

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CITOGENÉTICA DAS
ESPÉCIES SILVESTRES DE *Passiflora*.

LARISSA SOUZA VIANNA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2019

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CITOGENÉTICA DAS
ESPÉCIES SILVESTRES DE *Passiflora*.

LARISSA SOUZA VIANNA

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Orientador: Prof^a. Telma Nair Santana Pereira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

V617

Vianna, Larissa Souza.

Caracterização molecular e citogenética das espécies silvestres de Passiflora /
Larissa Souza Vianna. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

92 f. : il.

Bibliografia: 59 - 80.

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias, 2019.

Orientadora: Telma Nair Santana Pereira.

1. Delimitação entre espécies . 2. Cromossomo. 3. Pacifloracea. 4. Taxonomia .
5. Marcadores moleculares. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy
Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CITOGENÉTICA DAS
ESPÉCIES SILVESTRES DE *Passiflora*.

LARISSA SOUZA VIANNA

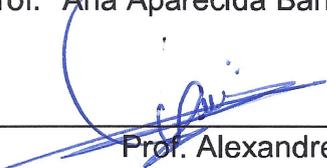
“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Aprovada em 22 de fevereiro de 2019.

Comissão Examinadora:



Prof.^a Ana Aparecida Bandini Rossi (D.Sc., Genética e Melhoramento) - UNEMAT


Prof. Alexandre Pio Viana (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF


Prof. Messias Gonzaga Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) - UENF


Prof.^a Telma Nair Santana Pereira (Ph.D., Melhoramento de Plantas) - UENF
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Nilza e Manoel. A minha luta, sempre foi a de vocês. A minha vitória, será eternamente nossa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e coragem na superação de muitas das dificuldades encontradas ao longo do curso.

À Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realizar o doutorado e a FAPERJ pela concessão da bolsa e apoio à pesquisa.

Aos meus pais, que acreditaram nas minhas escolhas e sempre me apoiaram. Sem eles, eu não teria condições de sonhar este sonho, sequer realiza-lo.

A minha orientadora, Telma, por todo apoio e orientação em todos esses anos e principalmente pela perseverança e dedicação à profissão. Obrigada pelos ensinamentos que contribuíram para minha formação acadêmica, profissional e pessoal! Obrigada por me mostrar que a ética é umas das principais qualidades para a formação do bom professor e pesquisador.

Aos meus conselheiros, Dr. Alexandre Pio Viana e Dr. Messias Gonzaga Pereira por todos os ensinamentos, pela disponibilidade e considerações.

À Dr^a. Ana Aparecida Bandini Rossi pela doação de sementes de espécies objeto deste estudo.

Aos professores e pesquisadores do Programa de Pós-Graduação em Genética e melhoramento de Plantas - UENF, pelos valiosos ensinamentos transmitidos.

Aos meus amigos de laboratório pelos momentos compartilhados, contribuições, convívio e companheirismo, Maria Lorraine, Nádia, Sara, Rodrigo e Elba.

À Dr^a. Eileen pela colaboração direta na realização do trabalho, pela disponibilidade e ajuda para desenvolver parte do meu trabalho e por ter se tornado uma grande amiga.

À Marcela que me auxiliou nos trabalhos de laboratório e que se tornou uma pessoa especial na minha vida.

Ao secretário Daniel, que sempre está disponível para tirar dúvidas e ajudar da forma que pode.

Aos amigos que estiveram presentes durante esses quatro anos me dando apoio e amizade; Paola, Thábata, Samuel, Valter, Daniela e tantos outros que de alguma forma fizeram parte dessa caminhada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Geral:	4
2.2. Específicos:	4
3. CAPÍTULOS	5
3.1. MARCADORES ISSR E SSR NA DETERMINAÇÃO DAS RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE ESPÉCIES SILVESTRES DE <i>Passiflora</i>	5
3.1.1. INTRODUÇÃO	5
3.1.2. REVISÃO	7
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1.5. CONCLUSÕES	24
3.2. DETERMINAÇÃO CARIOTÍPICA EM <i>Passiflora cristalina</i> e <i>Passiflora miniata</i> (PASSIFLORACEA)	25
3.2.1. INTRODUÇÃO	25
3.2.2. REVISÃO	27
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.2.5. CONCLUSÕES	42

3.3. SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DAS ESPÉCIES SILVRESTRES <i>P. cristalina</i> , <i>P. miniata</i> e <i>P. coccinea</i>	43
3.3.1. INTRODUÇÃO.....	43
3.3.2. REVISÃO.....	45
3.3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
3.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.2.4. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

RESUMO

VIANNA, Larissa Souza; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2019; Caracterização molecular e citogenética das espécies silvestres de *Passiflora*; Orientadora: Prof^a. Telma Nair Santana Pereira; Conselheiros: Prof. Alexandre Pio Viana e Prof. Messias Gonzaga Pereira.

Passiflora cristalina, *Passiflora coccinea* e *Passiflora miniata* são espécies silvestres, que apresentam caracteres florais similares, em especial a cor e estrutura floral, bem como os frutos. Tal semelhança representa um problema para os estudos taxonômicos, surgindo à necessidade do uso de ferramentas robustas que venham corroborar ou até reclassificar as espécies. Os objetivos desse estudo foram: a) delimitar as espécies silvestres via marcadores ISSR e SSR; b) verificar a natureza híbrida de *P. cristalina* utilizando marcadores SSR; c) determinar o cariótipo de *P. cristalina* e *P. miniata*; e d) avaliar as condições de temperaturas e reguladores vegetais na germinação de sementes das três espécies. O primeiro capítulo refere-se às análises moleculares, e para tal o DNA genômico foi extraído de amostras foliares de *Passiflora* (*P. cristalina*, *P. miniata*, *P. coccinea*, *P. setacea* e *P. edulis*). Dezoito *primers* ISSR apresentaram produtos de amplificação satisfatória, um total de 81 bandas foram amplificadas com uma percentagem de 99% de polimorfismo. A distância genética e a análise de agrupamento permitiram observar que as espécies *P. cristalina* e *P. coccinea* são geneticamente próximas, enquanto que *P. miniata* ficou em um grupo isolado, porém apresentando baixo valor de dissimilaridade com a espécie *P. cristalina*. Dezoito *primers* SSR foram polimórficos, equivalendo uma taxa de 95,65% de transferibilidade, sugerindo que

o sucesso da amplificação heteróloga deve-se à proximidade evolutiva entre táxons. Por meio das análises de coordenadas principais (PCA), de distância genética e de agrupamento observou-se uma clara separação entre as espécies que apresentam características florais similares (*P. cristalina*, *P. coccinea* e *P. miniata*) das demais. *P. cristalina* foi indicada como sendo um possível híbrido natural entre *P. miniata* e *P. coccinea*. O segundo capítulo refere-se a determinação do cariótipo das espécies de *P. cristalina* e *P. miniata*, que após o uso do protocolo de rotina confirmou que as duas espécies são diploides com $2n = 2x = 18$ cromossomos, todos do tipo metacêntrico (9II M). O Comprimento do Lote Haploide (CLH) foi de 22,91 e 24,25 e os cariótipos foram considerados simétricos com valores de 42,26 e 43,42 em *P. miniata* e *P. cristalina*, respectivamente. No terceiro capítulo foi possível verificar que o regulador vegetal KNO_3 na concentração 2% foi eficiente na superação da dormência das três espécies, notou-se também que a concentração de 0% não houve germinação das sementes, demonstrando que KNO_3 favoreceu o processo germinativo das sementes. O GA_3 na concentração de 1.5000 mg L^{-1} foi eficaz para quebrar a dormência das sementes de *P. miniata*, para as demais espécies não houve diferença significativa na concentração supracitada, no entanto, as mesmas obtiveram um melhor percentual de germinação quando comparadas com as sementes controle. A temperatura alternada de 20-35°C proporcionou valores mais expressivos de germinação para as três espécies, resultado este atribuído ao fato de que a temperatura alternada simula as condições de ambiente onde as espécies encontram-se melhor adaptada. Mediante ao contexto, conclui-se que os dados citológicos não permitiram diferenciar as espécies, entretanto as análises moleculares permitiram tal diferenciação sugerindo que *P. miniata* e *P. cristalina* são espécies distintas apesar de geneticamente próximas; que o uso de regulador vegetal e condições alternadas de temperatura são considerados eficientes para uma melhor germinação das sementes, no entanto, sugere-se realizar um experimento num esquema fatorial, a fim de avaliar os efeitos de todos os tratamentos simultaneamente e a interação entre eles.

ABSTRACT

VIANNA, Larissa Souza; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2019; Molecular and cytogenetic characterization of wild species of *Passiflora*; Advisor: Prof^a.Telma Nair Santana Pereira; Committee members: Prof. Alexandre Pio Viana and Prof. Messias Gonzaga Pereira.

Passiflora cristalina, *Passiflora coccinea* and *Passiflora miniata* are wild species that have similar floral characters, especially floral color and structure, as well as their fruits. Such similarity embodies a problem for taxonomic studies and, along with that, the necessity to use robust tools that can corroborate or even reclassify the species. The objectives of this study were: a) delimiting wild species via ISSR and SSR markers; b) verify the hybrid nature of *P. cristalina* using SSR markers; c) determining the karyotype of *P. cristalina* and *P. miniata*; d) evaluate the temperature conditions and plant regulators in seed germination of the three species. The first chapter refers to the molecular analyzes, and for this, the genomic DNA was extracted from *Passiflora* foliar samples (*P. cristalina*, *P. miniata*, *P. coccinea*, *P. setacea* and *P. edulis*). Eighteen ISSR primers presented satisfactory amplification products and a total of 81 bands were amplified with a 99% percentage of polymorphism. Genetic distance and cluster analysis allowed us to observe that the species *P. cristalina* and *P. coccinea* are genetically close, while *P. miniata* was in an isolated group, but presenting a low dissimilarity value with *P. cristalina* species. Eighteen SSR primers were polymorphic, the equivalent to a rate of 95.65% transferability, suggesting that the success of heterologous amplification is due to the evolutionary proximity between taxa. By means of the Principal

Coordinates analysis (PCA) of genetic distance and clustering, a clear separation between the species with similar floral characteristics (*P. cristalina*, *P. coccinea* and *P. miniata*) from the others was observed. *P. cristalina* was indicated as being a possible natural hybrid between *P. miniata* and *P. coccinea*. The second chapter refers to the determination of the karyotype of the species of *P. cristalina* and *P. miniata*, which after the routine protocol confirmed that the two species are diploids with $2n=2x=18$ chromosomes, all metacentric type (9II M). The length of the Haploid lot (LHL) was 22.91 and 24.25 and the karyotypes were considered symmetrical with values of 42.26 and 43.42 in *P. miniata* and *P. cristalina*, respectively. In the third chapter it was possible to verify that the plant regulator KNO_3 with a 2% strength was efficient in overcoming the dormancy of the three species, it was also noticed that in the 0% strength was no germination of the seeds, demonstrating that KNO_3 favored the germinative process of the seeds. The GA_3 in the concentration of 1.5000 mg L^{-1} was effective to break dormancy of the *P. miniata* seeds; for the other species, there was no significant difference in the concentration mentioned above, however, it was obtained a better percentage of germination when compared with the control seeds. The alternating temperature of 20-35°C provided more expressive values of germination for the three species, a result attributed to the fact that the alternating temperature simulates the environment conditions where the species are better adapted. By means of the context, it is concluded that the cytological data did not allow to differentiate the species, however the molecular analyzes allowed such differentiation suggesting that *P. miniata* and *P. cristalina* are distinct species although genetically close; that the use of plant regulators and alternating temperature conditions are considered efficient for a better germination of the seeds, however, it is suggested to perform an experiment in a factorial scheme, in order to evaluate the effects of all the treatments simultaneously and the interaction between them.

1. INTRODUÇÃO

A família Passifloraceae é predominantemente encontrada nas áreas tropicais e subtropicais das Américas e África, contém 18 gêneros, sendo o gênero *Passiflora* o mais rico em número de espécies, compreendendo 534 espécies (The Plant List, 2016).

Devido esta ampla variabilidade e complexidade morfológica do gênero, os estudos taxonômicos, encontram-se incipientes, havendo lacunas a serem preenchidas. Aliado a isto, há o fato de que a maioria dos estudos taxonômicos em *Passiflora* são baseados unicamente em características morfológicas, gerando dúvidas quanto a correta classificação taxonômica de algumas espécies, pois, tal caracterização apresenta a desvantagem de ser influenciada pelos fatores ambientais, logo, podem não representar a real similaridade ou diferenças entre os indivíduos (Ferreira; Grattapaglia, 1998).

No Brasil, ocorrem quatro gêneros sendo: *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L., contabilizando um total de 139 espécies, sendo 87 endêmicas (Bernacci et al., 2008; Bernacci et al., 2014). Novas espécies de *Passiflora* ainda vêm sendo descritas e cerca de 90% delas são nativas das Américas; neste contexto, estudos taxonômicos são de suma importância (MacDougal, 2011).

Passiflora miniata, descrita por Vanderplank (2006) pertence ao subgênero *Passiflora*, supersecção Coccinea, e tem sua origem e distribuição na região Amazônica (Peru, Brasil e Colômbia) e nas Guianas (Lim, 2012). Apresenta flor de

coloração vermelha e possui 3 séries de filamentos da coroa com coloração púrpura e seus frutos são pequenos e variegados com coloração verde e creme (vanderplank, 2006).

Passiflora cristalina pertence à supersecção Diasthephana do subgênero *Passiflora* e foi encontrada no Parque Estadual do Cristalino, no nordeste do estado do Mato Grosso. Apresenta flores de coloração vermelha e possui 2 séries de filamentos da coroa com coloração variando de vermelho a rosa, apresenta frutos pequenos variegados de verde escuro e creme (Vanderplank; Zappi, 2011).

Passiflora coccinea é encontrada na condição natural nas Guianas, Venezuela, bacia Amazônica, Peruana, Bolívia e Brasil, pertence ao subgênero *Passiflora*, supersecção Diasthephana apresenta flores de coloração vermelha-escarlata com 2 séries de filamentos roxos ou brancos-róseos na coroa, possui frutos com casca de fundo verde variegado e com faixas longitudinais (Vanderplank, 2000). As três espécies apresentam uma grande similaridade morfológica, em especial a cor e estrutura floral, bem como os frutos, apresentando como principal diferença o número e coloração das séries de filamentos na coroa (Vanderplank, 2006).

As espécies silvestres têm atraído à atenção dos melhoristas devido ao potencial genético, pois podem ser consideradas como repositórios de genes de interesse, como genes de resistência a doenças e/ou pragas e características agrônomicas de interesse (Junqueira et al., 2006; Souza et al., 2008; Meletti, 2011, Santos et al., 2014b)). Em razão disso, para serem usadas em programas de melhoramento genético deve-se ter sua taxonomia bem definida, para que a transferência de genes importantes que estão ausentes na forma cultivada seja bem sucedida (Hajjar; Hodgkin, 2007), faz-se necessário que as espécies genitoras sejam geneticamente próximas (Pereira et al., 2005). Contudo, tais avaliações podem ser realizadas utilizando metodologias moleculares (Pádua, 2005; Hansen et al., 2006); citológicas (Melo et al., 2001; Cucco et al., 2005) e morfológicas (Lorenzi et al., 2006; Bellon et al., 2007).

Espécies com grande semelhança morfológica representam um problema para os estudos taxonômicos, surgindo assim à necessidade de metodologias eficazes que venham corroborar, complementar ou até mesmo redefinir organizações vigentes.

Os marcadores moleculares são altamente viáveis para se estudar as relações genética entre espécies, por permitir estimar, a nível de DNA, a distância genética inter e intraespecífica (Faleiro et al., 2003). Entre os marcadores moleculares, os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) são considerados informativos em estudos sobre diversidade genética (Bornet; Branchard, 2002). Vários autores em seus trabalhos com as espécies do gênero *Passiflora*, utilizando tais marcadores, relataram elevado nível de polimorfismo (Santos et al., 2011, Costa et al., 2012, Sousa et al., 2015).

Já os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) têm se tornado o tipo de marcador mais utilizado, devido ao alto conteúdo informativo que este proporciona (Oliveira et al., 2006). Apresenta como desvantagem, o fato de ser espécie-específico, porém o potencial de transferibilidade de *primers* entre espécies do mesmo gênero permiti sua utilização (Bravo, 2006).

Em *Passiflora*, o estudo dos cromossomos (Melo et al., 2001; Cucco et al., 2005) ou abordagens da biologia molecular (Pádua, 2005; Hansen et al., 2006) têm permitido uma melhor caracterização dos indivíduos dentro dos grupos taxonômicos. Estudos cromossômicos têm sido utilizados na determinação das relações filogenéticas e evolutivas entre grupos de plantas (Raven, 1975; Singh, 2003). A determinação do cariótipo pode ter um papel importante na reorganização da taxonomia vegetal, principalmente na caracterização de diferentes táxons. Em geral, espécies geneticamente próximas apresentam cariótipos semelhantes, por outro lado, espécies distantes apresentam cariótipos mais divergentes (Sumner, 2003).

Ademais, as espécies silvestres apresentam dificuldades na germinação e consequente obtenção de mudas que é dificultada pela dormência em suas sementes. Entretanto, existem procedimentos que podem acelerar e uniformizar a germinação das sementes de *Passifloras*, tais como o uso de reguladores de crescimento e técnicas de escarificação (mecânica, química e/ou térmica) (SOUZA et a., 2009; PÁDUA et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Caracterizar espécies silvestres de *Passiflora* utilizando metodologias moleculares e citogenéticas para melhor delimitação taxonomia entre as mesmas; avaliar a germinação e a eficiência de procedimentos pré-germinativos em sementes dessas espécies.

2.2. Específicos:

i) estimar a distância genética entre cinco espécies do gênero *Passiflora* (*P. cristalina*, *P. miniata*, *P. coccinea*, *P. edulis* e *P. setacea*), utilizando marcadores ISSR e SSR;

ii) acessar o potencial de transferibilidade dos marcadores microssatélites em detectar polimorfismos em genótipos de *Passiflora*;

iii) verificar, mediante a comparação dos padrões de bandas, à natureza híbrida de *P. cristalina*, por meio de marcador molecular do tipo SSR;

iv) determinar o cariótipo e gerar dados citológicos das espécies *P. cristalina* e *P. miniata* via coloração convencional; e

vi) avaliar as condições de temperaturas e reguladores vegetais na germinação de sementes de *P. cristalina*, *P. coccinea* e *P. miniata*.

3. CAPÍTULOS

3.1. MARCADORES ISSR E SSR NA DETERMINAÇÃO DAS RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE ESPÉCIES SILVESTRES DE *Passiflora*¹

3.1.1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o maior centro de diversidade genética do gênero *Passiflora* L., e também o centro de origem de aproximadamente 139 espécies (Bernacci et al., 2008; Bernacci et al., 2014), sendo considerado o gênero de maior importância da família Passifloraceae. Apesar de possuir centenas de espécies, somente duas são cultivadas comercialmente para a produção dos frutos, *P. alata* Curtis e *P. edulis* Sims (Bernacci et al. 2008).

Com a ampla variabilidade genética interespecífica e intraespecífica que ocorre naturalmente aliado ao grande número de espécies de *Passiflora*, a delimitação taxonômica tem sido dificultada. Estudo acerca da variabilidade genética do gênero *Passiflora* vem sendo realizados por alguns autores, dentre eles Ferreira e Oliveira (1991), Ferreira e Grattapaglia (1998), Viana et al. (2003), Castellen et al. (2005), Faleiro et al. (2005) e Bellon et al. (2007), onde a maioria

¹ Artigo aceito e em via de publicação na *Genetics and Molecular Research*

baseia-se na caracterização morfológica da planta, no entanto, espécies muito semelhantes apresentam diferenças morfológicas difíceis de serem observadas e caracterizadas, sendo necessária a adoção de análises genéticas para uma melhor delimitação entre os táxons (Hansen et al., 2006; Lorenzi et al., 2006; Bellon et al., 2007).

O polimorfismo genético obtido por meio de marcadores moleculares pode ser usado no estudo genômico comparativo de diversas culturas e populações, sendo aplicável também na identificação de germoplasma (Xi et al., 2008), inferência da diversidade genética (Sawadogo et al., 2009), proteção de cultivares (Isshiki et al., 2008). Os diversos marcadores moleculares diferem entre si pela capacidade de detectar o polimorfismo ao nível de dominância e codominância, especificidade, reprodutibilidade e custo (Collard; Mackill, 2009).

