentes acessos de *P. edulis*, Oliveira e outros (2005) obtiveram valores de PIC que variaram de 0 a 0,81. Em dois ciclos de seleção recorrente de maracujazeiro amarelo, Reis e outros (2011) encontraram de 0,07 a 0,52, no primeiro ciclo, e de 0 a 0,50, no segundo. A base genética de *P. trintae*, pelos valores apresentados de PIC, pode ser considerada reduzida. Contudo, foi encontrado a partir de uma população pequena, portanto é

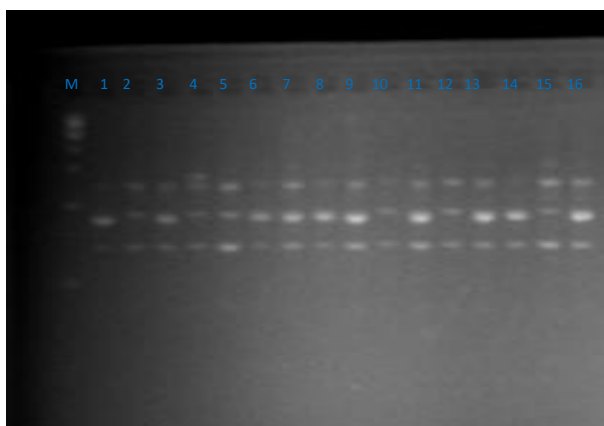
necessário ocorrer ampliação de estudos da espécie, por meio da identificação de mais indivíduos.

Os 20 *Primers* utilizados expressaram bandas que foram encontradas em diferentes quantidades (Figura 5.1). Dentre essas bandas, o maior número foi encontrado entre 11 e 15 genótipos (49 bandas), indicação de que os *Primers* deste trabalho realizam anelamento significativo na população. O ISSR é um *primer* com local de anelamento aleatório em sequências homólogas na molécula de DNA. A expressão das sequências de DNA amplificadas por um iniciador de ISSR não está diretamente relacionada a genes que controlam traços (HANDAYANI, 2016). No entanto, se o ISSR anelar-se a éxons, existe uma possibilidade de amplificação da sequência de DNA que pode ser um gene. Portanto, as bandas citadas para os genótipos de *P. trinta* podem expressar traços em comum.



**Tabela 5.2** - Primers utilizados em *P. trintae*. Ta (Temperatura de anelamento); Nb (Nº de bandas); Nbm (Nº de bandas polimórficas); PIC (Conteúdo de informação de polimorfismo); NBF1 (Nº de bandas presentes em 1 genótipo); NBF 2 a 5 (Nº de bandas presentes em 2 a 5 genótipos); NBF 6 a 10 (Nº de bandas presentes em 6 a 10 genótipos); NBF11 a 15 (Nº de bandas presentes em 11 a 15 genótipos); NBF (Nº de bandas presentes nos 16 genótipos); NFA (Nº de falhas). Vitória da onquista-BA, 2017.

| Primers      | Sequência (5'-3') | Ta (°C) | Nb         | Nbm        | % Polimorfismo | PIC           | NBF 1      | NBF 2 a 5  | NBF 6 a 10  | NBF 11 a 15 | NBF 16      | NFA        |
|--------------|-------------------|---------|------------|------------|----------------|---------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| DiCA3'RG     | CACACACACACACARG  | 48      | 7          | 2          | 71,4           | 0,2           | 2          | 1          | 2           | 0           | 2           | 0          |
| DiCA5'CY     | CYCACACACACACACA  | 48      | 7          | 4          | 42,8           | 0,23          | 0          | 3          | 0           | 4           | 0           | 1          |
| DiCA5'G      | GCACACACACACACA   | 48      | 5          | 2          | 60,0           | 0,15          | 0          | 1          | 0           | 2           | 2           | 0          |
| DiCA5'T      | TCACACACACACACA   | 48      | 5          | 3          | 40,0           | 0,15          | 0          | 2          | 0           | 0           | 3           | 0          |
| DiGA5'C      | CGAGAGAGAGAGAGA   | 48      | 6          | 3          | 50,0           | 0,18          | 0          | 2          | 0           | 1           | 3           | 0          |
| DiGA5'CR     | CRGAGAGAGAGAGAGA  | 48      | 7          | 4          | 42,8           | 0,17          | 1          | 2          | 0           | 1           | 3           | 0          |
| DiGA5'CY     | CYGAGAGAGAGAGAGA  | 48      | 8          | 1          | 87,5           | 0,33          | 0          | 2          | 2           | 3           | 1           | 0          |
| TriCAC3'RC   | CACCACCACCACCACRC | 48      | 7          | 2          | 66,6           | 0,26          | 0          | 2          | 1           | 2           | 2           | 0          |
| TriCAC3'YC   | CACCACCACCACCACYC | 48      | 10         | 4          | 60,0           | 0,24          | 1          | 2          | 1           | 6           | 0           | 1          |
| TriGTG3'YC   | GTGGTGGTGGTGGTYC  | 48      | 4          | 0          | 100,0          | 0,32          | 0          | 1          | 1           | 2           | 0           | 1          |
| TriAAC 3'RC  | AACAACAACAACACRC  | 48      | 5          | 3          | 40,0           | 0,10          | 0          | 0          | 0           | 2           | 3           | 0          |
| TriACA 3'RC  | ACAACAACAACAACRC  | 48      | 6          | 3          | 50,0           | 0,19          | 1          | 0          | 0           | 5           | 0           | 1          |
| TriACG 3'RC  | ACGACGACGACGACRC  | 48      | 4          | 3          | 25,0           | 0,20          | 0          | 1          | 0           | 3           | 0           | 1          |
| TriCGT 3'RC  | CGTCGTCGTCGTCRC   | 48      | 7          | 1          | 85,7           | 0,25          | 1          | 5          | 0           | 0           | 1           | 0          |
| TriCGC 3'RC  | CGCCGCCGCCGCCRC   | 48      | 8          | 6          | 25,0           | 0,10          | 0          | 1          | 0           | 2           | 5           | 0          |
| TriCGG 3'RC  | CGGCGGCGGCGGRC    | 48      | 8          | 4          | 50,0           | 0,10          | 3          | 0          | 0           | 1           | 4           | 0          |
| TriGAT 3'RC  | GATGATGATGATGATRC | 48      | 8          | 0          | 100,0          | 0,22          | 1          | 2          | 1           | 4           | 0           | 0          |
| TriGTT 3'RC  | GTTGTTGTTGTTGTTRC | 48      | 8          | 2          | 75,0           | 0,21          | 2          | 2          | 1           | 3           | 2           | 0          |
| TriGGA 3'RC  | GGAGGAGGAGGAGGARC | 48      | 6          | 3          | 50,0           | 0,24          | 0          | 0          | 1           | 5           | 0           | 1          |
| TriGGC 3'RC  | GGCGCGGCGGCGGRC   | 48      | 7          | 2          | 71,4           | 0,27          | 0          | 1          | 1           | 3           | 2           | 0          |
| <b>Total</b> |                   |         | <b>133</b> | <b>52</b>  | <b>-</b>       | <b>-</b>      | <b>12</b>  | <b>30</b>  | <b>11</b>   | <b>49</b>   | <b>33</b>   | <b>6</b>   |
| <b>Média</b> |                   |         | <b>6,6</b> | <b>2,6</b> | <b>59,66</b>   | <b>0,2055</b> | <b>0,6</b> | <b>1,5</b> | <b>0,55</b> | <b>2,45</b> | <b>1,65</b> | <b>0,3</b> |