Entre os marcadores moleculares, os marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) mostram ser informativos em estudos sobre diversidade genética (Bornet; Branchard, 2002), relações filogenéticas e evolutivas (Reddy et al., 2002) e na caracterização de acessos e cultivares, pois, permite uma diferenciação rápida entre indivíduos, devido ao elevado grau de polimorfismo e baixo custo (Borba et al., 2005). É uma técnica simples, eficiente e possui alta reprodutibilidade. O ISSR é um marcador baseado em microssatélite, dominante, que não necessita do conhecimento prévio do genoma. Vários autores, em seus trabalhos com as espécies do gênero *Passiflora* utilizando marcadores ISSR relataram elevado nível de polimorfismo (Santos et al., 2011; Costa et al., 2012; Sousa et al., 2015).

Já os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) têm se tornado o tipo de marcador mais utilizado devido às suas propriedades, em especial ao alto conteúdo informativo que este proporciona (Oliveira et al., 2006). Estes são reproduzíveis, codominantes, altamente polimórficos e com uma distribuição frequente e aleatória, o que permite uma ampla cobertura do genoma (Litt; Luty, 1989; Selkoe; Toonen, 2006). Por outro lado, o maior obstáculo dos marcadores microssatélites é que eles são específicos para cada espécie, no entanto, o potencial de transferibilidade de *primers* entre espécies do mesmo gênero e gênero relacionados permite a aplicação da técnica utilizando iniciadores desenvolvidos para espécies correlacionadas (Varshney, 2005; Bravo, 2006).

O presente trabalho visou estimar a distância genética entre cinco espécies do gênero *Passiflora* (*P. cristalina*, *P. miniata*, *P. coccinea*, *P. edulis* e *P. setacea*), utilizando marcadores ISSR e SSR, para uma melhor delimitação taxonômica entre essas espécies e averiguar a possível natureza híbrida de *P. cristalina*, através da comparação dos padrões de bandas gerados com os marcadores moleculares do tipo SSR.

3.1.2. REVISÃO

3.1.2.1. Família Passifloraceae

Passifloraceae é uma família de angiospermas dicotiledôneas, pertencente à ordem Malpighiales, com distribuição neotropical, encontrada preferencialmente nas regiões de clima quente da América, apresentando menor diversidade na Ásia, África do Sul, Nova Zelândia e Austrália e apenas uma espécie em Madagascar. Seus membros possuem como *habitats* mais comuns as florestas tropicais, savanas e várzeas, ocorrendo geralmente em regiões de baixas e médias altitudes (Feuillet; Macdougall, 2003).

Durante muito tempo, a família foi taxonomicamente considerada como membro da ordem Parietales, próximo às famílias Malesherbiaceae, Turneraceae e Flacourtiaceae (Wettstein, 1935). Em seguida, Bentham e Hooker (1867) em seus estudos reclassificaram Passifloraceae na ordem Passiflorales, relacionada com Loasaceae, Turneraceae e Malesherbiaceae. Posteriormente, os autores Engler (1894) e Cronquist (1981) baseando-se em características morfológicas, incluíram a família como membro da ordem Violales, próximo a Flacourtiaceae, Violaceae, Scyphostegiaceae, Turneraceae, Achriaceae e Malesherbiaceae.

Após a incorporação de dados moleculares nas análises filogenéticas, a família Passifloraceae passou a integrar à ordem Malpighiales e está morfológicamente relacionada à família Turneraceae e Malesherbiaceae (Stevens, 2001; APGIII, 2009).

Os membros pertencentes à família Passifloraceae se unem por compartilharem uma série de características morfológicas, como a presença de

gavinhas auxiliares, coroa de estaminódios, folhas alternas, glândulas extraflorais ou nectários, androginóforo e sementes ariladas (Feuillet, 2004). O clado apresenta uma elevada diversidade no tamanho e na forma das folhas, assim como no tamanho, forma e coloração das flores. Os frutos, comumente, são arredondados ou alongados, variando em coloração do verde ao alaranjado possuindo sementes pretas e achatadas, geralmente envolvidas por um arilo gelatinoso e translúcido (Jorgensen et al., 1984).

Os estudos acerca da caracterização e organização da família foram primitivamente realizados pelos botânicos Ellsworth; Paine; Killip, em seu trabalho “*The American species of Passifloraceae*”, publicado em 1938. Apesar de mais de 75 anos já terem se passado e cerca de 120 novas espécies terem sido descritas, desde então, ainda não há consenso em relação ao número total de espécies que compõem a família. De acordo com o autor e a metodologia utilizada na classificação taxonômica do grupo, o número de membros pode variar de cerca de 530 espécies, como proposto por Watson e Dallwitz (1992) a 700 espécies, como proposto por Feuillet (2004). Também existe pouca conformidade em relação número de gêneros em que a família se divide, podendo variar de 18 gêneros, como proposto por Watson e Dallwitz (1992) e Feuillet (2004), até 23 gêneros, segundo a classificação proposta por Barroso et al. (1978).

Na América do Sul ocorrem duas espécies do gênero *Ancistrohyrsus*, seis espécies do gênero *Dilkea*, três espécies pertencentes ao gênero *Mitostemma* e mais de 534 espécies pertencentes ao gênero *Passiflora*. No Brasil ocorrem cerca de 139 espécies de *Passifloras*, a maioria subordinada ao gênero *Passiflora* L. (The Plant List, 2016).

3.1.2.2. Gênero *Passiflora*

A classificação mais abrangente para o gênero foi proposta por Killip (1938) em seu trabalho “*The American Species of Passifloraceae*”, considerado o estudo mais completo para o gênero *Passiflora* (Vanderplank, 2000). Nesse estudo, foram relatadas 355 espécies distribuídas em 22 subgêneros, e mais 145 espécies descritas foram acrescentadas. No entanto, Ulmer e MacDougal (2004) baseadas em caracteres morfológicos propuseram uma reclassificação das espécies pertencentes ao gênero *Passiflora*, agrupando-as em quatro subgêneros

(*Astropheae*, *Decaloba*, *Deidamiodes* e *Passiflora*), reorganizado da seguinte maneira: a) *Astropheae*, com cerca de 55 espécies; b) *Decaloba*, com mais de 200 espécies; c) *Deidamiodes*, com 16 espécies agrupando três subgêneros, uma seção e o gênero *Tetrastylis*; e d) *Passiflora*, com mais de 220 espécies sendo considerado o gênero mais representativo (Ulmer; MacDougal, 2004).

Posteriormente, Muschner et al. (2006) e Hansen et al. (2006), em seus estudos independentes acerca da sistemática filogenética, utilizando marcadores plastidiais, mitocondriais e nucleares corroboraram total ou parcialmente a classificação proposta por Ulmer e MacDougal (2004). Vale ressaltar que a sistemática do gênero *Passiflora* ainda não se encontra bem resolvida, existindo divergências entre taxonomistas e sistematas, em relação ao número de espécies do gênero (Muschner et al., 2006; Hansen et al., 2006).

Diversos são os trabalhos acerca da variabilidade genética inter e intraespecífica existente no gênero *Passiflora* (Ferreira; Oliveira, 1991; Alexandre et al., 2005; Meletti et al., 2005). Nativo da América do Sul, o gênero *Passiflora* apresenta ampla variabilidade genética distribuída no território brasileiro, principalmente na Região Centro Norte do país, sendo considerado o maior e principal centro de diversidade genética do gênero, agregando precisamente 139 espécies (Bernacci et al., 2014), onde 87 destas espécies são endêmicas da flora nacional, colocando o país em uma posição privilegiada em relação aos recursos genéticos do gênero (Fajardo et al., 1998; Viana et al., 2003; Cervi et al., 2010).

Apesar da ampla variabilidade genética existente no gênero *Passiflora*, os cultivos comerciais do Brasil baseiam-se em duas espécies, o maracujá-azedo (*Passiflora edulis*), que representa mais de 90% dos pomares, pela qualidade dos seus frutos, vigor, produtividade e rendimento em suco e o maracujá-doce (*Passiflora alata*) (Meletti; Bruckner, 2001; Meletti, 2011; Oliveira et al., 2013a; Viana et al., 2016). Esta ampla diversidade vem sendo comprometida devido à expressiva redução das áreas florestais, ocasionada especialmente pelos processos de desmatamento que ocorrem em consequência da urbanização (Bernacci et al., 2005).

O gênero é constituído por trepadeiras de hábito lenhoso ou herbáceo, com gavinhas, raramente eretas, arbustos, árvores ou lianas (Nunes; Queiroz, 2006). Além disso, as plantas desse gênero possuem caules eretos, cilíndricos, lisos ou pilosos, angulados, angular-estriados, angular-alados, poucos são achatados

(Vanderplank, 2000). Na maioria das espécies, as folhas possuem tamanho e forma variada, simples, alternas, elípticas ou orbiculares, inteiras ou lobadas, pecíolo com ou sem glândulas (Feuillet; Macdougall, 2007). As gavinhas são comumente solitárias e se desenvolvem nas axilas das folhas, porém são ausentes em espécies lenhosas (Cunha et al., 2002).

As flores são geralmente hermafroditas e de simetria radial apresentando uma ampla variação de formas e cores, variando de branco a vermelho intenso. Possuem o cálice tubuloso herbáceo ou subcarnoso, com cinco sépalas carnosas, membranáceas ou coriáceas. A corola apresenta cinco pétalas membranáceas (brancas ou coloridas), alternadas as sépalas, suavemente concrecida na base ou livres. A corona consiste de uma até várias linhas de filamentos situadas em verticilos, projeções ou membranas, e nasce no ápice da superfície interna do hipanto, localizando-se entre o androginóforo e o perianto, sendo usualmente colorida, o que é um caráter com importância fundamental para a caracterização das espécies. Esta variação de cores parece estar destinada à atração de insetos e pássaros, colaborando assim com a polinização das flores (Vanderplank, 2000; Ulmer; MacDougall, 2004).

Os frutos, habitualmente apresentam-se em forma de bagas indeiscentes ou cápsulas deiscentes, globosos ou ovoides, com coloração amarela, no entanto, existem frutos com coloração vermelha ou roxa (Vanderplank, 2000; Ulmer; MacDougall, 2004), são envolvidos por casca de texturas coriácea, quebradiça e lisa, as quais protegem as sementes, que são envolvidas em arilo mucilaginoso (Nunes; Queiroz, 2006, Bernacci et al., 2008).

3.1.2.3. Caracterização genética com base em marcadores moleculares

A biologia molecular tem fornecido ferramentas valiosas para uma detalhada análise genética de organismos superiores. O desenvolvimento de diversas técnicas moleculares, nas últimas décadas, permitiu o surgimento de várias classes de marcadores capazes de evidenciar polimorfismos genéticos, a partir da análise direta do DNA (Varshney et al., 2005).

Marcadores moleculares representam qualquer dado molecular correspondente a regiões expressas ou não do genoma, capazes de evidenciar polimorfismo entre os indivíduos analisados (Ferreira; Grattapaglia, 1998; Faleiro,

2007).

As técnicas moleculares são empregadas para diversos propósitos, como: em *fingerprinting* de genótipos, estudos de diversidade genética e mapeamento, avaliação de estrutura populacional (Rauscher; Simko, 2013).

Os usos de marcadores moleculares têm sido de grande valia, pois somente a aplicação de métodos clássicos morfoagronômico em programas de melhoramento leva muito tempo para chegar a algum resultado prático, especialmente quando se trata de uma espécie semiperene, caso do maracujazeiro, além de demandar grandes espaços experimentais. Os marcadores revelam diferenças genéticas a nível de DNA apresentando um maior nível de detalhamento e, sem as interferências causadas pelo efeito ambiental, oferecendo vantagens em termos de discriminação e rapidez (Rauscher; Simko, 2013).

Existem vários marcadores moleculares disponíveis para os mais diversos tipos de culturas, tanto marcadores codominantes (polimorfismos de isoenzimas, microssatélites) quanto dominantes, dentre eles ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP (*Amlified Fragment Length Polymorphism*) (Reddy et al., 2002; Ganga et al., 2004; Isshiki et al., 2008; Oliveira et al., 2008).

A escolha de um marcador molecular depende de vários fatores, como a disponibilidade do marcador para a espécie em estudo, nível de polimorfismo apresentado pelo marcador, disponibilidade de informação do genoma da espécie alvo, habilidades técnicas, custo da análise, disponibilidade de equipamentos, entre outros (Souza et al., 2008).

Os marcadores SSR são sequências simples repetidas em *tandem*, as quais consistem de um a seis nucleotídeos. Estas regiões são conhecidas como SSR's (*Simple Sequence Repeats*) ou STR's (*Short Tandem Repeats*) e estão presentes no genoma de eucariotos e procariotos (Field; Wills, 1996). As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites são, geralmente, conservadas entre os indivíduos de uma mesma espécie permitindo a seleção de *primers* específicos e possibilitando a amplificação dos fragmentos que contêm o DNA repetitivo em diferentes genótipos (Borém; Caixeta, 2009).

Os marcadores SSR são os que mais se destacam nos estudos da diversidade genética, por serem considerados altamente informativo (Oliveira et al., 2006), por apresentarem uma alta reprodutibilidade, e serem amplamente

distribuídos no genoma, pelo potencial para automação e por não necessitar de grande quantidade de DNA para as análises e a possibilidade de serem transferíveis entre espécies de um mesmo gênero ou gêneros relacionados (Kumar et al., 2009; Ince et al., 2010).

No entanto, o uso dessa tecnologia engloba algumas limitações, demandando um vasto conhecimento das sequências de DNA, o que significa um substancial investimento de tempo e dinheiro para o desenvolvimento destes marcadores. Entretanto, a proximidade evolutiva entre as espécies permite a transferência de iniciadores desenvolvidos de uma espécie para outra (amplificação heteróloga), uma vez que espécies relacionadas possuem homologia nas regiões flanqueadoras das repetições microssatélites (Barbará et al., 2007; Oliveira et al., 2006).

Cerqueira-Silva et al. (2008) avaliaram a transferibilidade de 25 *primers* SSR desenvolvidos para *P. edulis* para 13 espécies de *Passifloras* distintas e observaram um percentual de amplificação cruzada variando entre 32 a 76%, sendo que nove das 13 espécies apresentaram amplificação superior a 62%.

Os trabalhos com o uso de marcadores SSR em maracujazeiro estão voltados para identificação e caracterização de locos (Pádua et al., 2005; Pereira, 2010; Cazé et al., 2012; Penha et al., 2013; Oliveira et al., 2013b; Santos et al., 2014b, Cerqueira-Silva et al., 2014a), inserção de marcas em mapas genéticos previamente construídos (Oliveira et al., 2008; Pereira et al., 2013) e na diversidade genética (Oliveira et al., 2013b; Paiva et al., 2014b; Cequeira-Siva et al., 2014b).

Já os marcadores ISSR são uma dentre muitas técnicas de *fingerprinting* baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que utiliza *primers* de sequência simples repetitiva para amplificar regiões entre sequências alvo. Esta técnica tem a capacidade de gerar um grande número de marcadores, os quais podem ser aplicados para analisar praticamente qualquer organismo, mesmo aqueles para os quais se dispõe de pouca ou nenhuma informação genética prévia (Arcade et al., 2000).

O uso de marcadores ISSR é conhecido por serem altamente reprodutíveis, polimórficos, informativos, rápidos de usar e pouco onerosos. A limitação dessa classe de marcadores está relacionada ao fato de serem dominantes que impossibilita estabelecer relações alélicas entre os indivíduos (Zietkiewicz et al., 1994, Bornet; Branchard, 2002; Bornet et al., 2002).

Estes marcadores são dominantes, presentes entre duas sequências idênticas de microssatélites, orientados em direções opostas (Reddy et al., 2002). O tamanho dos *primers* varia entre 16 a 20 pares de bases, e os produtos amplificados podem variar entre 100 a 3.000 pares de base, tanto em gel de agarose quanto em gel de poliacrilamida (Faleiro, 2007).

Vários autores, em seus trabalhos com as espécies do gênero *Passiflora* utilizando marcadores ISSR relataram elevado nível de polimorfismo (Santos et al., 2011; Costa et al., 2012). Santos et al. (2011) avaliaram a diversidade genética de maracujá-doce e azedo utilizando marcador ISSR, encontrando um alto número de polimorfismo entre os acessos e uma ampla variabilidade genética, demonstrando a eficiência de estudos utilizando tal marcador.

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1. Material Vegetal

O trabalho foi realizado no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal, do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, foram utilizadas amostras foliares das cinco espécies de *Passiflora* (*P. coccinea*, *P. cristalina*, *P. miniata*, *P. setacea* e *P. edulis*), sendo as duas últimas utilizadas como testemunhas (Tabela 1).

Tabela 1- Espécies de *Passiflora* analisadas via marcadores moleculares no estudo de diversidade genética e suas respectivas procedências.

Espécies	Subgênero	2n	Código	Procedência
<i>Passiflora setacea</i>	<i>Passiflora</i>	18	01	UENF
<i>Passiflora cristalina</i>	<i>Passiflora</i>	18	02	UNEMAT
<i>Passiflora miniata</i>	<i>Passiflora</i>	18	03	UNEMAT
<i>Passiflora edulis</i>	<i>Passiflora</i>	18	04	UENF
<i>Passiflora coccinea</i>	<i>Passiflora</i>	18	05	EMBRAPA

3.1.3.2. Extração do DNA

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o *Kit DNeasy Plant Mini* da Qiagen, seguindo a metodologia descrita pelo seu fabricante. Para análise utilizando marcadores ISSR, a extração do DNA foi realizada em bulk, para tanto foram utilizados dez indivíduos por espécies. Para análise utilizando marcadores SSR, a extração foi realizada individualmente, utilizando cinco indivíduos por espécie. Após a extração, a integridade e a quantificação do DNA foram verificadas via gel de agarose a 1,0%, e em seguida o DNA foi diluído para a concentração de $5\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

3.1.3.3. Condições de amplificação e análise estatística para ISSR

As análises de reações de amplificação do DNA foram realizadas, utilizando-se 55 iniciadores ISSR. Cada iniciador foi anteriormente testado, a fim de encontrar sua temperatura ideal de amplificação, variando entre 46-52°C.

Para a reação de PCR foram utilizados os seguintes reagentes em suas determinadas concentrações: PCR buffer 1X $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2 mM de dNTP; 1,9 mM de MgCl_2 ; 0,6 U de Taq DNA Polimerase (*Platus Taq DNA Polymerase* — Sinapse Inc); 0,4 μM de primer; 10 ng de DNA (bulk); e por final a reação foi completada até 13 μl com água ultra pura em microtubos de PCR de 200 μL , foi utilizado marcador de 100 pb.

As reações da polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas em termociclador sob as seguintes condições: 5 min a 94°C (desnaturação inicial), seguindo por 35 ciclos de 94°C por 1 min, 46-52°C por 1 min, 72°C por 3 min, e uma extensão final a 72°C por 7 min.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel agarose 2%, corados com mistura gel Red™ e blue Juice (1:1) e submetidos à luz UV (Fotodocumentador Minibis Pro – Bio-imaging System) para visualização dos resultados. Os polimorfismos obtidos foram tabulados de acordo com a presença (1) ou ausência (0) das bandas.

As variáveis foram obtidas pela avaliação visual das bandas mais consistentes e evidentes. A análise dessas variáveis foi realizada considerando a matriz binária construída, usando os valores de 1 para indicar presença de banda e 0 para indicar ausência de banda, a partir da qual foi realizada análises de

dissimilaridade através do complemento dos coeficientes de Coincidência Simples de Rogers e Tanimoto. O coeficiente de correlação cofenética (CCC) foi calculado, a fim de verificar a consistência do agrupamento. A análise de agrupamento das espécies via dendrograma foi realizada por meio do método UPGMA com o auxílio do programa Mega versão 6 (Kumar et al., 2009).

3.1.3.4. Condições de amplificação e análise estatística para SSR

Foram testados 23 pares de *primers* microsatélites, desenvolvidos e otimizados para *P. edulis* (Oliveira, 2006), *P. alata* (Pádua et al., 2005) e *P. setacea* (Cerqueira-Silva et al., 2014).

Todas as amplificações por PCR foram realizadas em termociclador, foram utilizados os seguintes reagentes em suas determinadas concentrações: PCR buffer 1X (NH₄)₂SO₄; 0,2 mM de dNTP; 1,9 mM de MgCl₂; 0,6 U de Taq DNA Polimerase (*Platus Taq DNA Polymerase* — Sinapse Inc); 0,4 μM de primer (F + R); 10 ng de DNA; e por final a reação foi completada até 13 μl com água ultra pura em microtubos de PCR de 200 μL, foi utilizado marcador de 100 pb.

As PCRs foram conduzidas da seguinte forma: 4 min a 94°C para desnaturação inicial, seguindo-se os 35 ciclos, cada um consistiu de 94°C por 1 min, 52-64°C por 1 min, 72°C por 3 min, e uma extensão final a 72°C por 7 min.

Os fragmentos foram separados em gel metaphor 4%, corados com mistura gel RedTM e blue Juice (1:1) e submetidos à luz UV (Fotodocumentador Minibis Pro – Bio-imaging System) para visualização dos resultados.

Os dados da amplificação dos iniciadores foram convertidos em código numérico por loco para cada alelo. Foi construída uma matriz de dados numéricos na qual foram atribuídos valores de 1 até o número máximo de alelos encontrados por loco. A definição representativa de cada genótipo foi feita conforme descrito a seguir: considerando um loco com três alelos, tem-se a representação 11, 22 e 33 para os considerados homozigotos (A₁A₁, A₂A₂ e A₃A₃), ao passo que, para aqueles considerados heterozigotos A₁A₂, A₁A₃ e A₂A₃, foram utilizados 12, 13 e 23, respectivamente. A distância genética entre as espécies foi calculada com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2013), utilizando-se o índice de Smouse e Peakall. A análise de agrupamento das espécies via dendrograma foi realizada por meio do método UPGMA com o auxílio do programa Mega versão 6 (Kumar et al., 2009).

A dispersão gráfica entre as espécies foi realizada com base na análise das coordenadas principais (PCA -*Principal Coordinates analysis*) utilizando o programa Genalex 6.3 (Peakall; Smouse, 2009).

3.1.3.5. Identificação da natureza híbrida de *Passiflora cristalina* através de marcadores SSR

A identificação híbrida foi testada a partir da análise visual dos padrões de bandas provenientes da combinação dos possíveis parentais. Para tal, os marcadores moleculares gerados pelos diferentes *primers* foram analisados quanto à presença ou não de bandas informativas que exibiam padrões claros de banda única facilmente mapeáveis nos possíveis parentais. As bandas informativas são marcas presentes no parental 1 e ausentes no parental 2, cuja presença das duas bandas no genótipo supostamente híbrido (*P.cristalina*) confirmam a hibridação natural. Foram consideradas bandas informativas somente aquelas com alta nitidez e reproducibilidade.

3.1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.4.1. Marcadores ISSR

Foram testados 55 *primers* ISSR, destes, 18 geraram produtos de amplificação satisfatória nas espécies em estudo. O número de bandas amplificadas por *primer* variou de 3 a 7, demonstrando uma clara capacidade para detectar polimorfismos (Tabela 2). Um total de 81 bandas ISSR foram amplificadas, sendo 79 (99%) polimórficas, dando uma média de 4 bandas por *primer*, sendo este resultado esperado, visto que seu uso foi conduzido em uma análise interespecífica (Fajardo et al., 1998; Santos et al., 2011).

Em *Passiflora*, o uso de marcadores ISSR é relativamente pouco relatado, no entanto, alguns autores em seus trabalhos com as espécies do gênero utilizando tais marcadores relataram elevado nível de polimorfismo.

Tabela 2 - *Primers* ISSR utilizados no estudo de diversidade genética das 5 espécies de *Passiflora*. UENF, Campos dos Goytacazes, 2017.

<i>Primers</i>	Sequência (5'-3')	T.A	Locos amplificados	Locos polimórficos
1	(GA) ₆ CC	48°C	7	7
2	(GT) ₆ CC	48°C	4	3
7	(GA) ₈ CT	48°C	4	4
17	(AC) ₈ T	48°C	5	5
19	(AG) ₈ YA	48°C	5	5
20	(GA) ₈ YT	48°C	5	5
23	(CA) ₈ CY	48°C	4	4
32	(AG) ₈ C	48°C	5	4
33	(AG) ₈ T	48°C	3	3
40	(AC) ₈ CT	48°C	3	3
50	(AC) ₈ C	48°C	5	5
51	(ATC) ₆	48°C	6	5
57	(GA) ₉ T	48°C	5	4
59	(AC) ₄ Y	48°C	7	7
70	(GA) ₇ RC	48°C	3	3
72	(GTG) ₄ R	46°C	5	5
73	(CA) ₇ YC	48°C	4	4
7M	(AC) ₆ C	46°C	4	2

T.A – Temperatura de anelamento

Santos et al. (2014) avaliando 45 acessos de *Passiflora* (três acessos de *P. alata* e 42 acessos de *P. edulis*) utilizando 18 *primers* ISSR obtiveram um total de 227 bandas polimórficas com média de 12,61 bandas por *primer*. Costa et al. (2012), caracterizando 63 genótipos de maracujazeiro-azedo do programa da Embrapa Mandioca e Fruticultura, obtiveram 22 *primers* polimórficos gerando um total de 266 bandas com média de 11,56 bandas por *primer*. Sousa et al. (2015), avaliando via marcadores ISSR 25 espécies silvestres de *Passiflora* do banco de germoplasma da UESC em Ilhéus, Bahia, obtiveram 20 *primers* polimórficos dos 31 testados com um total de 331 bandas e média de 16 bandas por *primer*.

Foram identificados a formação de 4 grupos principais: o Grupo I foi formado pelas espécies *P. cristalina* e *P. coccinea* e os Grupos II, III e IV foram constituídos pela *P. miniata*, *P. setacea* e *P. edulis*, respectivamente (Figura 1). O coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,7693, sendo um coeficiente adequado já que

$r \geq 0,56$ é considerado ideal e reflete uma boa concordância com os valores das matrizes de distância genética (Vaz Patto et al., 2004).

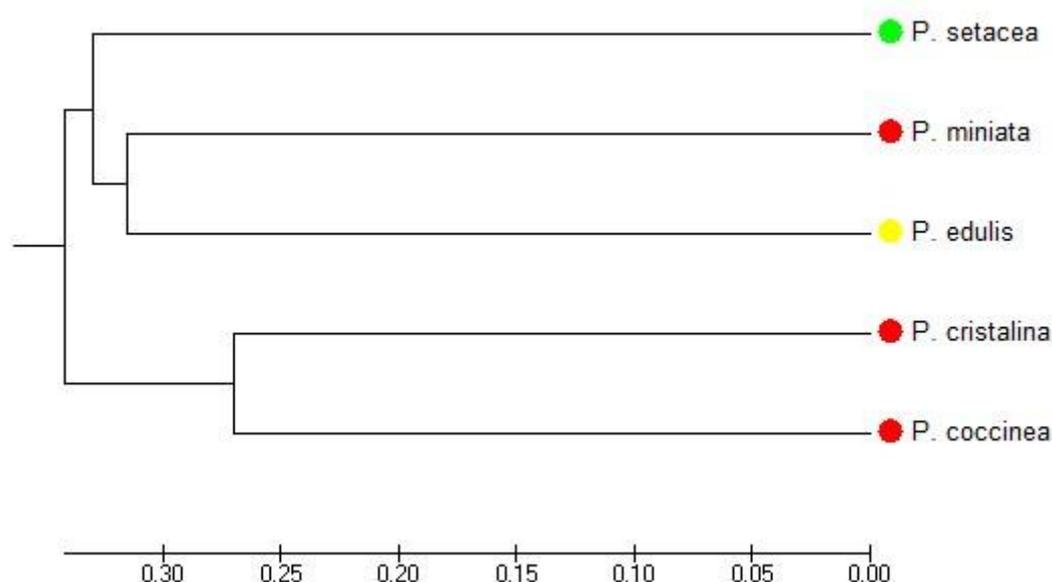


Figura 1 - Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA com o complemento dos coeficientes de Coincidência Simples de Rogers e Tanimoto entre cinco espécies do gênero *Passiflora* com base em marcadores ISSR.

As espécies *P. cristalina* e *P. coccinea* foram identificadas como as menos dissimilares, apresentando um valor igual a 0,54. Esse resultado era esperado, visto que ambas as espécies são morfologicamente similares e pertencem ao mesmo gênero, subgênero e supersecção. Já a espécie *P. miniata*, que ficou em um grupo isolado, apresentou uma distância genética de *P. cristalina* no valor de 0,59 e de *P. coccinea* a distância foi de 0,67, portanto mais próxima de *P. cristalina*. Por outro lado, as espécies *P. coccinea* e *P. setacea* foram as que apresentaram a mais alta dissimilaridade, com coeficiente igual a 0,74 (Tabela 3).

Tabela 3 - Matriz de distâncias genética entre 5 espécies de *Passiflora*, baseada em 18 marcadores ISSR.

	Espécies				
	<i>P. setacea</i>	<i>P. cristalina</i>	<i>P. miniata</i>	<i>P. edulis</i>	<i>P. coccinea</i>
<i>P. setacea</i>	0,00				
<i>P. cristalina</i>	0,70	0,00			
<i>P. miniata</i>	0,65	0,59	0,00		
<i>P. edulis</i>	0,67	0,68	0,63	0,00	
<i>P. coccinea</i>	0,74	0,54	0,67	0,72	0,00

3.1.4.2. Marcadores SSR

Dos 23 *primers* SSR testados, 22 amplificaram sendo 18 considerados polimórficos, equivalendo a uma taxa de transferibilidade de 95,65% (Tabela 4). Este resultado era esperado, visto que as espécies em estudo pertencem ao mesmo gênero, ou seja, apresentam os sítios desses *primers* que flanqueiam essas regiões conservadas, evidenciando que a proximidade evolutiva entre táxons está diretamente relacionada ao sucesso da transferibilidade de marcadores SSR. Logo, análise de transferibilidade torna-se bastante oportuna devido à redução de tempo e custo financeiro para o desenvolvimento desses marcadores (Carvalho et al., 2015).

Em *Passifloras*, a partir de *primers* SSR, previamente desenvolvidos para duas espécies, *P. edulis* (Oliveira, 2006) e *P. alata* (Pádua et al., 2005), foi observado por Cerqueira-Silva (2012a) uma elevada taxa de amplificação cruzada quando utilizaram em seus estudos várias espécies silvestres de *Passiflora*, com resultados de 86% de transferibilidade.

Tabela 4 - Caracterização dos 18 locos analisados na análise molécula via marcadores SSR.

Locos	Primers	T.A	Referências
Pad2	F:CACATTTGCCGTCCTGG R:CGGCATACGATAAATCTCCTG	60	Pádua et al., 2005
P34	F:GGCAGGATATGCTTTGGTT R:GCTGTCCGGACACATGGAC	60	Oliveira, 2006
P40	F:GAATCAATGGAACACAAGCA R:CCAGCCCACTAGACCACCT	60	Oliveira, 2006
P76	F:ACTCTCACCTCAATCGACC R:AATTGTTACTCCGTTTCTCTGA	60	Oliveira, 2006
Ps16	F:GAGAAAGCGAGTCAGCGAGA R:GACTCCAATATCGGCACTTCA	58	Cerqueira-Silva et al., 2014
Ps3	F:GTAGCGTCTCGGCAGGTC R:ACTCTAAGTCGGCCACTCTTG	60	Cerqueira-Silva et al., 2014
P43	F:CTCAGTGAGGAATAAGCAATCA R:ATTTGGCATGCTGTTACGC	60	Oliveira, 2006
Ps21	F:CCCAATCGCTGAGAGGAGT R:CGGTAGGCTCATTCGTGTCA	58	Cerqueira-Silva et al., 2014

Tabela 4 – Cont.

Locos	Primers	T.A	Referências
Ps5	F:TCGGTCTTCGTATTCAACTCTG R:GAGGAACTGGCATCGCAT	58	Cerqueira-Silva et al., 2014
P96	F:GAATCAATGGAACACAAGCA R:CCAGCCCACTAGACCACCT	56	Oliveira, 2006
Ps2	F:TAGCTTAACACAATGCAACAGA R:CAACGGAGAACGATGTCAG	54	Cerqueira-Silva et al., 2014
Ps1	F:TAGCTTAACACAATGCAACAGA R:CAACGGAGAACGATGTCAG	50	Cerqueira-Silva et al., 2014
Ps7	F:ACAGGGGTGAGGCACATTC R:TCTGTTATTATCATCGGCAGG	56	Cerqueira-Silva et al., 2014
Ps6	F:GTTGGATCAAAGGGTCACA R:CAACTACTGGATCGAACTGGTA	58	Cerqueira-Silva et al., 2014
P90	F:TCAGGAAGATTGCATGTTAGT R:CTGGGTTTTGTTTATGTTGC	58	Oliveira, 2006
P25	F:GTGTTTGTGGCGATGTGATTA R:GACAAACGTTGTTTCCGCT	60	Oliveira, 2006
P74	F:CCCTCTTATCAATAGCGTTGG R:GCACGAGCACGAGTATTTATT	62	Oliveira, 2006
Ps4	F:CAACAGGAGGTGAGGTGTGA R:GACAGTGCAACTTTAGGCGAC	64	Cerqueira-Silva et al., 2014

T.A (temperatura de anelamento)

Por meio da Análise das Coordenadas Principais (PCA), observa-se que duas coordenadas explicaram 84,6% da variação total, sendo possível visualizar em gráfico de dispersão (Figura 2). Nota-se uma distância entre *P. edulis* e *P. setacea* das demais espécies, o que era esperado, visto que ambas as espécies apresentam características morfológicas distintas. Porém, observa-se uma proximidade entre *P. edulis* e *P. setacea*, que é sustentada pelo estudo de filogenia molecular, em que foram utilizadas sequências conservadas plastidiais (Muschner et al., 2003) e pelo estudo de Santos et al. (2014a) que demonstram que as mesmas apresentam boa capacidade combinatória de cruzamento em ambas as direções.



Figura 2 - Análise das Coordenadas Principais entre cinco espécies do gênero *Passiflora*.

Pela análise de agrupamento UPGMA foi possível verificar a formação de três grupos, onde no grupo I ficaram alocadas as três espécies que apresentam características morfológicas semelhantes (*P. cristalina*, *P. coccinea* e *P. miniata*), e nos grupos II e III foram constituídos pela *P. setacea* e *P. edulis*, respectivamente (Figura 3).

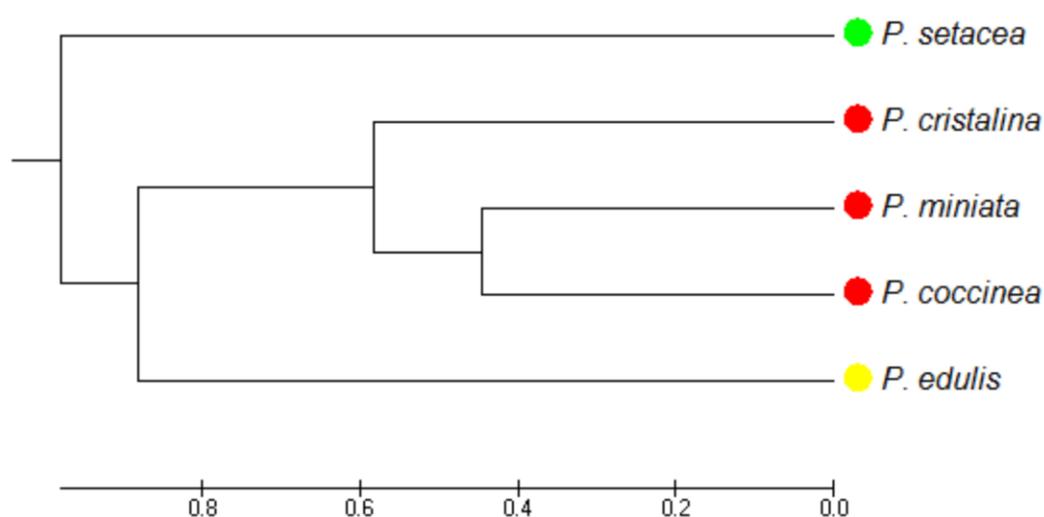


Figura 3 - Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA utilizando-se o índice de Smouse e Peakall entre cinco espécies do gênero *Passiflora* com base em marcadores SSR.

A distância genética variou de 0,89 a 2,11; essa variação caracteriza a diversidade entre as espécies. A menor distância foi observada entre *P. coccinea* e *P. miniata* (0,89), este resultado era esperado, visto que apresentam características similares das flores de coloração vermelha, sendo muitas das vezes extensivamente cultivada de forma errônea, devido sua semelhança (Vanderplank, 2006). Já a maior dissimilaridade foi observada entre as espécies *P. setacea* e *P. coccinea* (2,11) (Tabela 5).

Tabela 5 - Matriz de distâncias genética entre 5 espécies de *Passiflora*, baseada em 18 marcadores SSR.

	Espécies				
	<i>P. setacea</i>	<i>P. cristalina</i>	<i>P. miniata</i>	<i>P. edulis</i>	<i>P. coccinea</i>
<i>P. setacea</i>	0,00				
<i>P. cristalina</i>	2,00	0,00			
<i>P. miniata</i>	1,94	1,11	0,00		
<i>P. edulis</i>	1,78	1,72	2,00	0,00	
<i>P. coccinea</i>	2,11	1,22	0,89	1,56	0,00

Em seus estudos com *Passiflora* (Paiva et al., 2014a; Paiva et al., 2014b) utilizando análises conjuntas de descritores morfológicos por meio do procedimento Ward-MLM e por marcadores SSR, observaram que *P. setacea* e *P. coccinea* ficaram alocadas em grupos diferentes, conforme observado no presente estudo.

Embora as espécies *P. setacea* e *P. edulis* não tenham sido alocadas no mesmo grupo, elas apresentaram uma baixa dissimilaridade (1,11). Santos et al. (2014a), com o objetivo de obter híbridos resistentes à doença do endurecimento dos frutos, realizaram hibridação interespecífica entre tais espécies; e verificaram que tal hibridação foi bem sucedida nas duas direções dos cruzamentos, comprovando que há compatibilidade genética.

Dois pares de *primers* SSR foram eficientes na identificação da natureza híbrida de *P. cristalina*. Através da visualização das marcas, *P. cristalina* foi identificada como possível híbrido natural entre *P. miniata* e *P. coccinea* por meio da presença das duas bandas provenientes de cada um dos possíveis parentais (Figura 4).

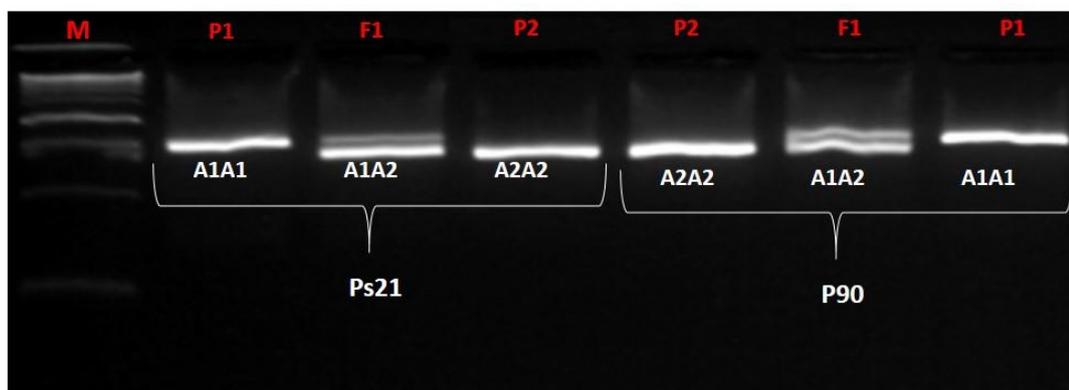


Figura 4 - Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA referentes as três espécies silvestres de *Passiflora*. P1 – parental 1 (*P. coccinea*); P2 – parental 2 (*P. miniata*); Híbrido (*P. cristalina*); M – marcador molecular; Ps1 e P90 – primers SSR.