**Figura 5.1** - Eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos de amplificação ISSR com a utilização do *Primer* DiCA3'RG. M: Marcador de peso molecular 1kb Fermentas. Genótipos de *P. trintaе* Pt (1-16). Vitória da Conquista-BA, 2017.

Os coeficientes de similaridade entre os genótipos de *P. trintaе* mostraram maior similaridade genética entre os genótipos Pt15 e Pt14 (0,88971). Menor similaridade genética foi observada entre os genótipos Pt1 e Pt3 (0,73188) (Tabela 5.3). Souza (2014) encontrou as maiores similaridades pela análise intraespecífica em *P. subrotunda* Mast. (0.8356), *P. racemosa* (0.8351), *P. hatschbachii* Cervi (0.8285) e *P. filamentosa* Cav. (0.8243) e as menores em acessos de *P. mucronata* (0,2637).

Os genótipos Pt02, Pt03, Pt05, Pt06, Pt07, Pt08, Pt09, Pt11, Pt12 e P13 resultaram de polinizações cruzadas controladas, que, geralmente, exibem heterose e, conseqüentemente, melhor adaptação e aumento do fitness. A heterose permite que os resultados obtidos neste trabalho também possam ser utilizados para a seleção de genitores promissores para a condução de cruzamentos interespecíficos (SOUZA, 2014). Pode ser sugerido que os genótipos com menor similaridade genética, como Pt1 e Pt3, inferidos neste estudo, por marcadores ISSR, possam ser utilizados como parentais em programas de melhoramento para produção de progênies.

A seleção de genitores para obtenção de plantas com potencial ornamental também deve ser realizada com a inclusão de dados referentes às características florais, como período e duração da antese (SOUZA, 2014). Desse modo, além da utilização de parâmetros moleculares para seleção de genitores, a descrição fenotípica também é essencial para tal finalidade e, conseqüentemente, a obtenção de plantas voltadas para o mercado.

A menor e a maior similaridade genética têm um papel importante no cultivo de uma espécie potencialmente ornamental, como o maracujazeiro vermelho, por isso precisam ser mantidas e melhoradas para garantir a disponibilidade de recursos genéticos. Uma espécie com maior diversidade genética suportará melhor as adversidades, pois a distância genética favorece a variabilidade, o que torna a espécie mais adaptável às mudanças (ZHAO e outros,2014).

**Tabela 5.3** - Coeficiente de similaridade genética entre genótipos de *P. trinta*e. Vitória da Conquista-BA, 2017.

|       | Pt.1    | Pt.2    | Pt.3    | Pt.4    | Pt.5    | Pt.6    | Pt.7    | Pt.8    | Pt.9    | Pt.10   | Pt.11   | Pt.12   | Pt.13   | Pt.14   | Pt.15   | Pt.16 |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| Pt.1  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |       |
| Pt.2  | 0,80303 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |       |
| Pt.3  | 0,73188 | 0,74265 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |       |
| Pt.4  | 0,77273 | 0,81890 | 0,79231 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |       |
| Pt.5  | 0,76471 | 0,79545 | 0,83846 | 0,83465 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |       |
| Pt.6  | 0,78832 | 0,76642 | 0,75540 | 0,78947 | 0,80000 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |       |
| Pt.7  | 0,76923 | 0,77953 | 0,78295 | 0,82114 | 0,84553 | 0,86400 |         |         |         |         |         |         |         |         |         |       |
| Pt.8  | 0,78676 | 0,77206 | 0,77941 | 0,76866 | 0,79259 | 0,78417 | 0,82677 |         |         |         |         |         |         |         |         |       |
| Pt.9  | 0,82443 | 0,78195 | 0,76296 | 0,77863 | 0,81679 | 0,86260 | 0,86885 | 0,84733 |         |         |         |         |         |         |         |       |
| Pt.10 | 0,75556 | 0,75940 | 0,77444 | 0,80469 | 0,80769 | 0,81955 | 0,83740 | 0,80451 | 0,78788 |         |         |         |         |         |         |       |
| Pt.11 | 0,79389 | 0,75758 | 0,75940 | 0,76744 | 0,78030 | 0,87500 | 0,84426 | 0,78947 | 0,82812 | 0,8125  |         |         |         |         |         |       |
| Pt.12 | 0,79104 | 0,85156 | 0,75735 | 0,80000 | 0,79104 | 0,80147 | 0,81102 | 0,77372 | 0,78358 | 0,83721 | 0,82171 |         |         |         |         |       |
| Pt.13 | 0,81061 | 0,85039 | 0,80916 | 0,84127 | 0,82308 | 0,86260 | 0,86777 | 0,83333 | 0,83077 | 0,84375 | 0,84252 | 0,88189 |         |         |         |       |
| Pt.14 | 0,77143 | 0,78832 | 0,77698 | 0,79851 | 0,75177 | 0,80714 | 0,80916 | 0,79286 | 0,78986 | 0,81481 | 0,80000 | 0,81022 | 0,88550 |         |         |       |
| Pt.15 | 0,75352 | 0,80882 | 0,74648 | 0,80597 | 0,78571 | 0,80142 | 0,80303 | 0,78723 | 0,77143 | 0,82222 | 0,79412 | 0,83088 | 0,87879 | 0,88971 |         |       |
| Pt.16 | 0,79687 | 0,78740 | 0,77692 | 0,84553 | 0,76923 | 0,79545 | 0,82500 | 0,82677 | 0,81746 | 0,81746 | 0,78740 | 0,78462 | 0,86290 | 0,87500 | 0,85385 |       |