Este resultado corrobora com os dados obtidos pelas análises de agrupamento utilizando tanto marcadores dominantes quanto marcadores codominantes. Pela análise de agrupamento gerado a partir de marcadores ISSR ficou evidenciado que *P. miniata* não se agrupou com *P. cristalina* e *P. coccinea*, no entanto, ela apresentou uma baixa dissimilaridade genética com *P. cristalina* (0,59). Já pela análise de agrupamento utilizando marcadores SSR as três espécies permaneceram no mesmo grupo, sendo observada uma menor distância entre *P. coccinea* e *P. miniata*.

A cor dos filamentos da corona é considerado um marcador morfológico característico entre tais espécies, observa-se que *P. coccinea* apresenta os filamentos na cor branca-róseos, enquanto *P. miniata* apresentam seus filamentos na cor púrpura. Já *P. cristalina* possuem seus filamentos variando de vermelho a rosa (Vanderplank; Zappi, 2011), podendo ser considerada uma característica intermediária entre os dois genitores, sugerindo a confirmação da hibridação interespecífica entre as mesmas.

Diversas metodologias podem ser utilizadas para confirmação de híbridos, desde a baseada em características morfológicas (Oliveira et al., 2005), como as realizadas em nível molecular e citogenético. Os marcadores moleculares são excelentes ferramentas para a confirmação de hibridação, em que o uso de um ou dois primers com, pelo menos, uma banda informativa já é suficiente para sua confirmação (Faleiro et al., 2003). A confirmação de hibridação em *Passiflora* tem sido realizada com base em marcadores moleculares, que consiste em uma metodologia mais confiável para confirmação de paternidade em plantas híbridas

de maracujazeiro, como RAPD (Junqueira et al., 2008; Conceição et al., 2011) e SSR (Santos et al., 2012).

3.1.5. CONCLUSÕES

Como base nos resultados conclui-se que a) há uma similaridade entre as espécies *P. cristalina*, *P. coccinea* e *P. miniata*, estimada tanto utilizando marcadores moleculares ISSR e SSR; b) Houve uma elevada taxa de transferibilidade dos marcadores SSR, evidenciando que a proximidade evolutiva entre táxons está diretamente relacionada ao sucesso da transferibilidade; c) Os marcadores SSRs apresentaram-se eficientes na identificação da natureza híbrida de *P. cristalina* que foi considerada, neste estudo, como possível híbrido natural entre *P. miniata* e *P. coccinea*.

3.2. DETERMINAÇÃO CARIOTÍPICA EM *Passiflora cristalina* e *Passiflora miniata* (PASSIFLORACEA)

3.2.1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é constituído de cerca de 534 espécies (The Plant List (2016), apresentando importância econômica significativa. Algumas espécies representantes desse gênero são utilizadas para os mais diversos fins, que se estende a indústria alimentícia, a produção de cosméticos e medicamentos e a ornamentação (Abreu et al., 2009).

O estudo taxonômico do gênero *Passiflora* é complexo, pois abrange 4 subgêneros, séries e secções botânicas (Ulmer; MacDougal, 2004). A caracterização morfológica, molecular e citogenética têm auxiliado diversos estudos taxonômicos, contribuindo para o entendimento da filogenia do grupo (Cervi, 1997; Melo et al, 2001; Muschner et al., 2003; Hansen et al., 2006; Yotoko et al., 2011).

As espécies silvestres são consideradas repositório de genes de interesse para os melhoristas devido ao potencial genético, por apresentarem genes de resistência a doenças ou pragas e características agronômicas de interesse (Meletti et al., 2005). A utilização das espécies silvestres de *Passiflora* como plantas ornamentais tem ganhado o mercado nos últimos anos, visto a ampla variabilidade genética existente (Vanderplank, 2000; Abreu et al., 2009).

Além da beleza original das espécies silvestres, os híbridos produzidos, podem apresentar resistência a diferentes condições climáticas, pragas e doenças (Vanderplank et al. 2003). Apesar disso, nem sempre, a hibridação com as espécies cultivadas é possível, por isso algumas delas são subutilizadas (Hajjar; Hodgkin, 2007).

Para o uso bem sucedido de espécies silvestres na hibridação interespecífica, é necessário que as espécies genitoras sejam geneticamente próximas, apresentem certa homologia cromossômica, minimizando os problemas de incongruidade ou incompatibilidade cruzada e, deste modo, viabilizando a utilização do híbrido (Pereira et al., 2005). De acordo com Soares-Scott et al. (2005), a análise cariotípica de espécies silvestres de *Passiflora* é importante para o esclarecimento das relações entre táxons, sendo também de grande relevância para a indicação em futuros programas de melhoramento genético. Contudo, o gênero *Passiflora* tem sido pouco estudado citologicamente.

O gênero *Passiflora* apresenta espécies com ampla variação cariotípica, indo desde espécies com $2n=12$ a $2n=84$, entretanto, existem espécies nativas ainda inexploradas (Souza et al., 2008). Os representantes do subgênero *Passiflora* apresentam em geral folhas e flores grandes, sendo o subgênero constituído por táxons com $2n=18$ ou $x=9$ (Melo et al., 2001; Ulmer; McDougal, 2004; Hansen et al., 2006; Souza et al., 2008).

A espécie *P. cristalina* descrita por Vanderplank (2011) foi coletada no município de Alta Floresta/MT, sendo morfológicamente muito similar a espécie *P. miniata* descrita por Vanderplank (2006) encontrada em grande parte da América Meridional, apresentando como diferença o número e coloração das séries de filamentos na corona. Ambas as espécies apresentam características de interesse para o mercado de plantas ornamentais devido à beleza da sua flor, com coloração variando do vermelho forte e brilhante ao suave e marcante (Abreu et al., 2009).

Neste contexto, há necessidade de realização de estudos para delimitação entre tais espécies, utilizando-se metodologias que gerem conhecimentos relevantes. Assim, objetivou-se realizar análises citogenéticas, determinando-se o cariótipo comparativo entre as duas espécies.

3.2.2. REVISÃO

3.2.2.1. Origem e distribuição geográfica

O gênero *Passiflora* é originário da região Neotropical, com distribuição desde a Argentina, ao longo da América Central e México e sul dos Estados Unidos (Hansen et al., 2006). No The Plant List (2016) há 534 espécies descritas no gênero *Passiflora*, sendo que mais de 139 são catalogadas no Brasil, um dos principais centros de variabilidade genética deste gênero (Cervi, 1997).

Além do Brasil, a espécie apresenta-se amplamente distribuída na América do Sul, como Peru, Equador, Paraguai e Argentina, sendo cultivada em várias regiões tropicais. Sua distribuição no Brasil se estende pelos estados do Acre, Pará e do Centro-Oeste e da Bahia ao Rio Grande do Sul. A espécie também é encontrada nas áreas mais quentes da América com algumas espécies na Ásia e Austrália e uma espécie em Madagascar (Killip, 1938). É uma espécie heliófita e seletiva higrófito, que ocorre principalmente nas capoeiras, capoeirões, cerrados e em áreas de restinga litorânea, borda e interior de florestas (Cervi 1997; Bernacci et al. 2005; Cervi et al. 2010).

Originária do Brasil, a espécie *P. edulis* foi disseminada para outras partes do mundo (Oliveira et al., 1994). Segundo Cunha e Krampe (1999), o maracujá-azedo é uma planta de clima tropical com ampla distribuição geográfica encontrando no Brasil excelentes condições ecológicas para seu cultivo.

Passiflora miniata foi descrita por Vanderplank (2006) pertence ao subgênero *Passiflora*, supersecção Coccinea, tem sua origem e distribuição na região Amazônica, no Peru, no Brasil, na Colômbia e nas Guianas (Lim, 2012).

Passiflora cristalina é uma espécie nativa da Amazônia Meridional, pertence à supersecção Diasthephana do subgênero *Passiflora* e foi encontrada no Parque Estadual Cristalino, no nordeste do estado do Mato Grosso, daí ter recebido essa denominação (Vanderplank; Zappi, 2011).

Essas duas espécies supracitadas ocorrem naturalmente no município de Alta Floresta – MT e são similares nos aspectos florais com *Passiflora coccinea* que pertence ao subgênero *Distephana* e encontra-se na supersecção Coccinea (Silva et al., 2013), sendo encontrada na condição natural na maior parte da América tropical desde Honduras até Bolívia. No Brasil, a espécie parece nos estados do

Acre, Amazonas, Amapá, Bahia, Mato Grosso, Pará, Piauí, Rondônia e Roraima (Vanderplank, 2000, Silva et al., 2013, Bernacci et al., 2014).

3.2.2.2. Espécies silvestres e sua utilização

O Brasil é considerado o centro de diversidade genética das *Passifloras*, possuindo ampla variabilidade genética, sendo esta fundamental para o sucesso de qualquer programa de melhoramento (Ganga et al., 2004). Algumas apresentam características de interesse que podem ser introduzidas nas espécies comerciais, via hibridação interespecífica, constituindo este um campo de pesquisa promissor (Junqueira et al., 2007). Apesar disso, nem sempre a hibridação com as espécies cultivadas (*Passiflora edulis* Sims maracujá-azedo e *Passiflora alata* Curti – maracujá-doce) é possível, pois para a utilização de tais técnicas é necessário haver compatibilidade genética entre as espécies, daí algumas delas serem subutilizadas (Hajjar; Hodgkin, 2007).

As espécies silvestres são consideradas repositórios de genes de interesse, como de resistência a doenças ou pragas e características agrônômicas potencialmente requeridas, como longevidade, período de florescimento ampliado e androginóforo mais curto que facilita a polinização por insetos menores, e maior concentração de componentes químicos, sendo a obtenção de variedades resistentes a doenças e pragas um dos objetivos dos programas de melhoramento com maracujazeiros no Brasil (Junqueira et al., 2006; Meletti, 2011).

As doenças e pragas que atingem o maracujazeiro afetam diretamente a produtividade e a qualidade do fruto (Junqueira et al., 2006). Dentre as doenças que o acomete, a bacteriose (*Xanthomonas axonopodis* pv.) e a virose do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* – CABMV) são as que podem ocasionar a perda total da cultura. Espécies silvestres (*P. cincinnata*, *P. caerulea*, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. nitida*, *P. quadrangularis* e *P. setacea*) têm sido sugeridas como potenciais fontes de resistência para o combate de doenças que atingem o maracujazeiro (Junqueira et al., 2006, Santos et al., 2012a).

A murcha-de-fusarium e podridão-do-colo, causadas respectivamente por *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* e *Fusarium solanum*, são consideradas outras duas doenças que acometem os pomares de maracujazeiros. Visto que ainda não existe controle químico e nem variedades resistentes a tais doenças

(FISCHER et al., 2011). Uma alternativa é o uso de espécies silvestres resistentes como porta-enxerto (SILVA et al., 2013).

A técnica de uso de espécies silvestres resistentes como porta-enxerto é considerada outra forma de combater os problemas relacionados aos patógenos do solo. Resultados demonstram que alguns acessos de *P. caerulea*, *P. nitida*, *P. laurifolia* e de alguns de *P. suberosa*, *P. alata*, *P. coccinea*, *P. gibertii*, *P. actinia* foram considerados resistentes à fusariose (*Fusarium solani*) (Chaves et al., 2004; Junqueira et al., 2006;). Estudos utilizando *P. nitida* como porta-enxerto em clones de maracujazeiro obtiveram maior resistência à antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), fusariose (*Fusarium solani*) e à virose do endurecimento dos frutos, o que demonstram o potencial dessa espécie (Junqueira et al., 2007).

Considerando a ampla diversidade genética do gênero *Passiflora* e o potencial genético de algumas espécies silvestres, Castro et al. (2012) afirmam que é de suma importância a intensificação de estudos de caracterização e avaliação de germoplasma de maracujazeiro silvestres, tanto morfológica, molecular e citológica, visando a produção de frutos de qualidade e produtividade.

3.2.2.3. Determinação do Cariótipo

A citogenética clássica desenvolveu-se no século passado, o trabalho pioneiro foi desenvolvido em 1929 por Mc Clintock em milho (Gill et al., 1997), e seu crescente progresso acompanhou o aprimoramento de técnicas e equipamentos de microscopia. A citogenética é considerada como o estudo da genética por meio da citologia. Ela envolve qualquer estudo relacionado com cromossomo, isolado ou em conjunto, condensado ou distendido, tanto no que diz respeito à sua morfologia, organização, quanto à sua variação e evolução (Sacchet, 1999).

Embora haja grandes avanços nos últimos anos nas pesquisas em biologia molecular, a citogenética ainda é considerada como uma área de pesquisa promissora, pois dá suporte às novas tecnologias (Brammer et al., 2007).

A análise cariotípica sempre foi um dos campos estimulantes da citologia e da genética, tendo relação entre estudos taxonômicos e evolutivos, bem como no melhoramento genético e na caracterização de germoplasma. Mesmo após a revolução gerada pela técnica da Genética Molecular, a análise cromossômica continua sendo a única maneira de se observar o genoma de um eucarioto na forma

de blocos individualizados de material genético, fáceis de serem mensurados (Brammer et al., 2007).

Os cromossomos podem ser visualizados via microscopia, já que, durante a divisão celular, mais precisamente na metáfase mitótica, a dimensão e a localização das constrições primária (centrômero) e secundária (região organizadora nucleolar e satélite) podem ser observadas (Sybenga, 1992).

O cariótipo pode ser representado através de cariograma e pelo ideograma. O cariograma compreende as medidas físicas dos cromossomos obtidas a partir de fotomicrografia. No cariograma, os cromossomos são reunidos em pares e organizados de forma decrescente ou crescente, já o ideograma é o desenho esquemático do cariograma (Guerra; Souza, 2002). Para elaboração do cariograma, os cromossomos são classificados de acordo com a posição do centrômero, comprimento total dos cromossomos e razão entre os braços curtos e longos (Guerra, 1986, Levan et al., 1964).

O cariótipo de uma espécie pode ser considerado simétrico ou assimétrico. Sendo que no cariótipo simétrico, os cromossomos apresentam tamanhos semelhantes e os centrômeros são medianos ou submedianos, enquanto que cariótipos assimétricos são aqueles que possuem cromossomos de tamanho mais heterogêneo e os centrômeros terminais ou subterminais. De acordo com Paszko (2006) o aumento da assimetria pode ocorrer devido à mudança da posição centromérica de mediana/submediana para terminal/subterminal ou devido ao acúmulo de diferenças no tamanho relativo entre os cromossomos que formam o complemento. Para analisar a assimetria cariotípica existem alguns métodos, como, por exemplo, o índice TF (*Total Form*) estabelecido por Huziwara (1962) que corresponde à razão entre o somatório dos braços curtos e o comprimento do lote haploide, podendo variar de 0 a 50%, sendo este último valor característico de cariótipos simétricos. Além desse, ainda pode ser utilizado o índice de assimetria AI proposto por Paszko (2006), que se baseia no coeficiente de variação do índice centromérico e do comprimento total dos cromossomos.

A cariotipagem pode ser realizada de duas maneiras: através da coloração convencional, onde é utilizado um corante (Giemsa, Carmim acético, Orceína acética e Reativo de Schiff) que reage com todo o DNA fazendo com que esse fique completamente destacado, ou seja, não há formação de bandas. Por outro lado, na coloração diferencial são utilizados corantes específicos para certas regiões

cromossômicas gerando bandas. O bandeamento foi primeiramente difundido para cromossomos humanos e posteriormente para cromossomos de animais e vegetais. As bandas são visíveis como regiões de alta e baixa intensidade sob microscópio de fluorescência (Sharma; Sharma,1994).

Para as duas metodologias (coloração convencional e/ou diferencial) é necessário obter células mitóticas ou meióticas que apresentem cromossomos bem espalhados e condensados de forma a permitir a distinção dos cromossomos e realização das medições. Contudo, o material vegetal deve ser preparado de maneira a preservar as condições dos cromossomos permitindo uma boa visualização dos mesmos. De maneira geral, utiliza-se um antimitótico, seguido de fixação do material para posterior coloração.

Dentre os antimitóticos utilizados no pré-tratamento destaca-se o paradiclorobenzeno (PDB). O PDB é o mais útil do grupo dos benzenos nas pesquisas cromossômicas. Ele causa inibição do fuso como também torna as constrições cromossômicas mais visíveis. O PDB apresenta uma ampla utilização, podendo ser utilizado tanto para espécies com cromossomos longos quanto com cromossomos pequenos, o que alterna é o tempo de tratamento que varia de espécie para espécie. Segundo Sharma e Sharma (1994) a temperatura requerida deve estar entre 10 a 16°C para obter resultados satisfatórios.

A inibição do fuso mitótico também pode ser realizada com o uso do antimitótico 8-hidroxiquinoleína, tal solução tem a capacidade de provocar condensação cromossômica e aumentar o número de metáfases. Assim, um pré-tratamento de tecidos meristemáticos de plantas nas concentrações ideais de 8-HQ favorece um aumento de células com cromossomos condensados, facilitando a análise cariotípica ao permitir uma boa visualização dos cromossomos quanto a sua morfologia (Zheng et al., 2015).

Na coloração convencional utilizam-se corantes que reagem com todo o material genético, fazendo com que os cromossomos fiquem uniformemente corados. Dentre os corantes mais utilizados destacam-se a fucsina podendo ser ácida ou básica, bastante utilizada em estudos cromossômicos, o reagente Feulgen que apresenta alta especificidade ao DNA e é muito utilizado em cariótipos (Guerra, 1986), e o Giemsa que é uma mistura de vários corantes do grupo azul de metileno e seus produtos de oxidação. O corante Giemsa é um corante que marca os cromossomos uniformemente. Essas técnicas consideradas convencionais são

limitantes qualitativamente, e muitas vezes não proporcionam uma diferenciação longitudinal dos cromossomos. Com o emprego destas técnicas, é possível determinar: o número cromossômico das espécies, as medidas dos cromossomos, o comprimento total da cromatina, o índice de assimetria, a visualização da região centromérica, da constrição secundária e do segmento satélite a ela associada, quando presente, a classificação dos cromossomos.

3.2.2.4. Caracterização citogenética de *Passiflora*

O gênero *Passiflora* foi muito pouco estudado do ponto de vista citogenético, considerando o tamanho do gênero, uma vez que para cerca de 80 % das espécies, informações básicas, como número e tamanho dos cromossomos, ainda são desconhecidas (Hansen et al., 2006). Ainda assim, os poucos estudos cromossômicos têm sido de grande valia para determinar a evolução das relações em *Passiflora* (Melo et al., 2001; Cucco et al., 2005; Hansen et al., 2006; Souza et al., 2008).

Os mais amplos trabalhos foram realizados por Bowden (1945); Storey (1950); Beal (1969ab); Guerra (1986); Snow; MacDougal (1993); Mayeda e Vieira (1995); Barbosa e Vieira (1997); Soares-Scott (1998); Soares (1999); Passos (1999); Melo et al. (2001); Melo (2002); Melo e Guerra (2003); Souza et al. (2003ab); Souza et al. (2004); Soares-Scott et al. (2005); Hansen et al. (2006) e Souza et al. (2007). No entanto, citologicamente, o gênero tem sido pouco estudado, existindo estudos cromossômicos limitados apenas à contagem do número cromossômico em sua maioria (Souza et al., 2008).

Dentro do gênero *Passiflora* são encontrados 4 números cromossômicos básicos: $x=6$, $x=9$, $x=10$ e $x=12$. Feuillet e MacDougal (2004) ressaltam que a distribuição desses números básicos apoia a divisão do gênero em quatro subgêneros, uma vez que $x=n=6$ é observado apenas em *Decaloba*, $x=n=9$ em *Passiflora*, $x=n=10$ em *Astrophea* e $x=n=12$ em *Deidamioides* (Melo e Guerra, 2003).

Melo e Guerra (2003), com o objetivo de entender como ocorreu a evolução cariotípica de *Passiflora*, analisaram 20 espécies representantes dos quatro grupos (*Decaloba*, *Passiflora*, *Astrophea* e *Deidamioides*) utilizando a técnica de FISH, dividindo as espécies, citologicamente em quatro grupos, com base em seu número cromossômico associado aos sítios 5S e 45S. De forma geral, os autores puderam

concluir que, de acordo com o número de sítios 5S e 45S e a sua localização, os ancestrais de *Passiflora* continham o número cromossômico básico de $n=x=6$, sugerindo uma possível ocorrência de eventos de poliploidia durante a evolução do gênero, sendo que os números básicos $x=9$, $x=10$ e $x=12$ foram considerados secundários.