Genótipos de *P. trinta*e Pt (1-16)

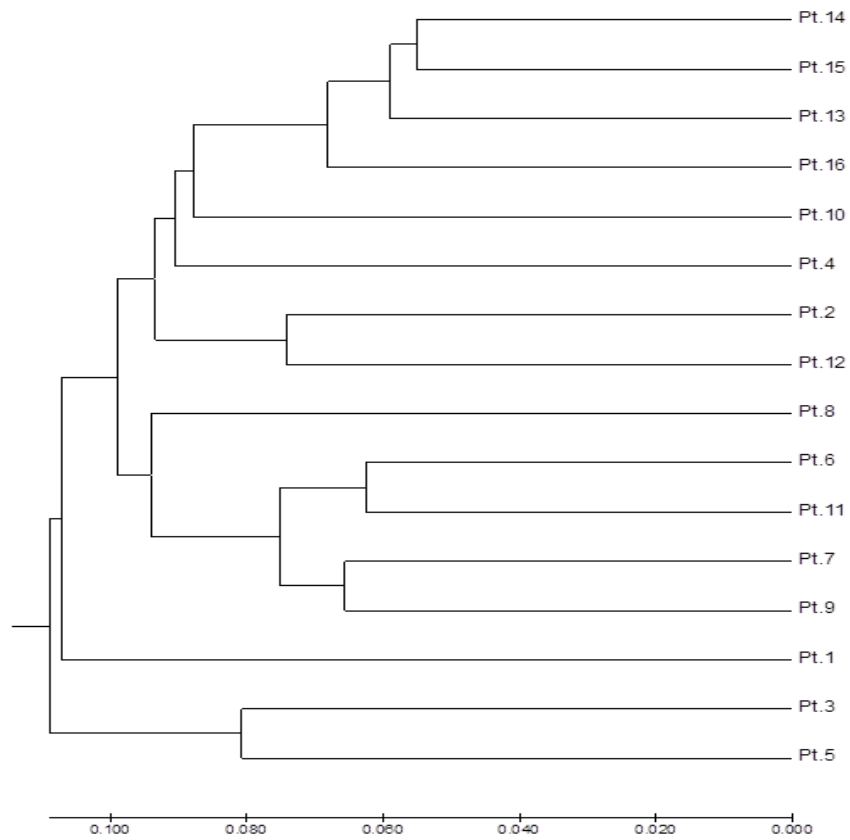
O dendrograma elaborado através do agrupamento do coeficiente de similaridade de Jaccard pelo método UPGMA revelou grupos (Figura 5.2), que foram relacionados por um significativo coeficiente de correlação cofenética ( $r=0,72$ ). Os genótipos Pt14 e Pt15 encontram-se mais próximos, e os genótipos Pt03 e Pt05, mais distantes dos demais. Carmo e outros (2017) obtiveram coeficiente de correlação cofenética igual a 70%, percentual próximo deste trabalho, e identificaram que dois acessos (Jaboticabal-SP) obtidos de uma mesma área eram mais similares geneticamente a outros acessos (Embrapa PGB 016), de outras áreas, e não entre eles, fato semelhante ao observado neste estudo.

Apesar desse significativo coeficiente de correlação cofenética com os genótipos de *P. trintae*, sugerindo fidelidade da representação gráfica aos dados encontrados, esse distribuiu o genótipo Pt01 da mata remanescente (2016) distante dos outros obtidos no mesmo local (Pt04, Pt10, Pt14, Pt15 e Pt16). Estes últimos, pela congruência, ficaram próximos. O genótipo Pt13, resultante das polinizações cruzadas controladas, apresentou maior proximidade daqueles achados em mata.

A escolha do coeficiente de similaridade ou dissimilaridade deve ser realizada em adequação à população em estudo e ao marcador molecular utilizado (MURGUÍA; VILLASEÑOR, 2003). Neste trabalho, o uso da análise de similaridade condiz com a população investigada, uma vez que os genótipos apresentam semelhança quanto ao local de onde foram coletados.

O resultado deste estudo foi importante para entender a relação genética entre genótipos de *P. trintae*. Os marcadores ISSR podem ser usados efetivamente para detectar a variação entre genótipos de maracujazeiro vermelho. Este estudo está de acordo com Poyraz (2016), que informou que o método ISSR-PCR é adequado para detectar diferenças genéticas entre genótipos mais próximos em habitats semelhantes. No entanto, um estudo

avanzado da diversidade genética de genótipos de *P. trinta*e deve ser feito por meio do uso de outros marcadores moleculares para confirmação abrangente da diversidade.



**Figura 5.2** - Dendrograma das relações genéticas entre genótipos de *P. trinta*e obtidas por marcadores ISSR. Vitória da Conquista-BA, 2017.

## **5 Conclusões**

Os marcadores ISSR possibilitam a detecção de 60% de polimorfismo e favorecem o estudo da diversidade genética de genótipos de *P. trintaе*.

## REFERÊNCIAS

ABREU, P. P. et al. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, v. 166, n. 3, p. 307-315. 2009.

AIRES, P.S.R. et al. Efeito da concentração de vitaminas e das fontes de carbono no superbrotamento da mamona utilizando o genótipo BRS Nordeste. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, 2007.

ALCOCHETE, A. A. N. **Diversidade genética e mapeamento de QTLs do sistema gênico de macho-esterilidade termosensível (TGMs) do genoma de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2005. 293p. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília-DF.

ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen, fungi yeast and bacteria. **Satin Technology**.v.55, p.13-18. 1980.