Grande parte das espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* é considerada diploide, apresentando $2n=12$, $2n=18$ ou $2n=20$, havendo apenas algumas poucas exceções tetraplóides, hexaplóides ou mesmo octaplóides (Melo e Guerra, 2003).

Dentre as espécies de interesse comercial, havia inúmeras controvérsias acerca do cariótipo de *P. edulis*; mediante este contexto Praça-Fontes et al. (2011) realizaram a montagem do kariograma, onde estabeleceram 18 cromossomos com $2n = 6II M + 3II SM$. Algumas poucas espécies de interesse comercial possuem $2n=12$ e 14 (*Passiflora holosericea* L.), $2n=20$ e 22 (*Passiflora foetida* L.), $2n=24$ e 36 (*Passiflora suberosa* L.) ou $2n=84$ (*Passiflora lutea* L.).

De acordo com Bennett et al. (2011), para algumas espécies do gênero *Passiflora*, estudos acerca do conteúdo de DNA também estão disponíveis. Souza et al. (2004), trabalhando com citometria de fluxo, demonstraram que o conteúdo 2C de DNA, em picogramas, variou bastante entre as espécies estudadas. O valor de 1,83 foi encontrado para *Passiflora suberosa*, 3,16 para *P. edulis* f. *edulis*, 3,40 para *Passiflora mucronata*, 3,43 para *Passiflora edmundoi*, 3,88 para *Passiflora laurifolia*, 3,92 para *Passiflora gilberti*, 5,36 para *Passiflora quadrangularis* e 3,19 pg para *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Geronimo (2014) trabalhando com *Passiflora pentagona*, *Passiflora setaceae*, *Passiflora coccinea*, *Passiflora miniata* e *Passiflora morifolia* observou que *Passiflora pentagona* ($2C=3,87pg$) apresentou o maior conteúdo 2C de DNA seguida por *Passiflora coccinea* ($2C=3,32pg$), *Passiflora miniata* ($2C=3,16pg$), *Passiflora morifolia* ($2C=2,77pg$) e *Passiflora setaceae* ($2C= 2,69pg$), o que pode-se considerar como um genoma de tamanho pequeno para todas as espécies estudadas.

O estabelecimento do conteúdo de DNA, o estudo do cariótipo e a identificação de marcadores cromossômicos por FISH, têm sido considerados ferramentas importantes para o esclarecimento da estrutura genômica, da genética, da diversidade das espécies de *Passiflora* e para detecção de híbridos, podendo levar a avanços no campo teórico e a uma maior eficiência nos programas de

melhoramento (Capdeville et al., 2009). Outra importância dos estudos cariotípicos é para o entendimento da evolução dos cariótipos de espécies cujos cromossomos sofreram alterações estruturais, como inversões ou translocações (Guerra et al., 1997).

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Material vegetal

O tecido somático utilizado para este estudo foi composto por pontas de raízes obtidas de duas espécies silvestres de *Passiflora* (*P. cristalina* e *P. miniata*), que apresentam características morfológicas similares, em especial caracteres florais e de frutos (Figura 1). As pesquisas foram realizadas no laboratório de melhoramento genético vegetal (LMGV), no setor de citogenética da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes-RJ.

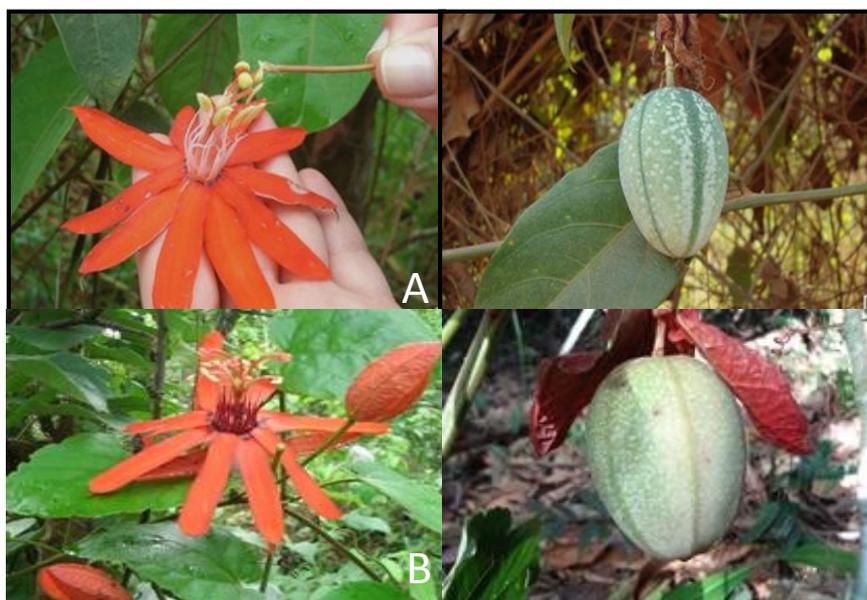


Figura 1 - Flores e frutos das espécies que foram objetos desse estudo: A) *P. cristalina* e B) *P. miniata*. **Fonte:** Silveira, 2012.

3.2.3.2. Definição do protocolo para a observação das placas metafásica

Para as análises mitóticas, pontas de raízes das duas espécies com aproximadamente 2 cm de comprimento foram separadas por espessura e submetidas a pré-tratamento, utilizando-se bloqueadores de fuso mitótico como 8-hidroxiquinolina a 0,002 M, durante 8h a 4°C. Posteriormente, as pontas foram lavadas em água destilada e fixadas em solução Carnoy (3 álcool etílico: 1 ácido acético), durante 24h, e mantidas no *freezer*, até o momento do preparo das lâminas.

3.2.3.3. Obtenção das placas metafásicas

As placas metafásicas foram obtidas a partir do protocolo de suspensão dos núcleos celulares (Damasceno Junior et al., 2009). Para tal, as pontas foram separadas por espessura e transferidas para tubos *ependorf* de 1ml e submetidas à digestão enzimática (pectinase 20% e celulase 2%) à temperatura de 37°C, durante 1h, em banho-maria. Ao final da digestão, foram realizadas 3 centrifugações durante 10 min a 5000 rpm, na presença de água destilada para a suspensão dos núcleos. Posteriormente, os núcleos foram ressuspendidos em solução de 2:1 (metanol: ácido acético) e armazenados em *freezer* até a montagem das lâminas. Aproximadamente 50 lâminas foram preparadas em câmara úmida, sendo utilizado 1ml do material preparado e deixadas para secar à temperatura ambiente.

3.2.3.4. Cariotipagem convencional

Após a secagem, a cariotipagem foi realizada através da coloração das lâminas com solução de Giemsa 2%, durante 15 min, à temperatura de 37°C. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas e observadas em microscópio ótico Olympus BX 60, sob campo claro nas objetivas de imersão de 60 e 100X de aumento.

As imagens foram capturadas através de uma câmara digital (3.3 MPixel Qcolor3C) acoplada ao microscópio ótico (Olympus BX 60, USA) utilizando-se o programa CellSens Standart 1.8 (Olympus), das quais as cinco melhores imagens de cada espécie foram selecionadas, contendo cromossomos com boa

condensação e espalhamento, sendo estas utilizadas para as medições cromossômicas.

Após a contagem do número de cromossomos em células íntegras, foram mensurados o comprimento do braço curto (BC) e braço longo (BL). A partir desses dados, foram analisadas as características comprimento absoluto dos cromossomos individuais ($CT = BL + BC$); comprimento do lote haplóide ($CLH =$ somatória dos comprimentos absolutos dos cromossomos metafásicos); comprimento relativo dos cromossomos ($CR = [C \div CLH] \times 100$; percentagem de contribuição de um determinado cromossomo para o comprimento total do lote haplóide); cálculo da razão entre braços ($r = \text{braço longo} \div \text{braço curto}$); comprimento médio dos cromossomos (X) e o índice de assimetria ($TF\% =$ somatória dos braços curtos do lote haploide em relação ao comprimento do mesmo; Huziwara, 1962). Os cariótipos foram montados com base no comprimento dos cromossomos, em ordem decrescente, e de acordo com a posição do centrômero. Os cromossomos foram classificados de acordo com a nomenclatura proposta por Guerra (1986), em metacêntrico: M ($r 1,00-1,49$), submetacêntrico: SM ($r 1,50-2,99$), acrocêntrico: A ($r 3,00-\infty$) e telocêntrico: T ($r \infty$).

A construção dos kariogramas foi realizada utilizando-se o programa computacional *Adobe Photoshop CS 8.0*, e dos ideogramas, construídos no programa computacional *Word da Microsoft®*. Os cromossomos homólogos foram determinados com base na posição do centrômero, tamanho absoluto de cada cromossomo e relação de braços. Para comparação das características cromossômicas de ambas as espécies, os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo cada metáfase considerada como repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de médias Tukey ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GENES (Cruz, 2013).

3.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as metáfases analisadas, as espécies *P. cristalina* e *P. miniata* apresentaram $2n = 18$ não havendo alteração no número cromossômico. De acordo

com Levin (2002), estudos do número cromossômico vêm auxiliando na identificação do grau de relação entre as espécies e conseqüentemente na delimitação entre as mesmas. Vários autores demonstram que para a maioria das espécies pertencente ao gênero e subgênero *Passiflora* o número básico de cromossomo é $x = 9$, tais como: Melo et al. 2015; Hansen et al. 2006; Cucco et al. 2005; Sorza et al. 2003; Soares-Scott et al. 2003; Melo e Guerra 2003; Arias et al. 2002; Deginani e Escobar 2002; Melo et al. 2001; Gilbert e MacDougal 2000; Lombetto et al. 1998; Snow e MacDougal 1993; Berry 1987; Guerra 1986. Esses dados estão em concordância com os resultados obtidos na presente pesquisa, conforme confirmado pelo cariógrama (Figura 2).

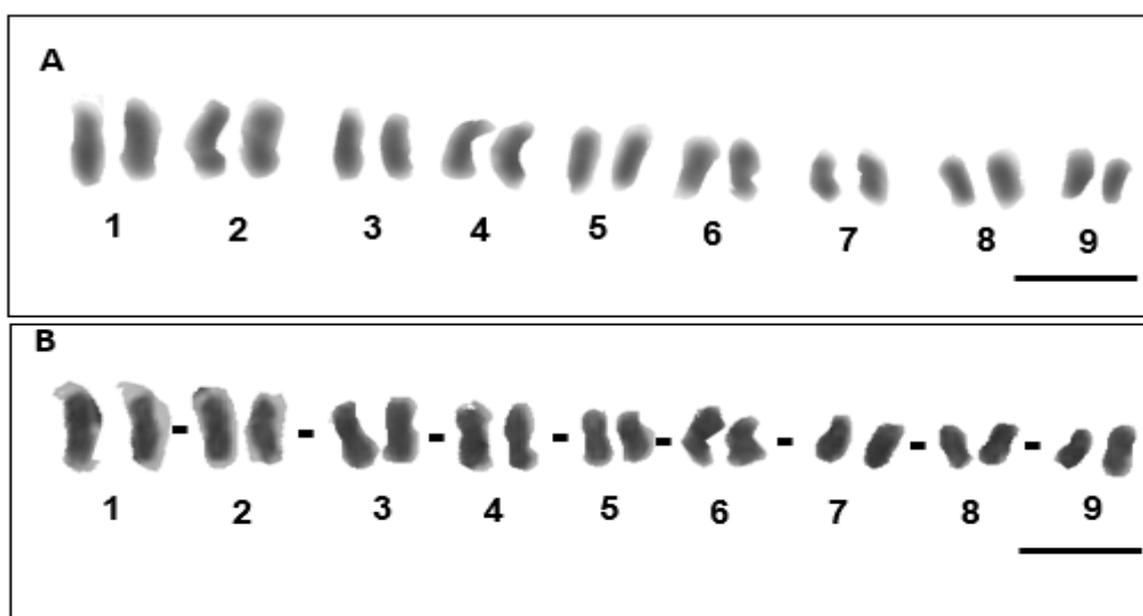


Figura 2 - Cariogramas (A e B) de duas espécies do gênero *Passiflora* apresentando $2n=18$ cromossomos. A) Cariograma de *P. miniata* e B) Cariograma de *P. cristalina*. Barra = 5 μ m.

Pereira et al., (2017), avaliando o comportamento meiótico de ambas as espécies, observaram a presença de nove pares de bivalente em células em diacinese, concluindo assim que o número básico de cromossomos é igual a nove ($x=9$), indicando que as mesmas são diploides ($2n=2x=18$ cromossomos). Hansen et al. (2006) afirmam que para o subgênero *Passiflora* o número haploide é igual a $n = 9$, tais dados corroboram com os resultados da presente pesquisa.

De acordo com Melo et al. (2001) e Melo e Guerra (2003), o gênero *Passiflora* apresenta quatro grupos de número básico de cromossomo, que aloca os quatro subgêneros propostos por MacDougal e Feullet (2004), a saber, *Decaloba* com número básico $x = 6$, *Astrophea* com $x = 12$, *Deidamioides* com $x = 12$ e *Passiflora* com $x = 9$, visto que as espécies alvo do estudo pertencem ao gênero e subgênero *Passiflora*, esse resultado era previsto.

O conhecimento do número cromossômico de uma espécie é essencial na definição de cruzamentos interespecíficos para a obtenção de híbridos artificiais visando o melhoramento genético, visto que o sucesso da hibridação está relacionado à compatibilidade genética entre as espécies (Silva, 2014).

Os dados das mensurações cromossômicas (Tabela 1) mostraram que os comprimentos médios dos cromossomos, comprimento do lote haplóide, a razão média entre braços (Tabela 2), e o comprimento individual de cada par cromossômico não variaram entre as espécies, não havendo diferença significativa pelo teste F ($P < 0,05$) (Tabela 3), estes dados corroboram com os resultados obtidos no estudo de distância genética utilizando tanto marcadores ISSR quanto marcadores SSR realizado na presente pesquisa, do qual demonstraram haver uma alta similaridade genética entre tais espécies.

O comprimento dos cromossomos de *P. miniata* variou de 1,96 μ m a 3,45 μ m e o de *P. cristalina* variou de 2,08 μ m a 3,14 μ m (Tabela 1). Soares-Scot et al. (2005) observaram que para a maioria das espécies de *Passiflora* analisadas, o comprimento cromossômico médio varia de 1,0 μ m e 3,7 μ m, o maior comprimento já observado foi em *P. quadrangulares* com 4,51 μ m (Souza et al., 2003). Esses valores, encontrados por outros autores, são próximos aos encontrados neste trabalho, essas diferenças podem ser justificadas, em parte, pelo grau de compactação dos cromossomos e por diferenças metodológicas nas preparações das lâminas, como o uso de diferentes enzimas ou de suas concentrações, e variações no agente antimitótico selecionado em cada pesquisa.

De acordo com a escala proposta por Fukui e Nakayama (1996), onde considera cromossomos metafásicos pequenos aqueles que apresentam um comprimento inferior a 3,7 μ m, médios variam de 3,7 a 8 μ m e grandes aqueles cujo comprimento é superior a 8 μ m, os cromossomos das espécies *P. miniata* e *P. cristalina* são considerados de tamanho pequeno, o que é de ampla ocorrência para as espécies representantes do gênero *Passiflora* (Soares-Scot et al., 2005).

Tabela 1 - Morfometria cromossômica em espécies de *Passiflora*: médias + desvio padrão dos comprimentos dos braços curtos (BC), braços longos (BL), comprimento total (CT), e comprimento relativo (CR), razão entre braços (r) e classificação (CL) e metacêntrico (M).

Espécies		Comprimento dos cromossomos μm (média \pm desvio padrão)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>P. miniata</i>	BC	1,42 \pm 0,2	1,27 \pm 0,2	1,08 \pm 0,04	1,09 \pm 0,1	1,04 \pm 0,1	0,99 \pm 0,1	0,95 \pm 0,05	0,86 \pm 0,1	0,92 \pm 0,2
	BL	2,02 \pm 0,2	1,73 \pm 0,1	1,64 \pm 0,4	1,54 \pm 0,2	1,44 \pm 0,2	1,36 \pm 0,2	1,29 \pm 0,2	1,16 \pm 0,2	1,04 \pm 0,1
	CT	3,45 \pm 0,3	3,01 \pm 0,4	2,73 \pm 0,3	2,63 \pm 0,3	2,49 \pm 0,3	2,35 \pm 0,3	2,25 \pm 0,3	2,03 \pm 0,3	1,96 \pm 0,2
	CR	15,06	13,15	11,92	11,49	10,87	10,26	9,8	8,85	8,59
	r	1,42	1,36	1,49	1,41	1,38	1,37	1,35	1,35	1,12
	CL	M	M	M	M	M	M	M	M	M
<i>P. cristalina</i>	BC	1,35 \pm 0,3	1,31 \pm 0,3	1,33 \pm 0,3	1,22 \pm 0,3	1,12 \pm 0,3	1,12 \pm 0,3	1,08 \pm 0,3	1,02 \pm 0,3	0,89 \pm 0,2
	BL	1,79 \pm 0,4	1,65 \pm 0,3	1,62 \pm 0,4	1,54 \pm 0,4	1,51 \pm 0,4	1,47 \pm 0,4	1,39 \pm 0,4	1,31 \pm 0,4	1,18 \pm 0,4
	CT	3,14 \pm 0,4	2,97 \pm 0,5	2,95 \pm 0,6	2,76 \pm 0,7	2,71 \pm 0,5	2,59 \pm 0,5	2,47 \pm 0,5	2,33 \pm 0,4	2,08 \pm 0,4
	CR	12,98	12,24	12,18	11,39	11,2	10,06	10,18	9,610	8,6
	r	1,33	1,26	1,22	1,26	1,35	1,31	1,28	1,29	1,32
	CL	M	M	M	M	M	M	M	M	M

A classificação da morfologia cromossômica de acordo com a classificação proposta por Levan et al., (1964) revelou que ambas as espécies apresentaram 18 cromossomos metacêntricos em suas fórmulas cariotípicas, conforme pode ser observado pelo ideograma (Figura 3). Muitas espécies de *Passiflora* tendem a apresentar cariótipo semelhante, com a maioria dos cromossomos metacêntricos e com tamanhos similares, havendo a conservação desta característica em determinados níveis taxonômico (Souza et al., 2008).

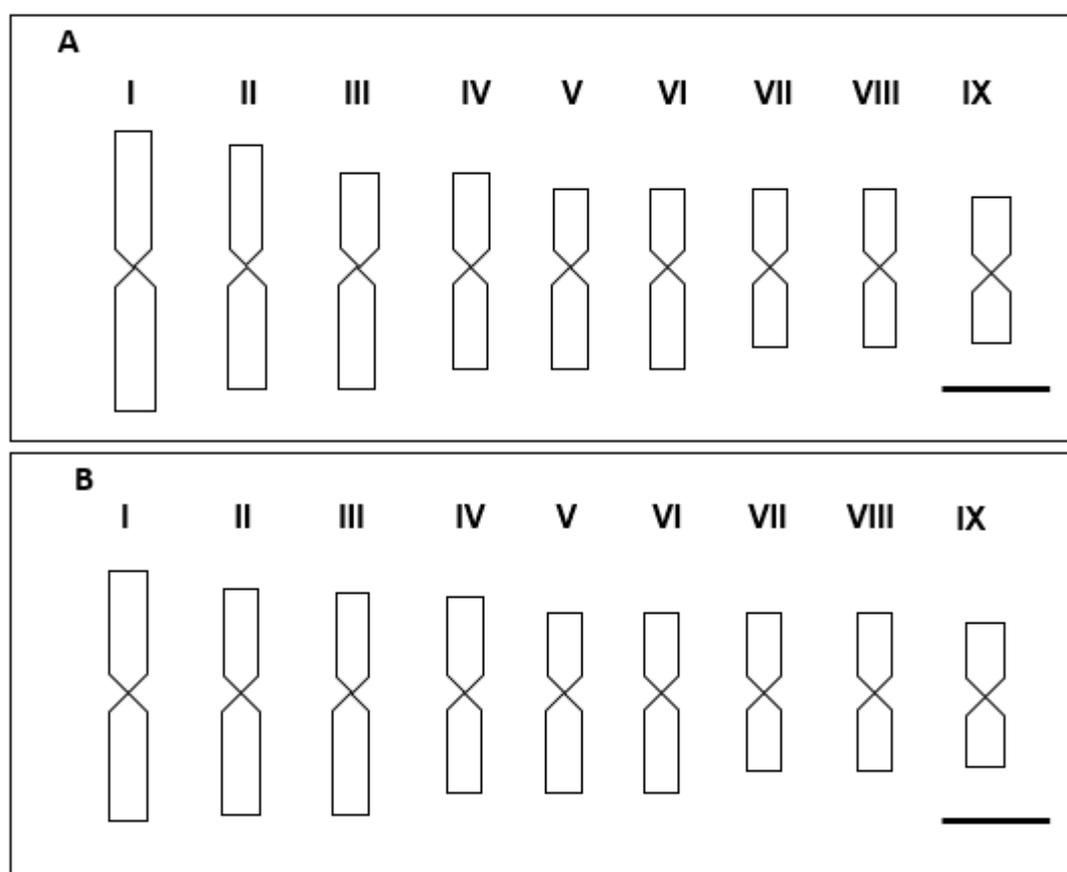


Figura 3 - Ideograma das duas espécies do gênero *Passiflora*. A) Ideograma de *P. miniata* e B) Ideograma de *P. cristalina*. Barra = 5 μm .

O comprimento do lote haploide (CLH) foi de 22,91 μm para *P. miniata* e 24,25 μm para *P. cristalina*. O CLH permite inferir o tamanho aproximado do genoma da espécie. Os valores encontrados para o CLH foi praticamente igual entre as duas espécies, indicando que ambas teriam um conteúdo de DNA nuclear muito próximo. Em *Passiflora* a relação entre CLH e conteúdo de DNA foi comprovada por Souza et al. (2004), que analisaram o conteúdo de DNA nuclear por citometria de fluxo em algumas espécies de *Passiflora*, e encontraram relação

do valor de C (em pg) com o valor de CLH. Em outras espécies, como o café, também foi observado que a variação no conteúdo de DNA nuclear, detectada por citometria de fluxo, está relacionada ao tamanho dos cromossomos observados por coloração de Feulgen (Clarindo; Carvalho, 2009). Mayeda (1997) em seu estudo citogenético com 10 taxóons do gênero *Passiflora*, observou que a espécie *P. coccinea* apresentam um valor de 21,39 μm para o comprimento do lote haploide (CLH), valor este muito próximo ao reportado no presente estudo com as espécies *P. miniata* e *P. cristalina*, indicando que as três espécies apresentam um conteúdo de DNA muito próximos.

O índice de assimetria (TF%) estimado para a espécie *P. miniata* foi de 42,26% e para a espécie *P. cristalina* foi de 43,42%. De acordo com Huziwarra (1962), esse índice pode variar de 0 a 50%, sendo que índices maiores que 40% são característicos de cariótipos extremamente simétricos. De acordo com o índice, tanto *P. miniata* quanto *P. cristalina* apresentaram cariótipos simétricos. De acordo com Melo e Guerra (2003), a grande maioria das espécies do subgênero *Passiflora* apresenta cariótipo simétrico, enquanto cariótipo assimétrico é descrito apenas nas espécies que constituem o grupo com $x = 6$. Segundo Mayeda (1997), os cariotipos simétricos são considerados mais primitivos e originaram os assimétricos.

Tabela 2 - Fórmula cariotípica, média da razão entre braços (r), comprimento médio dos cromossomos (x), comprimento do lote haplóide (CLH) e índice de assimetria (TF%) nas espécies de *Passiflora*.

Espécies	r	x (μm)	CLH	TF%	Fórmula cariotípica
<i>P. miniata</i>	1,38	2,54	22,91	42,26	9II
<i>P. cristalina</i>	1,28	2,68	24,26	43,42	9II

Tabela 3 - Resumo da ANOVA para o comprimento médio dos cromossomos (x) e comprimento individual dos cromossomos (C) de *P. miniata* e *P. cristalina*.

FV	GL	Quadrado Médio									
		x	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
Espécie	1	0,047	0,024	0,004	0,125	0,002	0,005	0,114	0,004	0,098	0,001
Residuo	8	0,284	0,158	0,207	0,259	0,301	0,282	0,132	0,391	0,356	0,241
Média		2,618	3,401	3,193	3,044	2,759	2,631	2,638	2,535	2,329	1,985
CV%		20,38	11,70	14,25	16,73	19,89	20,18	13,60	14,68	15,63	14,77

A análise dos valores da relação entre os braços, comprimento médio dos cromossomos e índice de assimetria cariotípica e ideograma de *P. miniata* e *P. cristalina* permitiu identificar características comuns ao gênero *Passiflora*, como cariótipo com centrômeros na posição mediana e similar (Cucco et al. 2005; Melo et al. 2001; Soares-Scott et al. 2005; Souza et al. 2003a; Souza et al. 2008; Vieira et al. 2004). Os cariótipos dentro de um mesmo subgênero ou secção têm sido similares em *Passiflora* (Souza et al. 2008), como pôde ser observado no subgênero *Granadilla* Killip por Mayeda (1997), com poucas diferenças entre as espécies analisadas.

A análise de variância para o presente estudo evidenciou não haver diferença significativa entre todas as variáveis analisadas, demonstrando que o cariótipo das duas espécies, alvo da presente pesquisa são similares indicando que tais espécies são próximas citologicamente.

3.2.5. CONCLUSÕES

Este trabalho contribuiu para o conhecimento citogenético, com determinações do cariótipo inédito para duas espécies *P. cristalina* e *P. miniata*. A partir deste trabalho pode-se concluir que as espécies *P. cristalina* e *P. miniata* apresentam as características cromossômicas comumente relatadas no subgênero *Passiflora* ($2n = 18$), apresentando cromossomos todos do tipo metacêntrico e de tamanho pequeno. Os dados citogenéticos não possibilitaram uma diferenciação taxônomica entre *P. cristalina* e *P. miniata*, visto que não foi observado diferença significativa entre as variáveis analisadas.

3.3. SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DAS ESPÉCIES SILVRESTRES *P. cristalina*, *P. miniata* e *P. coccinea*.

3.3.1. INTRODUÇÃO

A fruticultura brasileira aparece em 2017 como a terceira colocada entre os maiores produtores de frutas do mundo, com a produção acima de 44 milhões de toneladas por ano, mas com fraca exportação que gera, apenas, cerca de US\$ 800 milhões para a balança comercial (Mapa, 2017).

O Brasil é o maior produtor de maracujá no mundo. Nos últimos vinte anos, tal espécie tornou-se de suma importância para o agronegócio, devido à elevada cotação do suco no mercado internacional e do consumo da fruta fresca no mercado interno, mesmo sendo considerado um produto comercial recente, com apenas 40 anos de mercado (Bernacci, 2008).

O maracujá-azedo é destaque para uso como alternativa para pequenas propriedades, com a vantagem de seu rápido desenvolvimento e retorno econômico, além de permitir a distribuição de receitas durante praticamente todo o ano (Meletti, 2011).

Neste contexto, observa-se o interesse dos produtores na expansão dos pomares, o que tem gerado intensa demanda por informações técnicas acerca da propagação dessa espécie (Meletti, 2011).

A principal forma de produção de mudas das espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* é via seminífera, entretanto, existem relatos de que a germinação

das sementes é comprometida em função da ocorrência de dormência o que dificulta a utilização desta forma de propagação (Kuhne, 1968; Morley Bunker, 1994).

A baixa percentagem de germinação da *Passiflora* é atribuída à presença do arilo, à impermeabilidade do tegumento e à carência de reguladores de crescimento, influenciando assim, na permeabilidade da semente e resultando em determinado tipo de dormência que afeta a germinação (Morley-Bunker, 1974).

Segundo Cardoso (2004), sementes dormentes são aquelas que não germinam mesmo quando colocadas em condições ambientais aparentemente favoráveis. Essas sementes apresentam alguma restrição interna ou sistêmica à germinação e para que ocorra a germinação é preciso que esta restrição seja superada.

Existem procedimentos que podem eliminar o fator responsável pela dormência e acelerar e uniformizar a germinação das sementes de *Passifloras*. A maioria dos estudos, realizados em sementes de *Passiflora*, adotam o uso de reguladores de crescimento, principalmente, giberelina associados às técnicas de escarificação mecânica, química e/ou térmica, e poucos são os trabalhos que utilizam outras substâncias químicas como, por exemplo, nitrato de potássio (KNO₃) (Souza et al., 2009; Pádua et al., 2011).

Trabalhos têm sido realizados com várias espécies com o intuito de conhecer a germinação e obter metodologias para superação de dormência, como das espécies *P. alata* (Rossetto et al., 2000; Ferrari et al., 2008), *P. cincinnata* (Lombardi, 2003; Oliveira Jr., et al., 2010), *P. gibertii* (JunghanS et al., 2010), *P. mucronata* (Meletti, 2011; Santos et al., 2012), *P. nitida* (Andrade et al., 2010) e *P. setacea* (Costa et al., 2010).

Deste modo, dada a grande importância dos estudos sobre a germinação das sementes das espécies cultivadas e silvestres de *Passiflora*, este estudo teve por objetivo avaliar as condições de temperaturas e reguladores vegetais (GA₃ e KNO₃) na germinação de sementes de *P. cristalina*, *P. coccinea* e *P. miniata*.

3.3.2. REVISÃO

3.3.2.1. Propagação de Passifloraceas

A propagação sexuada é a principal forma de reprodução das plantas superiores, no Brasil. A propagação em escala comercial é realizada principalmente por via seminal, apesar deste tipo de propagação apresentar baixa homogeneidade das plantas devido à característica da semente (Meletti, 2011). No entanto, de acordo com Grolli (1999), a propagação seminal apresenta inúmeras vantagens, como baixo custo de produção, maior facilidade no armazenamento e no transporte devido ao tamanho das sementes, sendo este processo o mais utilizado na formação dos pomares.

No entanto, segundo Junqueira et al. (2012), pomares conduzidos com sementes são desuniformes, com frutos de cor, tamanho e rendimento diferente entre si. Isso dificulta a condução do pomar, a colheita e a classificação, depreciando ou gerando perdas do produto no mercado. Essas plantas possuem também uma percentagem grande de problemas fitossanitários, pois são mais susceptíveis a doenças em relação às mudas de propagação vegetativa que possuam alguma característica de resistência.

A grande maioria dos produtores reutilizam sementes de plantios anteriores, sendo esse procedimento não recomendado. Todavia, se o reaproveitamento de sementes for feito, o produtor deve favorecer as sementes de matrizes com ótimas características agronômicas, como resistência a pragas e doenças, plantas vigorosas e saudáveis, produtivas, com alto rendimento de suco, precoces, formato com as exigências do mercado, tamanho, alto teor de sólidos solúveis, com flores de estigmas/estiletos que se mostrem totalmente curvo, melhorando desse modo à qualidade das mudas produzidas (Ferreira, 2010).

De acordo com Meletti (2011), a coleta dos frutos para aquisição de sementes deve ser realizada de forma que sejam colhidos vários frutos de diferentes plantas, ao invés de retirar-se muitos frutos de poucas plantas devido a característica de autoincompatibilidade, ou seja, a geração de indivíduos altamente polimórficos e heterozigotos, apresentando alta variabilidade nas mudas produzidas.

Segundo Almeida et al. (1988) o poder germinativo das sementes da família Passifloraceae merece atenção, devido a viabilidade ser muito curta, devendo as mesmas serem utilizadas logo após a coleta dos frutos. A baixa germinação destas sementes pode ser influenciada por alguns fatores exógenos e/ou endógenos, como exemplo, a dormência.

De acordo com trabalho de Meletti et al. (2005), nas fases iniciais da germinação, as sementes apresentam uma dormência temporária, que tem sido superada com o armazenamento, que varia de região para região, em geral possibilita a obtenção de índices de germinação superiores a 95% valor que decresce, cerca de 8% ao mês, com o prosseguimento de armazenamento.

A classificação dos diferentes tipos de dormência é bastante extensa e variada. Segundo Melo (2005) existem dois tipos de dormência em sementes: endógena e exógena. Na dormência endógena, algumas características do embrião previnem a germinação, enquanto na dormência exógena alguma característica da estrutura, incluindo endosperma, tegumento ou fruto previne a germinação. De acordo com Morley-Bunker (1980) a dormência na família Passifloraceae é do tipo exógena, ocorrendo pela dureza do tegumento, impedindo a entrada de água na semente.

Para algumas espécies do gênero *Passiflora* a germinação foi aumentada com a aplicação de métodos de quebra de dormência. Entre os processos mais utilizados estão listadas a escarificação química, mecânica, fria e quente-fria, choque térmico, exposição à luz intensa, imersão em água quente, embebição em água fria e hidratação com reguladores vegetais (Fowler; Bianchetti, 2010; Delachieve; Pinho, 2013).

3.3.2.2. Técnicas de quebra de dormência

Existem determinadas formas de quebrar a dormência; dentre os principais tratamentos realizados para a superação da dormência encontram-se a escarificação química, imersão em água quente ou em água fria e escarificação mecânica, o qual consiste em lixar a semente ou retirar todo o tegumento para que haja facilitação na germinação (Lopes et al., 2006).

O uso do ácido sulfúrico para a superação da dormência tegumentar é considerado um tipo de escarificação química, o qual facilita o processo de germinação das sementes. Outro método bem eficiente na quebra da dormência é

a técnica de escurificação mecânica, realizada com lixa e aparelhos (mini morsa) (Oliveira et al., 2003; Smiderle; Sousa, 2003; Lopes et al., 2006).

De acordo Salisbury e Ross (1992) o uso dos reguladores vegetais, que atuam diretamente no metabolismo da semente é considerado um excelente protocolo de quebra de dormência. O tratamento com citocininas, giberelinas, auxinas, etileno, ácido abscísico, jasmonatos e brassinosteróides tem se destacado, no entanto, cada regulador possui sua particularidade, cada qual apresenta diferente modo de ação, efeitos fisiológicos e são dependentes da correta forma de aplicação e concentração.

As giberelinas (GA_3) possuem grande efeito no crescimento de plantas e atuam ativamente na germinação das sementes, facilitando o processo de germinação, além de promoverem o alongamento das raízes primárias (Hopkins; Huner, 2004).

Nos estudos de Sanchez (1980), obteve-se resultados superiores com a aplicação de KNO_3 , e em seguida por ácido giberélico (500 mg.L^{-1}), apresentando germinação de 50 e 30%, respectivamente. Já Morley-Bunker (1980) realizaram ensaios utilizando várias concentrações de GA_3 , não obtendo resultados satisfatórios, os quais foram relacionados com a presença de relação hormonal influenciando na dormência, ambos os estudos foram realizados com espécies de maracujá.

Marostega et al. (2017) avaliando o melhor tratamento pré-germinativo visando superar a dormência das sementes de espécies de *Passifloras*, utilizando diversos tratamentos, dentre eles: diferentes doses de KNO_3 e GA_3 . Observaram que o GA_3 na concentração de 1.000 mg L^{-1} resultou em melhores percentagens de germinação e que o tratamento KNO_3 2% teve efeito significativo sobre a quebra de dormência para todas as espécies avaliadas.

A pré-embebição das sementes de maracujá em GA_3 estimula a germinação de sementes e promove efeitos benéficos no vigor das plântulas (Santos et al., 2013). Lima et al. (2009) também observaram efeitos benéficos do GA_3 na germinação em sementes de maracujá.

3.3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.3.1. Material vegetal

As pesquisas foram realizadas no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), no setor de citogenética da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes/RJ. Para o presente estudo foram conduzidos três experimentos, objetivando avaliar a germinação seminal das espécies *P. cristalina*, *P. coccinea* e *P. miniata*.

As sementes utilizadas, neste estudo, foram obtidas de frutos completamente maduros, de plantas sadias, livres de pragas e doenças no ano de 2014 e encontravam-se na coleção de germoplasma da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, condicionadas em sacos de papel (envelope), identificadas e armazenadas em refrigerador (temperatura em torno de 6°C onde permaneceram por dois anos).

Precedente aos procedimentos realizados, a fim de testar a melhor metodologia para a quebra de dormência, todos os lotes de sementes passaram por um processo de desinfestação superficial, iniciado pela imersão das sementes em solução de etanol a 70% (v/v), por 30 segundos. Em seguida foi efetuada imersão das sementes em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (v/v), obtida pela diluição de uma solução a 10%, acrescida de uma gota de detergente comercial, posteriormente foi realizado três enxágues das sementes em água destilada. Na sequência, foi efetuada a remoção do tegumento das sementes com o auxílio de uma mini morsa, incluindo as sementes que foram utilizadas como controle.

O teste de tetrazólio foi realizado antes da aplicação dos três experimentos, para a verificação da viabilidade das sementes armazenadas, por ser considerado um método rápido de avaliação (Brasil, 1992). Realizou-se o teste de tetrazólio, utilizando 20 sementes de cada espécie, as sementes embebidas em água por 24 horas a 30 °C foram cortadas longitudinalmente, colocadas para colorir em solução de tetrazólio a 0,075% por 24 horas. Para a avaliação da viabilidade, os embriões foram excisados e visualizados sob lupa, sendo considerados viáveis aqueles que apresentaram coloração rósea em pelo menos metade do cotilédone e de todo o eixo embrionário (Malavasi et al., 2001).

Como não é conhecido o tempo necessário para a germinação das sementes das espécies estudadas, as avaliações foram realizadas a cada três dias até 112 dias, visando conhecer o comportamento da germinação.

3.2.2.1. Condução do experimento 1- Diferentes concentrações de nitrato de potássio (KNO₃)

Para cada espécie (*P. cristalina*, *P. coccinea* e *P. miniata*), foi realizado um pré-tratamento com três diferentes concentrações de nitrato de potássio (0, 10 e 20%) num período de exposição de 24 horas e temperatura de exposição no agitador de movimentos orbitais de 35°C.

Após a realização dos procedimentos descritos acima, as sementes foram colocadas para germinar em placa de petri, dispostas sobre duas folhas de papel Gernitest umedecido na proporção de 2,5 vezes o seu peso com água destilada e coberta por uma terceira folha. Cada placa de petri, foi transferida para uma câmara de germinação do tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*), regulada à temperatura alternada de 20-30°C e 16-8 horas de escuro-luz, respectivamente.

As três espécies foram submetidas ao delineamento experimental inteiramente casualizado no esquema fatorial 3x3, com três diferentes concentrações de KNO₃ e com duas repetições de 10 sementes, dando um total de 60 sementes.

O critério de germinação adotado foi à emissão de, no mínimo, 0,5 cm de extensão de radícula primária. A avaliação da germinação foi realizada por meio da contagem diária do número de sementes germinadas, durante o período de 112 dias.

Os resultados obtidos em número de sementes germinadas, foram transformados em $\sqrt{X + 0,5}$ e, posteriormente, submetidos à análise de variância, com comparação das médias pelo teste Ducam, ao nível de 5% de probabilidade. Utilizou-se o software Genes (Cruz, 2013) para realizar as análises estatísticas.

3.2.2.2. Condução do experimento 2- Diferentes concentrações de ácido giberélico (GA₃)

Para o presente estudo, o regulador vegetal testado foi o ácido giberélico (GA₃), as concentrações empregadas foram: 0, 500, 1.000 e 1.500 mg L⁻¹ (i.a).

Como fonte de GA₃ utilizou-se o produto comercial Pro-gibb®, que contém 10% de GA₃.

Para a aplicação dos tratamentos, as sementes foram imersas em beckers contendo 200 mL da solução (volume do produto diluído em água destilada), por um período de 24 h, durante o qual foi utilizado sistema de aeração. Logo após, as sementes foram semeadas em placas de petri autoclavada, dispostas sob papel para germinação tipo germitest autoclavado, umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco e acondicionado em câmara do tipo B.O.D., com temperatura de 20-30°C e fotoperíodo de 16-8 horas de escuro-luz.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com os tratamentos dispostos em esquema fatorial 3x4 (com quatro diferentes concentrações de GA₃), com 2 repetições de 10 sementes, dando um total de 80 sementes.

O experimento foi conduzido durante 112 dias, sendo as avaliações realizadas a cada dois dias. Foram consideradas germinadas as sementes que emitiram pelo menos 0,5 cm de raiz primária.

Os resultados obtidos em número de sementes germinadas, foram transformados em $\sqrt{X + 0,5}$ e, posteriormente, submetidos à análise de variância, com comparação das médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para a análise estatística utilizou-se o software Genes (Cruz, 2013).