ALEXANDRE, R. S. et al. Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 12, p. 1239-1245, 2004.

ALVARADO, V.; BRADFORD, J. K. A hydrothermal time model explains the cardinal temperatures for seed germination. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 9, p. 1061-1071, 2002.

AMARAL, C. L. et al. **Melhoramento Genético Vegetal: Resistência a fatores estressantes “bióticos e abióticos”**. 1.ed. Ibicaraí: Via Litterarum, 2015.

AMARAL, C. L. et al. O ensino e a pesquisa com recursos genéticos vegetais na UESB. In: ROMÃO, R. L.; RAMOS, S. R. R. (Eds.). **Recursos Genéticos Vegetais do Estado da Bahia**. Feira de Santana: UEFS, 2005. p.157-175.

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. et al. Estudos morfológicos, anatômicos, histoquímicos e ultra-estruturais da organogênese in vitro do maracujazeiro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N.T.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. 1ª ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.387- 408.

ARCADE, A. F. et al. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 100, p. 299-307, 2000.



BENEVIDES, C. R.; GAGLIANONE, M. C.; HOFFMANN, M. Visitantes florais do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Passifloraceae) em áreas de cultivo com diferentes proximidades a fragmentos florestais na região Norte Fluminense, RJ. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 3, p. 415-421, 2009.

BERNACCI, L. C. et al. Passifloraceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Org.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 830-834, 2013.

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

BICALHO, K. C. et al. Similaridade genética entre clones de seringueira (*Hevea brasiliensis*), por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1510-1515, 2008.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 5. ed. Viçosa, UFV, 2009. 529p.

BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Report**, v. 19, p. 209-215, 2002.

BORNET, B. et al. High informative nature of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) sequences amplified with tri- and tetranucleotide primers from cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) DNA. **Genome**, v. 45 p. 890-896. 2002.

BOSS, P. K. et al. Multiple pathways in the decision to flower: enabling, promoting and resetting. **The Plant Cell**, v. 16, p. 18-31, 2004.

BOTELHO, B. A.; PEREZ, S. C. J. G. A. Estresse hídrico e reguladores de crescimento na germinação de sementes de cinafístula. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 1, p. 43-49, 2001.

BRAINER, M. S. C. P.; OLIVEIRA, A. A. P. Perfil da floricultura no Nordeste Brasileiro. In: XLIV CONGRESSO DA SOBER. Fortaleza, 2006 **Anais...** Fortaleza, 20p. 2006.

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

BRITO A. C. et al. Propriedades do pólen e do estigma de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) para aumentar a eficiência de cruzamentos em programas de melhoramento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, p. 208-214, 2010.

BRITTO, F. F. **Progênes híbridas de maracujazeiro do cruzamento *Passiflora cincinnata* Mast. x *Passiflora quadrangularis* Linn.** 2013. 149f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Sudoeste Bahia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Vitória da Conquista.

BRUCKNER, C. H. et al. Auto - incompatibilidade do maracuja-implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA; N. T. V., BRAGA, M. F.. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa Cerrados, Planaltina. 2005, p. 315-338.

BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. Hibridização em maracujá. In: BÓREM, A. (Ed.) **Hibridização artificial em plantas**. Viçosa: UFV, 1999. 546 p.

BRUCKNER, C. H. et al. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae**, v. 370, p. 45-57, 1995.

CARMO, T. V. B. et al. Genetic diversity in accessions of *passiflora cincinnata* mast. based on morphoagronomic descriptors and molecular markers. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 1, p. 68-77, 2017.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 558 p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424p.

CASACUBERTA, E.; PUIGDOMENECH, P.; MONFORT, A. Distribution of microsatellites in relation to coding sequences within the *Arabidopsis thaliana* genome. **Plant Science**, v. 157, p. 97-104, 2000.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. **Aplicação de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Editora Agropecuária, Guaíba, Brasil, 2001. 132p.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. et al. Genetic variation in a wild population of the 'sleep' passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 731-738, 2012.

- CERVI, A. C. et al. **Passifloraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012.  
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000182>>. Acesso em: 15 de jan. 2017.
- CERVI, A. C. **Passifloraceae do Brasil**: estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*. Fontqueria, Madrid, v. 45, p. 1-92, 1997.
- CHARTERS, Y. M.; WILKINSON, M. J. The use of self-pollinated progenies as 'ingroups' for the genetic characterization of cocoa germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 100, p. 160-166, 2000.
- CHEN, Y. et al. Identification of microspore-derived plants in anther culture of flax (*Linum usitatissimum* L.) using molecular markers. **Plant Cell Reports**, v. 18, p. 44-48, 1998.
- CID, L. P. B., ed. Técnico. **Cultivo in vitro de plantas**. 3 ed. Brasília, DF, Embrapa, 2014, 325p.
- CLEMENT, C. R. et al. Conservação on farm. In: **Recursos Genéticos Vegetais**. NASS, L. L. (Ed). Brasília- DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, p. 513-544.
- CONEGLIAN, R. C. C. et al. Efeitos de métodos de extração e de ácido giberélico na qualidade de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 3, p. 463-467. 2000
- COPATTI, A. S.; COSTA, S. I.; MELLO-FARIAS, P. C. Fontes e concentrações de carboidratos na multiplicação *in vitro* de maracujá amarelo. **Revista da 13ª Jornada de pós-graduação e pesquisa**, v.8, p. 553-572. 2016
- COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais estado da arte. In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. 2005. p. 475-508.
- COSTA, R. S.; MÔRO, F. V.; OLIVEIRA, J. C. Influência do momento de coleta sobre a viabilidade de grão de pólen em maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 956-961, 2009.
- CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B. C.; VIEIRA, L. G. E. Genetic diversity in passion fruit (*Passiflora* spp.) evaluated by RAPD markers. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 46, p. 521-527, 2003.