3.2.2.3. Condução do experimento 3 - Diferentes temperaturas

Os testes de germinação foram realizados com quatro subamostras de 10 sementes, colocadas em placas de Petri forradas com papel germitest, mantidas em câmaras de germinação regulada tipo BOD. As temperaturas avaliadas foram: 25 °C constante e alternada de 20°C (12h) e 35 °C (12h). O fotoperíodo foi de 8-16 horas de luz/escuro.

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 3x2, onde se utilizou 3 espécies e 2 diferentes temperaturas com 4 repetições de 10 sementes, dando um total de 80 sementes, sendo cada repetição constituída por uma placa de Petri.

O efeito das temperaturas sobre o desempenho da germinação foi avaliada pela variável número de sementes germinadas. Os resultados obtidos em número de sementes germinadas foram transformados em $\sqrt{X + 0,5}$ e, posteriormente,

submetidos à análise de variância de acordo com o modelo fatorial com dois fatores, com comparação das médias pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para a análise estatística utilizou-se o software Genes (CRUZ, 2013).

O modelo estatístico usado para os três diferentes experimentos foi:

$$Y_{ijk} = m + G_i + A_j + GA_{ij} + E_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} = é o valor do i-ésimo espécie na j-ésima tratamento e na k-ésima repetição;

m = é a média geral;

G_i = efeito do i-ésimo espécie;

A_j = efeito do j-ésimo tratamento;

GA_{ij} = efeito da interação do i-ésimo espécie com o j-ésimo tratamento;

E_{ijk} = é o efeito do erro experimental.

3.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.3.1. Efeito do nitrato de potássio na superação da dormência de sementes de *Passiflora*

Na Tabela 1 é apresentado o resultado da ANOVA para os dados de germinação das sementes de *Passiflora* tratadas com nitrato de potássio (KNO_3). Os valores de germinação foram estatisticamente iguais para as três espécies em estudo, no entanto, houve diferença significativa entre as diferentes concentrações. Neste sentido, foi retirada uma média das três espécies, objetivando verificar a melhor concentração de nitrato de potássio (KNO_3) na germinação das sementes.

Os resultados apresentados mostram um alto coeficiente de variação, que provavelmente foi influenciado pela natureza da variável, que por ter um valor muito baixo, sofre proporcionalmente, grandes alterações com pequenas mudanças absolutas (Tabela 1).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância da contagem do número de sementes germinadas de *Passiflora*, com o uso do regulador vegetal KNO₃.

FV	GL	QM	F
Genótipo	2	0,09	0,37
Potássio	2	1,59	6,12*
GxP	4	0,29	1,13
Resíduo	9	0,26	
Resíduo total	17		
CV(%)	53,34		

¹Dados transformados em $\sqrt{(X+0,5)}$

Na tabela 2, observa-se que os valores de germinação, na concentração de KNO₃ a 20% foram superiores as demais concentrações, indicando que esse tratamento seguido da escarificação mecânica auxilia a quebra da dormência das três espécies. Pode-se observar também que o tratamento utilizando a concentração de 10% de KNO₃ apresentou uma maior percentagem de germinação quando comparada com o tratamento controle (0% de KNO₃), demonstrando que o tratamento pré-germinativo foi eficiente na quebra da dormência, mesmo que em menor percentagem.

De acordo com Baskin e Baskin (2004) a dormência de sementes pode ser classificada em fisiológica, morfológica, morfofisiológica, física e pela combinação destes mecanismos. A dormência fisiológica ou embrionária é causada por fatores endógenos e responde bem quando realizado pré-tratamentos germinativos como tratamento hormonal. De acordo com os resultados, as três espécies de *Passiflora* podem ser classificadas quanto ao tipo de dormência fisiológica e responsivas a compostos químicos como KNO₃, sendo mais eficiente o tratamento com a maior concentração de KNO₃ (20%).

Pode-se observar também uma baixa germinação das sementes que foram utilizadas como controle, este resultado pode ser atribuído ao fato destas sementes apresentarem dormência fisiológica e não física, pois, somente a retirada do tegumento não foi considerado um procedimento eficiente para a quebra de dormência (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados médios de germinação de sementes de *Passiflora* submetidas a tratamentos pré-germinativos com diferentes concentrações de KNO₃.

KNO ₃ (ng)	Germinação (%)
0,0	0b
0,1	5,5ab
0,2	13,33a

¹Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Ducam, a 5% de probabilidade. Dados transformados em $\sqrt{(X+0,5)}$

Lima et al. (2009) avaliando a germinação de sementes de diversas espécies silvestres de *Passiflora* observaram que as espécies silvestres tendem a apresentarem maior dormências em suas sementes, apresentam um menor índice de velocidade e percentual germinativo, comparadas com as espécies comerciais (*P. alata* e *P. edulis*).

A dormência de sementes é um dos fenômenos mais importantes para a evolução de espécies silvestres para superar condições ambientais adversas e colonizar novos habitats de crescimento inadequado. O presente estudo tenta trazer informações sobre a germinação de sementes de *Passiflora* e fornecer estudos básicos para aprofundar o conhecimento sobre a superação da dormência e a germinação de sementes para espécies silvestres.

3.2.3.2. Germinação em função dos procedimentos para superação de dormência utilizando ácido giberélico (GA₃)

Pela análise de variância observa-se um efeito significativo do tratamento hormônio ($p > 0,05$), e também da interação entre genótipos e hormônios (Tabela 3). Assim, foi realizado o desdobramento da interação.

Outra variável que merece atenção na Tabela 3 é a estimativa do coeficiente de variação (CV%), visto que ele indica a precisão do experimento, quanto menor este índice, melhor a precisão (Fonseca; Martins, 1996). Neste trabalho, constata-se que o valor estimado foi considerado muito alto, isso de acordo com Gomes (1990), que determinou que CV% muito alto são superiores a 30%, demonstrando a baixa precisão do experimento, no entanto, é importante ressaltar que houve grande variação entres os valores obtidos, aumentando a variação na média geral do experimento.

Tabela 3 - Resumo da análise de variância da contagem do número de sementes germinadas de *Passiflora*, com o uso do regulador vegetal GA₃.

FV	GL	QM	F
Genótipo	2	0,25	1,4
Hormônio	3	1,24	6,77*
G x H	6	0,83	4,54*
Resíduo	12	0,18	
Resíduo Total	23		
CV(%)	41,64		

¹Dados transformados em $\sqrt{(X+0,5)}$

A maior percentagem de germinação foi observada nas sementes da espécie *P. miniata* na concentração de 1.500 mg L⁻¹, quando comparadas com a aplicação de 0; 500 e 1.000 mg L⁻¹, sugerindo que o uso deste procedimento auxilia na quebra da dormência. As sementes da espécie *P. miniata* possivelmente apresentam dormência química e/ou mecânica, pois, foi possível observar que a escarificação do arilo seguida do tratamento pré-germinativo com ácido giberélico (GA₃) foi suficiente na quebra da dormência de suas sementes. Segundo Delanoy et al. (2006), a dormência a combinação de dormência mecânica e fisiológica, está presente na maioria das espécies de *Passiflora*.

Para as demais espécies (*P. cristalina* e *P. coccinea*) a média de sementes germinadas não diferiu dos procedimentos adotados a $p > 0,05$ (Tabela 3), ou seja, o uso do ácido giberélico (GA₃) nas diferentes concentrações foi ineficiente na superação da dormência de tais espécies, apontando que a dormência das sementes de tais espécies, provavelmente, não é uma dormência fisiológica ou química, ou seja, não está relacionada ao balanço hormonal das sementes. Este resultado pode estar atribuído a diferenças quanto ao grau de maturidade dos frutos (Araújo et al., 2012), aos genótipos e à idade das plantas (Alexandre et al., 2005; Delouche; Baskin, 1973), à metodologia de separação do arilo (Pereira; Dias, 2000), à temperatura (Osipi; Nakagawa, 2005a), ao fotoperíodo (Zucarelli et al., 2009), às condições de armazenamento a que foram submetidas as sementes (Pereira et al., 2011), à umidade das sementes, dentre outros fatores.

É possível notar, que a germinação do controle (Tabela 4) foi a que obteve a pior percentagem de germinação, indicando ser necessário realizar procedimento para superação de dormência, corroborando com as recomendações proposta por Morley-Bunker (1974), que afirma que o uso da técnica de escarificação mecânica

e embebição em giberelina podem eliminar o fator responsável pela dormência e acelerar e uniformizar a germinação das sementes de Passifloraceas.

Tabela 4 - Dados médios de germinação de sementes de *Passiflora* submetidas a tratamentos pré-germinativos com diferentes concentrações de GA₃.

Genótipo	Concentrações (mg L ⁻¹)			
	0	500	1.000	1.500
<i>P. miniata</i>	0Ba	10Ba	0Ba	55Aa
<i>P. cristalina</i>	0Aa	5Aa	15Aa	0Ab
<i>P. coccinea</i>	0Aa	10Aa	20Aa	25Ab

¹Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na linha e letras minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Dados transformados em $\sqrt{(X+0,5)}$.

No presente trabalho foram consideradas germinadas as sementes com simples emissão da raiz primária, no entanto, isso não garante que a semente irá originar uma planta normal, trabalhos realizados por Costa et al. (2010), Santos et al. (2010) e Pádua et al. (2011), também consideraram esse mesmo critério.

A literatura mostra que o uso de ácido giberélico (GA₃) pode ter efeito positivo na germinação de sementes, no entanto, a concentração ideal desse regulador vegetal vai ser diferente para cada espécie. Em sementes de *P. ligularis*, a maior percentagem de germinação foi obtida com a utilização de 500 mg L⁻¹ de GA₃ (Cadorin et al., 2017). Em *P. alata*, a aplicação de GA₃ na concentração de 1.000 mg L⁻¹ foi benéfica para aumentar a velocidade de emergência das sementes (Ferreira et al., 2001).

O emprego da giberelina tem sido fundamental, uma vez que elas promovem a alongação e divisão celular, o que é evidenciado pelo incremento no comprimento e no número de células em resposta à aplicação deste regulador vegetal (Taiz; Zeiger, 2017).

Vários autores relatam que o uso de giberelina aumenta a germinação de *Passiflora* (Ferreira, 1998; Ferreira et al., 2001; Ferreira et al., 2001; Fogaça et al., 2001). Segundo Ferreira et al. (2001) a partir de 500 mg L⁻¹ de ácido giberélico, ocorre aumento da germinação de sementes de *Passiflora*.

Diante do exposto, é possível dizer que a aplicação do GA₃ a 1.500 mg L⁻¹ tenha promovido a germinação das sementes de *P. miniata* que se encontravam em um status fisiológico predispostas à germinarem, porém, o balanço hormonal

não estava adequado para que isso ocorresse. Dessa forma, a aquisição de GA₃ por essas sementes proporcionou que as mesmas se desenvolvessem e germinassem.

3.2.3.3. Efeito da temperatura na avaliação da germinação de sementes de *Passiflora*

Na Tabela 5, encontram-se os resultados das análises de variância e os coeficientes de variação correspondentes aos testes de germinação em sementes de *Passifloras*, em função do fator duas temperaturas. Observa-se que para o tratamento (temperatura) houve diferença significativa ($p < 0,05$), no entanto, foram estatisticamente iguais para as três espécies avaliadas, ou seja, não houve interação entre os fatores.

De modo geral, a percentagem de germinação foi baixa, independentemente da temperatura, verifica-se que a temperatura alternada de 20- 35°C sob fotoperíodo foi de 8-16 horas de luz/escuro atuou significativamente na obtenção de maior percentagem de germinação (Tabela 5), atingindo média de 81,25%, o que diferiu significativamente do tratamento 25°C constante (26,25%), também sob fotoperíodo de 8-16 horas de luz/escuro.

Tabela 5 - Resumo da análise de variância da contagem do número de sementes germinadas de *Passiflora*, submetidas a diferentes temperaturas.

FV	GL	QM	F
Genótipo	2	0,26	0,78
Temp.	1	7,8	36,25*
GxT	2	0,42	1,95
Resíduo	18	0,25	
Resíduo Total	23		
CV(%)	20, 21		

¹Dados transformados em $\sqrt{(X+0,5)}$

Resultados semelhantes foram observados em sementes de *P. alata* e *P. edulis*, com diferenças significativas na germinação com o uso de temperatura alternada 20-35°C (Osipi; Nakagawa, 2005; Santos et al., 1999).

De certa forma, o resultado obtido para 20-35°C também concordam com os resultados do tratamento-testemunha obtidos por Ferreira (1998) em suas investigações com Passifloraceas, para as quais utilizou temperatura alternada de

20-35°C. Portanto, esses resultados reforçam a importância da temperatura alternada como forma de superação da dormência, como relataram Bewley & Black (1982) e Carvalho e Nakagawa (1988).

As espécies *P. cristalina*, *P. coccinea* e *P. miniata* são espécies nativas da região amazônica. Segundo Kopen (1938), o clima do tipo AW é tropical chuvoso com nítida estação seca, cuja temperatura média anual é de 26 °C e varia entre 20 °C e 38 °C. Considerando os resultados obtidos, pode-se concluir que o melhor tratamento para superação de dormência foi o da temperatura alternada, pois, o mesmo simula as condições de ambiente onde a planta se encontra melhor adaptada.

3.2.4. CONCLUSÕES

O nitrato de potássio (KNO_3) na concentração de 20% foi eficiente no aumento de germinação das sementes de espécies de *Passiflora*, utilizadas no presente estudo, que estavam armazenadas por um longo período. Esse composto nitrogenado foi mais expressivo no aumento da percentagem de germinação conforme o aumento da concentração, visto que, as sementes utilizadas como tratamento controle não germinaram sem a aplicação do regulador vegetal.

O tratamento pré-germinativos contendo 1.500 mg L^{-1} de GA_3 foi capaz de superar a dormência de sementes de *P. miniata*, entretanto, as demais espécies não tiveram percentagem de germinação melhorada em nenhum dos tratamentos, exceto com o tratamento controle (0 mg L^{-1}), inferindo que as sementes de tais espécies, possivelmente, não apresentam somente dormência morfofisiológica e que outros fatores podem estar relacionado com a dormência das sementes dessas espécies ou ainda que as concentrações adotadas no presente trabalho não foram eficientes.

A germinação das sementes das três espécies de *Passiflora* foi incrementada quando submetida ao tratamento utilizando temperatura alternada de 20- 35°C sob fotoperíodo foi de 8-16 horas de luz/escuro, do qual, simula as condições ambientais da região em que tais espécies encontram-se melhor adaptadas.

Para os três tratamentos (KNO_3 ; GA_3 ; Temperatura), foi possível observar que as sementes das espécies de *Passifloras* quando utilizadas como controle, obtiveram um valor de germinação nulo, demonstrando que tais sementes apresentam dormência do tipo fisiológica, pois, mesmo submetidas à escarificação mecânica não houve incremento na percentagem de germinação. Concluindo que o uso de tratamentos pré-germinativos responde bem na quebra da dormência de tais espécies. No entanto, sugere-se realizar um experimento num esquema multifatorial, a fim de avaliar os efeitos de todos os tratamentos simultaneamente e a interação entre eles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, P. P., Souza, M. M., Santos, E. A., Pires, M. V., Pires, M. M., Almeida, A. A. F. (2009) Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant Market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brasil. *Euphytica*. 166: 307-315.
- Alexandre, R. S., Junior A.W., Negreiros, J.R.S., Parizzoto, A., Alfenas, P.F., Braz, A.S.K., Torres, L.B., Santana, E.N. (2005) Transgenic passion fruit expressing RNA derived from Cowpea aphid-borne mosaic virus is resistant to passionfruit woodiness disease. *Fitopatologia Brasileira*. 30:33-38.
- Almeida, A. M.; Nakagawa, J.; Almeida, R. M. (1988) Efeito do enraizamento na germinação de sementes de maracujá amarelo de diferentes estágios de maturação: experimento. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 9, 1987, Campinas: Sociedade Brasileira de Fruticultura, p.603-608.
- Andrade, S. R. M.; Rosa, S. D.; Araujo, C. S.; Faleiro, F. G.; Junquiera, N. T. V. (2010) Estudos preliminares sobre germinação de *Passiflora nítida*. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 269, Embrapa Cerrados, Planaltina-DF.
- APG III. (2009) Angiosperm Phylogenetic Group III. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. London, 161: 105-121.

- Araújo, F. P.; Melo, N. F.; Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Queiroz, M. A.; Coelho, M. S. E. (2012) Seleção de acessos de maracujazeiros silvestres visando resistência à fusariose. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22., 2012, Bento Gonçalves. Anais... Bento Gonçalves, RS.
- Arcade, A. F.; Anselin, P.; Faivre, R. M. C.; Lesage, L. E.; Prat, D. (2000) Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theoretical and Applied Genetics*, v.100, p.299-307.
- Arias, C. A. O.; Caetano, C.M.; D'eeckenbrugge, G.C.; Angel, L.S. (2002) Chromosome number, meiotic behavior and pollen fertility of *Passiflora tarminiana* Coppens & Barney, a new species of *Passiflora* (subgenus *Tacsonia*). *Nucleus*, v. 45(3), p.96–102.
- Barbará, T.; Palma-Silva, C.; Paggi, G. M.; Bered, F.; Michael F.; Lexer, C. (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*. 16: 3759–3767.
- Barbosa, L. V.; Vieira, M. L. C. (1997) Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystine* Mikan. *Euphytica*, v. 98, p. 121- 127.
- Barroso, G.M. (1978) *Passifloraceae*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos; São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*, 1: 194-197.
- Baskin, J.M.; Baskin, C.C. (2004) A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14:1-16.
- Beal, P. R., (1969a). Cytology of the native Australian *Passiflora* species. 1. Chromosome number and horticultural value. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, v. 26, n. 3, p. 407-421.
- Beal, P. R. (1969b) Chromosome numbers of exotic *Passiflora* species in Australian. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, v. 26, n. 1, p. 73-81.

- Bellon, G., Faleiro, F.G., Junqueira, K.P., Junqueira, N.T.V. (2007) Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura. 29: 124-127.
- Bennett, M.D.; Bhandol, P.; Leitch, I.J. (2011) Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses, target, trends and tomorrow. Annals of Botany, London, 86: 467-590.
- Bentham, G.; Hooker, J. D. (1867) Passifloraceae. In:_____.Genera Plantarum. Reeves, London: 1: 807-816.
- Bernacci, L.C.; Meletti, L.M.M.; Soares-Scott, M.D.; Passos, I.R.S.; Junqueira, N.T.V. (2005) Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F. (Eds) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.559-586.
- Bernacci, L. C.; Soares-Scott, M. D.; Junqueira, N. T. V.; Passos, I. R. S.; Meletti, L. M. M. (2008) *Passiflora edulis* Sims: The correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal. 30(2): 566 – 576.
- Bernacci, L.C.; Cervi, A.C.; Milward-De-Azevedo, M.A.; Nunes, T.S.; Imig, D.C.; Mezzonato, A.C. (2014) Passifloraceae In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128567>.
- Berry, P.E. (1987) Chromosome Number Reports 95. Taxon, v.36, p. 493.
- Bewley, S.D.; Black, M. (1982) Physiology and biochemistry of seeds. New York: Springer-Verlag, 375p.
- Borba, R. D. S.; Garcia, M. S.; Kovalleski, A.; Oliveira, A. C.; Zimmer, P. D.; Branco, J. S. C.; Malone, G. (2005). Dissimilaridade genética de linhagens de *Trichogramma Westwood* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) através de marcadores moleculares ISSR. Neotropical Entomology 34: 565-569.