- CROZIER, A. et al. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: Buchanan, B. B.; Grissem, W. & Russel, L. J. (eds). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Courier Companies Inc., Philadelphia, USA, 2001. p. 850-929.
- CRUDEN, R. W. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**, v. 31, p. 32-46, 1977.
- CRUZ, C.D. Programa Genes (Versão Windows): **Aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, 2001. 648p.
- CUNHA, R.; CASALI, W.D. Efeito de substâncias reguladoras de crescimento sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.1, n.2, p.121-132, 1989.
- DAFNI, M. **Pollination Ecology: a practical approach**. Oxford University Press, New York. 1992. 250 p.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: Physiology, biochemistry and molecular biology**. Klumer Academic Publishers, London, UK, 1995. 833p.
- DOYLE JJ AND DOYLE JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.
- DREW, R. A. *In vitro* culture of adult and juvenile bud explants of *Passiflora* species. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 26, n. 1, p. 23-27, 1991.
- DUARTE FILHO, J. et al. Germinação de sementes de *Passiflora Gilberti* N. E. Brown sob temperatura controlada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, n. 3, p. 468-470, 2000.
- DUARTE, J. **Aspectos do florescimento e caracterização do fruto do maracujá caerulea (*Passiflora caerulea* L.)**. 1996. 72p. Tese (Faculdade de Ciências Agrárias) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.
- DUARTE, M. O. et al. Biologia Reprodutiva De Três Espécies De *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) Em Uberlândia, MG, Brasil. In: IX Congresso de Ecologia do Brasil, 9, São Lourenço (MG). **Anais...** São Lourenço, 2009, CD.
- ENDRESS, P. K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. 14, Cambridge [England]; New York, USA: Cambridge University Press, 1994. 511p.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S.; RAVEN, E. **BIOLOGIA VEGETAL**. 8ª ed.- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. ISBN 978-85-277-2362-6

FALLEIRO, T. M. **Herança da auto-incompatibilidade no maracujazeiro *Passiflora edulis* Sims**. 2000. 49p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

FARIA, F.S.; STEHMANN, J.R. Biologia reprodutiva de *Passiflora capsularis* L. e *P. pohlii* Mast. (Decaloba, Passifloraceae). **Acta bot. bras.** 24(1): 262-269. 2010.

FARIA, G. A. et al. Efeito da sacarose e sorbitol na conservação in vitro de *Passiflora giberti* N. E. Brown. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 2, p. 267-270, 2006.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. In vitro control of adventitious bud differentiation by inorganic medium components and silver thiosulfate in explants of *Passiflora edulis* F. *flavicarpa*. **In vitro cellular & developmental biology-plant**, p. 209-212, 1997a.

FARIA, J. L. C.; SEGURA, J. Micropropagation of yellow passionfruit by axillary bud proliferation. **HortScience**, v. 32, n. 7, p. 1276-1277, 1997b.

FARIA, G. A. **Tamanho ótimo de parcelas experimentais in vitro com maracujazeiro**. 2008. 101f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Ilha Solteira.

FERRAZ GRANDE, F. G. A.; TAKAKI, M. Efeitos da luz, temperatura e estresse de água na Germinação de sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (caesalpinoideae). **Bragantia**, v. 65, n.1, p. 37-42, 2006.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Ed. ARTMED- São Paulo- SP- 2004.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

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

FERREIRA, G. et al. Emergência e desenvolvimento de plântulas de maracujazeiro azedo oriundas de sementes tratadas com bioestimulante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, n. 3, p. 595-599, 2007.

FERREIRA, G. et al. Efeito de arilo na emergência 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.

FERREIRA, G.; FOGAÇA, L. A.; MORO, E. Germinação de sementes de *Passiflora alata* Dryander (maracujá-doce) submetidas a diferentes tempos de embebição e concentrações de ácido giberélico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 160-163, 2001.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1998.

FILLIETTAZ, A. **Melhoramento genético de plantas ornamentais**. Biológico, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 95, 2007.

FISCHER, S. Z. et al. Plantas da flora brasileira no mercado internacional de floricultura. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 510-512, 2007.

FOGAÇA, L. A.; FERREIRA, G.; BLOEDORN, M. Efeito do ácido giberélico (GA3) aplicado em sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander) para a produção de mudas em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 152-155. 2001.

FOLLIOT, M.; MARCHAL, J. In vitro growth of bananas (cv. Grande Naine): study of utilization of the carbon source and the main mineral elements of the culture medium. **Fruit Paris**, Paris, v. 47, n. 5, p. 565- 571, 1993.

FRACASSO, C. M.; SAZIMA, M. Polinização de *Cambessedesia hilariana* (Kunth) DC. (Melastomataceae): sucesso reprodutivo versus diversidade, comportamento e frequência de visitas de abelhas. **Revista Brasileira de Botânica**, V.27, n.4, p.797-804, out-dez. 2004.

FREITAS, L.; WOLOWSKI, M.; SIGILIANO, M. I. Ocorrência de limitação polínica em plantas de mata atlântica. **Oecologia Australis**. v.14, n. 1, p. 251-265, 2010.

GANGA, R. M. D. et al. Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares fAFLP. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 26, p. 494-498, 2004.

GEORGE, E. F. **Plant propagation by tissue culture**. Part 2: In Practice. 2.ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.

GOMES, P. R. **Viabilidade e conservação do grão de pólen de cebola (*Allium cepa* L.)**. 1998, 54p. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de sementes) – FAEM – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. (Ed). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa-CNPq, 1998. p.183-260.

GRATTAPAGLIA, D. et al. Cultura de tecidos de maracujá. In: São José, A. R. (ed.) **A cultura do maracujá no Brasil**. FUNEP, Jaboticabal, Brasil, 1991. p. 61-75.

GUASMI, F. et al. Identification and differentiation of *Ficus carica* L. cultivars using inter simple sequence repeat markers. **African Journal of Biotechnology**. v. 5, p. 1370-1374, 2006.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos - Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. 1. Ed. FUNPEC, Ribeirão Preto, 2002. p. 131

GUERRA, M. S. **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1988. 142p.

HANDAYANI, F. **Genetic diversity of *Lai (Durio kutejensis (Hassk.) Becc.)* based on morphological dan inter-simple sequence repeat markers**. [Thesis]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. [Indonesian]. 2016.

HANSEN, A. K. et al. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in Passiflora. **Systematic Botany**, v. 31, p. 138-150, 2006.

HAROUN, S. A.; AL SHEHRI, A. M.; AL WADIE, H. M. Cytomixis in the microsporogenesis of *Vicia faba* L. (Fabaceae). **Cytologia**, v. 69, p. 7-11, 2004.

HERBÁRIO IAC. **Herbário Instituto Agrônomo de Campinas**, SP. 2014. Disponível em: <<http://herbario.iac.sp.gov.br/Relatorios/Listagens/LExtincao.asp>>. Acesso em: 21 de junho. 2017.

HO, W. F.; SHIH, C. T. Incompatibility system in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae**, v. 194, p. 31-38, 1986.

HOLLIDAY, R. The biological significance of meiosis. Symposium of the Society. **Experimental Biology**, v. 38, p. 381-394, 1984.

- IBGE. **Produção Agrícola Municipal**, 2013. Disponível em:  
<<http://loja.ibge.gov.br/producao-agricola-municipal-2015.html>>. Acesso em:  
26 de maio de 2017.
- ISSHIKI, S.; IWATA, N.; KHAN, M. M. R. ISSR variations in eggplant (*solanum melongena* L.) and related Solanum species. **Scientia horticultrae**, v. 117, P. 186-190, 2008.
- JUNGHANS, T. G.; VITAL, A. M.; SOUZA, A. S. Cultivo *in vitro* de ápices caulinares de maracujazeiro amarelo em função do meio de cultivo e temperatura In. CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 17, 2002, Belém. **Anais...** Belém: Embrapa Amazônia Ocidental, 2002. CD-ROM.
- JUNQUEIRA, N. T. V. et al. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa Cerrados, Planaltina, 2005, p. 457-464.
- KANTHARAJAH, A. S.; DODD, W. A. *In vitro* micropropagation of *Passiflora edulis* (Purple passionfruit). **Annals of Botany**, v. 65, n. 3, p. 337-339, 1990.
- KAWATA, K et al. A micropropagation of passion fruit from subcultured multiple shoot primordia. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, p. 281-284, 1995.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. Niwot: University Press of Colorado, 579p. 1993.
- KILL, L.H.P. et al. Biologia reprodutiva de *Passiflora cincinnata* Mast. (Passifloraceae) na região de Petrolina (Pernambuco, Brasil). **Oecologia Australis**. v.14, n.1, p.115-127, 2010.
- LAWINSKI, P.B. **Caracterização morfológica, reprodutiva e fenológica de *Passiflora alata* Curtise *Passiflora cincinnata* Mast.** 2010. 146f. Dissertação (mestrado em Produção Vegetal ). Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus.
- LENZI, M.; ORTH, A. I.; GUERRA, T. M. Ecologia da polinização de *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae), em Florianópolis, SC, Brasil. **Revista brasileira Botânica**, v. 28, p. 505-513, 2005.
- LEONEL, S.; PEDROSO, C. J. Produção de mudas de maracujazeiro-doce com uso de biorregulador. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 107-109, 2005.



- LOPES, J. C. et al. Germinação e vigor de plantas de maracujazeiro 'amarelo' em diferentes estádios de maturação do fruto, arilo e substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 5, p. 1340-1346, 2007.
- LOSS, A. C. C. et al. Diversidade genética de populações de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) no estado do Espírito Santo, Brasil. **Natureza On Line**, v. 4, n. 2, p. 55-61, 2006.
- 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**, v.27, n. 1, p. 183-189, 2005.
- MAUÉS, M. M.; COUTURIER, G. Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 4, p. 441-448, 2002.
- MEDEIROS, S. A. F. de et al. Caracterização físico-química de progênies de maracujá-roxo e maracujá-azedo cultivados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 2, p. 492-499, 2009.
- MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 33, p. 83-91, 2011.
- MELETTI, L. M. M. et al. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento e melhoramento genético. Planaltina: **Embrapa Cerrados**, Cap.3, p. 55-78. 2005.
- MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C. Caracterização fenotípica de três seleções de maracujazeiro-roxo (*Passiflora edulis* Sims). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, p. 268-72, 2005.
- MELETTI, L. M. M. et al. Caracterização de germoplasma de maracujazeiro (*Passiflora* sp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 14, p. 157-162, 1992.
- MELO, C. A. F. et al. Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L. **Plant Systematics and Evolution**, v. 293, p. 227-235, 2011.
- MELO, N. F. de; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA Sites in *Passiflora* L. Species with Distinct Base Chromosome Numbers. *Annals of Botany*, v. 92, p. 309- 316, 2003.

- MENEZES, J. M. T. et al. Avaliação da taxa de pegamento de enxertos de maracujá amarelo sobre espécies tolerantes à “morte prematura de plantas”. **Científica**, v. 22, p. 95-104, 1994.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; BAUMGRATZ, J. F. A. *Passiflora* L. subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. **Rodriguésia**, v. 55, p. 1754, 2004.
- MONTEIRO-HARA, A. C. B. A. **Cultivo *in vitro* de três espécies do gênero *Passiflora***. 2000. 82p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.
- MORAES, I. C. R. **Caracterização citogenética e da biologia reprodutiva de três espécies do gênero *Hypericum* L. (Clusiaceae)**. 2007, 64p. Tese (Doutorado)-Instituto Agrônômico, Campinas-SP.
- 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.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MURGUÍA M.; VILLASEÑOR. J. L. Estimating the effect of the similarity coefficient and the cluster algorithm on biogeographic classifications. **Annales Botanici Fennici**, v. 40, p. 415-421, 2003.
- NASCIMENTO, W.M.O. DO; TOMÉ, A.T.; OLIVEIRA, M. DO S.P. DE; MULLER, C.H.; CARVALHO, J.E.U. de. Seleção de progênies de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) quanto à qualidade de frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 186-188, 2003.
- NAKAYAMA, F. In vitro tissue culture of *Passiflora caerulea*. **Revista de la Facultad de Agricultura Nacional de La Plata**, v.42, p.63-74, 1966.
- NICOLOSO, F. T. et al. Efeito de doses e fontes de carboidratos no crescimento de plantas de ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen] cultivadas in vitro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n.1, p. 84-90, 2003.
- NUCCI, M.; ALVES-JÚNIOR, V.V.A. Floral biology and reproductive system of *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg - myrtaceae in the area of southern cerrado, **Verciência**. v. 42, n.2. 2017.

- NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. A Família Passifloraceae na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sitientibus**, v. 1, n. 1, p. 33-46. 2001
- NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus**, v. 6, p. 194-226, 2006.
- OLIVEIRA, A. M. A.; COLEMAN, J. R. Estudos da biologia reprodutiva de espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 42., Caxambu, 1996. **Programa e Resumos...** Caxambu: SBG, 1996. p. 290.
- OLIVEIRA, A. et al. Efeito de reguladores vegetais no desenvolvimento de mudas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 9-13, 2005.
- OLIVEIRA, E. J. et al. An integrated molecular map of yellow passion fruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. **Journal Of The American Society For Horticultural Science**, v. 133, p. 35-41, 2008.
- OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microsatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**. 2006. 152f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.
- OLIVEIRA, J. C. et al. Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro. In: SÃO JOSÉ, A.R. (Ed.). **Maracujá: produção e mercado**. Vitória da Conquista, Bahia: UESB-DZF, p. 27-28, 1994.
- OLIVEIRA, J. C. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.). **Cultura do maracujazeiro**. Ribeirão Preto: L. Summa. p. 218-46, 1987.
- OLIVEIRA, M. A. et al. Germinação de sementes de *Passiflora giberti* Brow sob temperatura controlada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 15. 1998, Poços de Caldas. **Anais...** Lavras: UFLA, 1998. p. 557.
- OLIVEIRA, M. S. P. et al. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1645-1653, 2007.

OSBORN, M. M.; KEVAN, P. G. LANE, M. A. Pollination biology of *Opuntia polyacantha* and *Opuntia phaeacantha* (Cactaceae) in southern Colorado. **Plant Systematics and Evolution**, v. 159, p. 85-94, 1998.

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.

OTONI, W.C. et al. Organogenesis and somatic embryogenesis in Passionfruit (*Passiflora* spp.). In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P.S.; SHARMA, M.P. (eds). **Somatic Embryogenesis and Gene Expression**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013. p. 1-17.

OTONI, W.C. **Hibridação e embriogênese somática e transformação genética em espécies de Passiflora**. 1995. 198p. (Tese – Doutorado em Genética e Melhoramento) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

OZAROWSKI, M.; THIEMA, B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 23, p. 937-947, 2013.

PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 997-1002, 2000.

PALMA-SILVA, C. et al. Chromosome numbers, meiotic behavior, and pollen viability of species of *Vriesea* and *Aechmea* genera (Bromeliaceae) native to Rio Grande do Sul, Brazil. **American Journal Botany**, v. 91, p. 804-807, 2004.

PANTANO, C. S.; Propagação. In: LEONEL, S.; SAMPAIO, A.C.; **Maracujá doce: Aspectos técnicos e econômicos**. São Paulo: UNESP, 2007.

PASSIFLORA. **The Journal & Newsletter of Passiflora Society International**. v.14, n 1. Spring: Summer. 2004.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**, n.2. Churchill, Edinburgh. 87p, 1972.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa Cerrados, Planaltina, 2005, p. 457-464.

PEREA, M.; TIRADO, A. **Cultivo de tejidos in vitro**. Manual de prácticas de laboratorio. Facultad de Ciencias Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2011.

PEREIRA, A. M. S.; RIBEIRO, J. F. O Cerrado: reserva genética ameaçada. PEREIRA, A. M. S. (Ed). In: **Recursos Genéticos e Conservação de Plantas Mediciniais do Cerrado**. Editora Legis Summa. Ribeirão Preto FAPESP, 2007, p. 13-36.

PICOLI, E. A. T.; CARVALHO, C. R.; FARI, M.; OTONI, W. C. Associação de fases meióticas e estádios dos micrósporos com características morfológicas de botões florais de pimentão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 3, p. 708-713, 2003.

POYRAZ, I. Comparison of ITS, RAPD and ISSR from DNA-based genetic diversity techniques. **Comptes Rendus Biologies**, v. 339, p. 171-178, 2016.

RAMALHO, M. A. P. et al. **Genética na Agropecuária**. 5ª ed. Revisada- Editora UFLA- Lavras-MG. 2012.

REDDY, P. M.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**. v. 128, p. 9-17, 2002.

REIS, R. V. et al. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 1, p. 51-57, 2011.

RIBEIRO, M. R. **Tamanho da amostra, luminosidade e profundidade da sementeira na germinação de sementes de maracujazeiro azedo**. 2016. 41f. Dissertação (mestrado em Fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

RIGAMOTO, R. R.; TYAGI, A. P. Pollen Fertility Status in Coastal Plant Species of Rotuma Island. **South Pacific Journal Natural Science**, v. 20, p. 30-33, 2002.

RIQUELME, C.; GUIÑAZU, M. E.; TIZIO, R. Pre-acondicionamiento y aclimatación em condiciones de invernáculo de plântulas micropropagadas de frutilla, menta, papa y vid. **Phyton**, v. 52, n. 1, p. 73-82, 1991.

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

- ROMANO, A.; NORONHA, C.; MARTINS- LOUCAO, M. A. Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **Hague**, v. 40, n. 2, p. 159-167, 1995.
- ROSSETTO, C. A. V. et al. Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand) em função de tratamento pré-germinativo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 1, p. 247-252, 2000.
- ROZA, F. A. et al. Estudo de parâmetros da fenologia floral em espécies silvestres de *Passiflora* como subsídio para programas de hibridação. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UESC, 11, 2005. Ilhéus, BA. 2005 **Anais...** Ilhéus: UESC-Empresa Júnior de Informática, p. 8486. CD Rom.
- SANTANA, J. R. F. **Controle da morfogênese in vitro em algumas espécies de annonaceae**. 2003. 237p. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.
- SANTOS, L. F. et al. ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**, v. 49, p. 540554, 2011.
- SANTOS, M. C. et al. Efeito da temperatura e do substrato na germinação de sementes de maracujá (*Passiflora edulis* Sims. Var. *flavicarpa* Deg.). **Revista de sementes**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 1999.
- SARVELLA, P. Cytomixis and the loss of chromosomes in meiotic and somatic cells of *Gossypium*. **Cytologia**, v. 23, p. 14-24, 1958.
- SAZIMA, M.; SAZIMA, I. Bat pollination of the passion flower, *Passiflora mucronata*, in Southeastern Brazil. **Biotropica**, v. 10, n. 2, p. 100-109, 1978.
- SCARIOT, A. O.; SEVILHA, A. C. Conservação in situ de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L. L. (Ed). **Recursos Genéticos Vegetais**. Brasília – DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007, p. 475-509.
- SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL, M. **Auto-incompatibilidade em plantas**. *Ciência Rural*, v. 32, 2002.
- SHUKLA, K.; FAROOQI, A. H. A. E. Review: utilization of plant growth regulators in aromatic plant production. **Current Research Medicinal & Aromatic Plants**, v. 12, p. 152-177, 1990.
- SILVA, F. A. S. ASSISTAT versão 7.6 beta. Grande-PB: **Assistência estatística**. Departamento de Engenharia Agrícola do CTRN - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2004.

SILVA, A. B. da. **Biologia Reprodutiva e Citogenética da Alfavaca do Campo (*Ocimum campechianum* Mill.)**. 2007. 63f. Dissertação (mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Vitória da Conquista.

SILVA, F. M. et al. Enxertia de mesa de *Passiflora edulis* Sims f. fl avicarpa Deg. sobre *Passiflora alata* Curtis em ambiente de nebulização intermitente. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27 n. 1, p. 98-101, 2005.

SILVA, M. L. et al. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**. v. 99, p. 47–54, 2009.

SIQUEIRA, K. M. M. et al. Ecologia da polinização do maracujá-amarelo, na região do vale do submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 1-12, 2009.

SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L.M.M. **Maracujá: espécies, variedades e cultivo**. Piracicaba: FEALQ. 1997, 179p.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 247-258, 2008.

SOUZA, M. M. Ações de pesquisa para utilização de passifloras silvestres como plantas ornamentais. In: 2º WORKSHOP DE RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS NO ESTADO DA BAHIA, **Anais...** Magistra, v. 18, n. 38, 2006.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera, e viabilidade polínica em maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. flavicarpa Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, p. 1209-1217, 2002.

SOUZA, Q. S. C. Avaliação Citogenética de Maracujá-vermelho, **Anais... VII SEMANA DE AGRONOMIA-UESB**, 2017.

SOUZA, V. O. de. **Caracterização morfológica, reprodutiva, fisiológica e anatômica em *Passiflora subrotunda* Mast. submetida a diferentes níveis de sombreamento**. 2014. 114f. Dissertação (mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus.

STEBBINS G. L. **Chromosomal evolution in higher plants**, Edward Arnold, London. 1971.

STONE, J. L.; THOMSON, J. D.; DENT-ACOSTA, S. J. Assessment of pollen viability in hand-pollination experiments: a review. **American Journal Botany**, v. 82, p. 1186–1197, 1995.

STORTI, E. F. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Passiflora coccínea* Aubl. em Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 3, p. 421- 429, 2002.

SUASSUNA, T. D. F. et al. Selfincompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, n. 2, p. 298-302, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 848 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Artmed Editora S. A., Porto Alegre, Brasil, 2004, 719 p.

TAKAYAMA; ISOGAL. Self-incompatibility in plants. **Annual Review of Plant Biology**. v. 56. p.467-489. 2005.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. Meiosis in elephant grass (*Pennisetum purpureum*), pearl millet (*Pennisetum glaucum*) (Poaceae, Poales) and their interspecific hybrids. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 353-362, 2006.

THORPE, T.A. Morphogenesis and regeneration. In: VASIL, K.I.; THORPE, T.A.(Eds.) **Plant cell and tissue culture**. Kluwer Academic: Netherlands, p.17-36, 1994.

TIKUNOV, Y. M.; KHRUSTALEVA, L. I.; KARLOV, G. A application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon*. **Euphytica**, v. 131, p. 71-81, 2003.

TWELL, D. Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: vegetative cell ablation blocks generative cell migration. **Protoplasma**, v. 187, p. 144-154, 1995.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. **Passiflora - Passionflowers of the world**. Portland: Timber Press, 2004, 430p.



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

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

VARASSIN, I. G.; SILVA, A. G. A melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (*Passifloraceae*), em vegetação de restinga. **Rodriguésia**, v. 50, n. 76-77, p. 5-17, 1999.

VARGAS, S. M. et al. Caracterização meiótica de *C. argentea*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 50, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Costão do Santinho Resort, 2004.

VARSHNEY, R.K.; GRANER, A.; SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2005.

VIANA, A. P. et al. Diversidade genética entre genótipos comerciais de Maracujazeiro-Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre espécies de passifloras nativas determinadas por marcadores RAPD. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 25, p. 489-493, 2003.

VIANA, A. J. C.; SOUZA, M. M. Identification of the pattern of heterochromatin distribution in *Passiflora* species with C-banding. **Genetics and Molecular Research**. v.9, p. 1908-1913, 2010.

VIEIRA, E. A. et al. Associação da distância genética em trigo estimada a partir de caracteres morfológicos, caracteres fenológicos e dos componentes do rendimento de grãos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.13, p.161-168. 2007.

WOLFF, K.; ZIETKIEWICZ, E.; HOFSTRA, H. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, p. 439-447, 1995.

XI, Z. Y. et al. Characterization of donor genome contents of backcross progenies detected by SSR markers in rice. **Euphytica**, v.160, p. 369-377, 2008.

YANG, X.; ZHANG, X. Regulation of Somatic Embryogenesis in Higher Plants. **Plant Science**, v.29, p. 36-57, 2010.

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

ZHANG, Y. X.; LESPINASSE, Y. Haploids. In: HAMMERSCHLAG, F. A.; LITZ, R. E. (Ed.). **Biotechnology of perennial fruit crops**. Cambridge: University Press, 1992. p. 57-76.

ZHAO, L. et al. Assessment of the genetic diversity and genetic relationships of *Lilium* in China using ISSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 184-189, 2014.

ZIETKIEWICZ E.; RAFALSKI A.; LABUDA D. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**. v. 20, p. 176-183, 1994.

ZUCARELLI, V.; HENRIQUE, L. A. V.; ONO, E. O. Influence of light and temperature on the germination of *Passiflora incarnata* L. seeds. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 162-167, 2015.

ZUCARELLI, V. et al. 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.