- Borém, A.; Caixeta, E. T. (2009) Marcadores moleculares. 2ª Ed. Viçosa, MG., 374p.
- Bornet, B.; Branchard, M. (2002) Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Report*, v. 19, p. 209–215.
- Bowden, M. W. (1945) A list of chromosome numbers in higher plants. II. Menispermaceae to Verbenaceae. *American Journal of Botany*, v. 32, p. 191-201.
- Brasil, (1992) Ministério da Agricultura. Regras para análise de sementes. Brasília: SND/CLAV, 365 p.
- Bravo, J. P; Hoshino, A.A; Angelici, C.M.L.C.D; Lopes, C.R; et. al. (2006). IMENES, M.A.. Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 516-524.
- Cadorin, D.A.; Villa, F.; Dalastra, G.M.; Heberle, K., Rotili, M.C.C. (2017) Tratamentos pré-germinativos em sementes de granadilha (*Passiflora ligularis*) Pregermination treatment in granadilha (*Passiflora ligularis*) seeds. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v.16, n.3, p.256-261.
- Capdeville, G.D; Souza Júnior, M.T.; Szinay, D.; Diniz, L.E.C.; Wijnker, E.; Swennen, R.; Kema, G.H.J.; Jong, H.D. (2009) The potential of high-resolution BAC-FISH in banana breeding. *Euphytica*, Wageningen, 166: 431-443.
- Cardoso, V. J. M. (2004) Dormência: estabelecimento do processo. In: Ferreira, A. G. E Borghetti, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, p. 95-108.
- Carvalho, N.M.; Nakagawa, J. (1988) Sementes: ciência, tecnologia e produção. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 424p.
- Carvalho, S.I.C.; Ragassi, C.F.; Oliveira, I.B.; Amaral, Z.P.S, et. al. (2015). Transferability of microsatellite markers of *Capsicum annuum* L. to C.

- frutescens L. and *C. chinense* Jacq. *Genetics and Molecular Research*. 14 (3): 7937-7946.
- Castellen, M.S.; Cervi, A.C.; Amaral, W.A.N. (2005) O gênero *Passiflora* L. nos tabuleiros costeiros. In: SILVA Jr., J.F. (Org.). Recursos genéticos dos tabuleiros e seus ecossistemas associados - fruteiras. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros.
- Castro, J.A.; Neves, C.G.; De Jesus, O.N.; Oliveira, E.J. (2012) Definition of morpho-agronomic descriptors for the characterization of yellow passion fruit. *Scientia Horticulturae*, 145:17–22.
- Cazé, A.L.R.; Kriedt, R.A.; Beheregaray, L.B.; Bonatto S.L.; Freitas, L.B. (2012) Isolation and characterization of microsatellite markers for *Passiflora contracta*. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 11343-11348.
- Cerqueira-Silva, C. B. M.; Moreira, C. N.; Figueira, A. R. ; Corrêa, R. X.; Oliveira, A. C. (2008) Detection of a resistance gradient to Passion fruitwoodiness virus and selection of yellow passion fruit plants under field conditions. *Genetics and Molecular Research*, 7 (4): 1209-.
- Cerqueira-Silva, C.B.M.; Santos, E.S.L.; Conceição, L.D.H.C.S.; Cardoso-Silva, C.B.; Pereira, A.S.; Oliveira, A.C.; Corrêa, R. X. (2012a) Genetic variation in a wild population of the “sleep” passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. *Genetics and molecular research*. 11(1): 731–738.
- Cerqueira-Silva, C. B. M.; Conceição, L. D. H. C. S.; Souza, A. P.; Corrêa, R. X. (2014a) A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. *Eur. J. Plant Pathol.* 139:261–270.
- Cervi, A.C. (1997) *Passifloraceae* do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*. *Fontqueria*, Washington, 45: 1-92.
- Cervi, A.C.; Linsingen, L. (2010) *Passiflora kikiania*, uma nova espécie de *Passifloraceae* da Amazônia brasileira. *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, 4: 1062-1064.

- Chaves, R.C.; Junqueira, N.T.V.; Manica, I.; Peixoto, J.R.; Pereira, A.V.; Fialho, J.F. (2004) Enxertia de maracujazeiro-azedo em estacas herbáceas enraizadas de espécies de *passifloras* nativas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal. 26(1): 120 – 123.
- Clarindo, W. R.; Carvalho, C. R. (2009) Comparison of the *Coffea canephora* and *C. arabica* karyotype based on chromosomal DNA content. *Plant Cell Rep* 28:73–81.
- Collard, B.C. Y.; Andmarckill, D. J. (2009) Conserved DNA-Derived polymorphism (CDDP): A simple and novel method for generating DNA markers in plants. *Plant Mol. Bio. Rep*, v. 27, p. 558-562.
- Conceição, L. D. H. C. S.; Souza, M. M.; Belo, G. O.; Santos, S. F.; Freitas, J. C. O. (2011) Hybridization among wild passionflower species. *Revista Brasileira de Botânica*, 34 (2): 237-240.
- Costa, C. J.; Simões, C. O.; Costa, A. M. (2010) Escarificação mecânica e reguladores vegetais para superação da dormência de sementes de *Passiflora setacea*. Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 271).
- Costa, J. L.; Jesus, O. N. D.; Oliveira, G. A. F.; Oliveira, E. J. D. (2012) Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 12: 253-260.
- Cronquist, A. (1981) An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press. 262 p.
- Cruz, C. D. Programa GENES: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 442 p, 2013.
- Cucco, S. M.; Vieira, M. L. C.; Aguiar-Perecin, M. L. R. (2005) Técnicas para a obtenção de preparações citológicas com alta frequência de metáfases mitóticas em plantas: *Passiflora* (Passifloraceae) e *Crotalaria* (Leguminosae). *Acta Botanica Brasilica*. 17: 1-7.

- Cunha, M. A. P. Da.; Krampe, R. In: Lima, A. A. (1999) O cultivo do maracujá. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, cap. 4, p. 18-25.
- Cunha, M. A. P.; Barbosa, L. V.; Junqueira, N. T. V. (2002) Aspectos Botânicos. In: LIMA, A. A. (Ed.) Maracujá produção: aspectos técnicos. Embrapa Mandioca e Fruticultura – Cruz das Almas. Brasília: Embrapa Informação tecnológica. p.15-24.
- Damasceno Junior, P.C.; Costa, F.R.; Pereira, T.N.S.; Freitas Neto, M.; Pereira, M.G. (2009). Karyotype determination in three Caricaceae species emphasizing the cultivated form (*Carica papaya* L). *Caryologia*, 62:10-15p.
- Deginani, N.B.; Escobar, A. (2002) Números cromosômicos de espécies de *Passiflora* (Passifloraceae). *Hickenia*, v.3(36), p.143–144.
- Delachiave, M.E.A.; Pinho, S.Z. (2013) Scarification, temperature and light in germination of *Senna occidentalis* seed (Caesalpinaceae). *Seed Science and Technology*, v.31, p.225- 230.
- Delanoy, M.; Van Dammea, P.; Scheldeman, X.; Beltran, J. (2006). Germination of *Passiflora mollissima* (Kunth) L H Bailey, *Passiflora tricuspidata* Mast. And *Passiflora* nov sp. Seeds. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 110, n. 30, p. 198-203.
- Delouche, J. C.; Baskin, C. C. (1973) Accelerates aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Science and Technology*, v. 1, p. 427-452.
- Engler, A. (1894) *Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*. Bot. Jahrb. 46: 1-14.
- Fajardo, D.; Angel, F.; Grum, M.; Tohme, J.; Lobo, M.; Roca, W.M.; Sanchez, I. (1998) Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. *Euphytica*, Wageningen, 101: 341-347.
- Faleiro, F.G.; Pires, J.L.; Lopes, U. V. (2003). Uso de Marcadores Moleculares RAPD e Microsatélites Visando a Confirmação da Fecundação Cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. *Agrotrópica*, v. 15, n.1, p. 41-46.

- Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. (2005) Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 187-210.
- Faleiro, F.G. (2007) *Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 102p.
- Ferreira, F.R., Oliveira, J.C. (1991) Germoplasma de *Passiflora* no Brasil. In: São José, A.R. (Ed.) A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP, p.187-201.
- Ferreira, G. (1998) Estudo da embebição e do efeito de fitorreguladores na germinação de sementes de Passifloráceas, 139 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, p. 220.
- Ferreira, G.; Fogaça, L. A.; Bloedorn, M. (2001) 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, Jaboticabal, v. 23, n. 1, p. 152-181.
- Ferreira, G.; Fogaça, L. A.; Moro, E. (2001) 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, p. 160-163.
- Ferreira, G. (2010) Propagação do maracujazeiro. Informe Agropecuário, v.21, p.18.
- Feuillet, C.; Macdougall, J. M. (2003) Checklist of recognized speciesnames of passion flowers. *Passiflora*, Beltsville, 12: 41-43.

- Feuillet, C.; Macdougall, J.M. (2004) A new infragener classification of *Passiflora*. *Passiflora*, Beltsville, 14:1-4.
- Feuillet, C.; Macdougall, J. M. (2007) Passifloraceae. In: Kubitzki; K. (ed.) The families and genera of vascular plants. Springer, Berlin.
- Fischer, I. H.; Kimati, H.; Rezende, J. A. M. (2011) Doenças Do Maracujazeiro (*Passiflora* Spp.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Rezende, J. A. M.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L. E. A. (Eds.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, p. 467-474.
- Fogaça, L. A.; Ferreira, G.; Bloedorn, M. (2001) 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, p. 152-155.
- Fonseca, J. S.; De Martins, G. A. (1996) Curso de Estatística, 6 ed, São Paulo: Atlas, 320 p.
- Fowler, J.A.P.; Bianchetti, A. (2010) Dormência em sementes florestais. Colombo: EMBRAPA-Florestas, doc.40.
- Fukui, K.; Nakayama, S. (1996) Plant Chromosomes: laboratory methods. CRC Press, New York, 274 pp.
- Ganga, R. M. D.; Ruggiero, C.; Lemos, E. G. M.; Grili, G. V. G.; Gonçalves, M. M.; Chagas, E. A.; Wickert, E. (2004) Diversidade genética em maracujazeiro-amarelo utilizando marcadores moleculares AFLP. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 26: 494 – 498.
- Gilbert, L.E.; Macdougall, J.M. (2000) *Passiflora microstipula*, a new species of Passifloraceae from southeast Mexico. *Lundellia*, v.3, p.1–5.
- Gomes, F. P. (1990) Estatística experimental. Universidade de São Paulo: Piracicaba-SP. 240p.
- Grolli, P. R. (1999) Propagação das plantas ornamentais. *Plantas ornamentais: aspectos para a produção*. Passo Fundo: Ediupf, p. 41-51.

- Guerra, M. (1986) Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco, I. *Genetics and Molecular Biology*, v. 9, p. 21-40.
- Guerra, M.; Pedrosa, A.; Silva, A. E. B.; Cornélio, M. T. M.; Santos, K.; Soares-Filho, W.S. (1997) Chromosome number and secondary constriction variation in 51 acessions of a Citrus germoplasm bank. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, Brasil, 20: 489 – 496.
- Guerra, M; Souza, M.J. (2002) Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC, 131p.
- Hajjar, R.; Hodgkin, T. (2007). The use of wild relative in crop improvement: a survey of developments over the last 20 years. *Euphytica*. 156 (1-2): 1 – 13.
- Hansen, A.K.; Gilbert, L.E.; Simpson, B.B.; Downie, S.R.; Cervi, A.C.; Jansen, R.K. (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *passiflora*. *Systematic Botany*, 31(1):138–150.
- Hopkins, W.G.; Hüner, N.P.A. (2004) Introduction to plant physiology. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 560p.
- Huziwara, Y. (1962) Karyotype analysis in some genera of compositae. VIII. Further studies on the chromosome of Aster. *American Journal of Botany* 49:116-119p.
- Ince, A.G.; Karaca, M.; Onus, A.N. (2010) Polymorphic Microsatellite Markers Transferable Across *Capsicum* Species Genetic. *Plant Mol. Biol. Rep.* 28:285-291.
- Isshiki, S.; Iwata, N. A. N, D.; Khan, M. M. R. (2008) ISSR variations in eggplant (solanummelongenal.) and related Solanum species. *Sci. hort*, v. 117, P. 186-190.
- Jorgensen, P.M.; Lawesson, J.E.; Holm-Nielsen, L.B. , (1984) A guide to collecting Passionflowers. *Annals of Missouri Botanical Garden*, Jefferson City, 71: 1172-1174.

- Junghans, T. V.; Viana, A. J. C.; Junghans, D. T. (2010) Armazenamento e tratamento mecânico na emergência de plântulas de *Passiflora gibertii*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-5003, 45).
- Junqueira, N.T.V., Lage, D.A.C., Braga, M.D., Peixoto, J.R., Borges, T.A., Andrade, S. R. M.; Rosa, S. D.; Araujo, C. S.; Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V. (2006) Estudos preliminares sobre germinação de *Passiflora nítida*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 269, Embrapa Cerrados, Planaltina-DF, fevereiro, 2010., S.R.M. Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro-azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas herbáceas de *passiflora* silvestre. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, 28(1):97-100.
- Junqueira, K. P.; Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Bellon, G.; Ramos, J. D.; Braga, M. F.; Souza, L. S. (2008) Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. Revista Brasileira de Fruticultura, 30 (1): 191-196.
- Junqueira, N.T.V.; Chaves, R.C.; Manica, I.; Peixoto, J.R.; Pereira, A.V.E.; Fialho, J.F. (2012) Propagação do maracujazeiro azedo por enxertia em estacas herbáceas enraizadas de espécies de *passifloras* nativas. Planaltina: Embrapa Cerrados, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, v.39, p.15.
- Killip, E.P. (1938) .The American species of Passifloraceae. Publications Field Museum of Natural History - Botanical Series, London, 19: 1-613.
- kopen, W. (1938) Das geographische system der climate. Handbuch de klimatologie, bortraeger, Berlim.
- Kuhne, F. A. (1968) Cultivation of granadillas. Farming in South Africa, v. 43, n. 11, p. 29-32.
- Kumar, P.; Gupta, V.K.; Misra, A.K.; Modi, D.R.; Pandey, B.K. (2009) Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology, *Plant Omics*. 2:141-162.

- Levan, A.; Fredg, K.; Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes *Hereditas*, v. 52, p. 201-220.
- Lim, T. K. (2012) *Passiflora miniata*. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Volume 4, Fruits. 178 – 180p.
- Lima, A. A.; Caldas, R. C.; Santos, V. S.(2009). Germinação e crescimento de espécies de maracujá. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28(1): 125-127.
- Litt, M.; Luty, L.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, Chicago, 44: 398-401.
- Lombardi, S. L. (2003) Estudos anatômicos e fisiológicos da organogênese in vitro em *Passiflora cincinnata* Mast. 2003. 60 f. Dissertação (Mestrado – Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.
- Lopes, J. C.; Dias, P. C.; Macedo, C. M. P. (2006) Tratamentos para acelerar a germinação e reduzir a deterioração das sementes de *Ormosia nitida* Vog. *Revista Árvore*, v.30, n.2, p.171-177.
- Lorenzi, H.; Sartori, S.; Bacher, L.B.; Lacerda, M. (2006) Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: (consumo in natura), São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p.639.
- Macdougall, J. M.; Feuillet, C. (2004) Systematics. In: ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. (Org.). *Passiflora - Passionflowers of the world*. Portland: Timber Press, p. 27-31.
- Macdougall, J.M. (2011). Two new species of Passionflower (*Passiflora*, Passifloraceae) from southwestern Mexico. *Novon*. 11: 69 – 75, 2001.TTI, L.M.M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal-SP, Volume Especial, E. 083-091.
- Malavasi, M. M.; Fogaça, C. A.; Fogaça, L.; Ferreira, G. (2001) Preparo e coloração de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander) para a avaliação

da viabilidade através de teste do tetrazólio. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Campinas, v.23, n.1, p.126–129.

Mapa. Plano nacional de desenvolvimento da fruticultura. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-lanca-plano-de-fruticultura-emparceria-com-o-setor-privado/PlanoNacionaldeDesenvolvimentodaFruticulturaMapa.pdf>>. Acesso em 5 maio 2018.

Marostega, T.N.; Luz, P.B.; Tavares, A.R.; Neves, L.G.; Sobrinho, S.P. (2017) Methods of breaking seed dormancy for ornamental passion fruit species. *Ornamental Horticulture*, v.23, n.1, p.72-78. DOI: <http://dx.doi.org/10.14295/oh.v23i1.982>.

Mayeda, L. Y.; Vieira, M. L. C. (1995) Estudo cariotípico de três espécies do Gênero *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 18 p. 426.

Mayeda, L. Y. (1997) Estudos Citogenéticos em Dez Táxons do Gênero *Passiflora* L. 1997. 89 f. Dissertação (Mestrado em Agromomia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP.

Meletti, L. M. M., Bruckner, C. H. (2001) Melhoramento genético. In: Bruckner, C. H., Picanço, M. C. (ed.). *Maracujá tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 345-385.

Meletti, L.M.M., Soares-Scott, M.D., Bernacci, L.C., Passos, I.R.S. (2005) Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F. (Eds.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 55-78p.

Meletti, L. M. M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal, 33: 83-91.

Melo, N. F.; Cervi, A. C.; Guerra, M. (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae), *Plant Systematics and Evolution*, 226: 69-84.

- Melo, N. F. (2002) Caracterização citogenética de espécies silvestres e cultivadas de maracujazeiro (*Passiflora* spp.). Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 125f.
- Melo, N. F.; Guerra, M. (2003) Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany*, 92: 309-316.
- Melo, D. L. B. (2005) Dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, UFLA.
- Melo, C.A.F.; Silva, G.S.; Guerra, M. (2015) Establishment of the genomic in situ hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. *Genetics and Molecular Research*, v.14(1), p.2176-2188.
- Morley-Bunker, M. J. S. (1974) Some aspects of seed dormancy with reference to *Passiflora* spp. and other tropical and subtropical crops. London: University of London,. 43 p.
- Morley-Bunker, M. J. S. (1980) Seed coat dormancy in *Passiflora* species. *Annual Journal*, v.8, p. 72-84.
- Muschner, V. C.; Lorenz, A. P.; Cervi, A. C.; Bonatto, S. L.; Souza-Chiez, T. T.; Salzano, F. M.; Freitas, L. B. (2003) A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). *American Journal of Botany*, v. 90, n. 8, p. 1229-1238.
- Muschner V.C., Lorenz-Lemke A.P., Vecchia M., Bonatto S.L., Salzano F.M., Freitas L.B. (2006) Differential organellar inheritance in *Passiflora*'s (Passifloraceae) subgenera. *Genetica*. 1(3):449-53.
- Nunes, T.S., Queiroz, L.P. (2006) Flora da Bahia: Passifloraceae. *Sitientibus. Série Ciências Biológicas*, 6(3):194-226.
- Oliveira, J.C.; Nakamura, K.; Mauro, A.O.; Centurion, M.A.P.C. (1994) Aspectos gerais do melhoramento do maracujazeiro. In: SÃO JOSE, A.R. (Ed.) *Maracujá: produção e mercado*. Vitória da Conquista: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 1994. p.27-37.

- Oliveira, S. C.; Ruggiero, C. (1998) Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro, Jaboticabal, SP, Anais... Jaboticabal, SP: FUNEP, p.291–310.
- Oliveira, L. M.; Davide, A. C.; Carvalho, M. L. M. (2003) Avaliação de métodos para a quebra da dormência e para a desinfestação de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). *Revista Árvore*, v.27, n.5, p.597-603.
- Oliveira, E. J.; Pádua, J. G.; Zucchi, M.I.; Vencovsky, R.; Viera, M. L. C (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.29, In press.
- Oliveira, E.j.; Vieira, M.L.C.; Garcia, A.A.F; Munhoz, C.F.; et al. (2008) An integrated molecular map of yellow passion fruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. *J. Am. Soc. Hortic. Sci*, v. 133, p. 35-41.
- Oliveira, J.R.; São José, A. R.; Rebouças, T. N. H.; Moraes, O. M.; Dourado, F. W. N. (2010). Superação de dormência de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 32, n. 2, p. 584-590.
- Oliveira, E. J.; Soares, T. L.; Barbosa, C. J.; Santos-Filho, H. P.; Jesus, O. N. (2013a) Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. *Revi. Bras. Frutic.* 35: 485–492.
- Oliveira, G. A. F.; Pádua, J. G.; Costa, J. L.; Jesus, O. N. D.; Carvalho, F. M. D.; Oliveira, E. J. D. (2013b) Cross-species amplification of microsatellite loci 94
- Pádua, J.G.; Oliveira, E.J.; Zucchi, M.I.; OliveirA, G.C.X.; et. al. (2005). Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). *Mol. Ecol. Notes* 5: 863-865.
- Pádua, J.G.; Schwingel, L.C.; Mundim, R.C.; Salomão, A.N.; Roverijósé, S. C.B. (2011) Germinação de sementes de *Passiflora setacea* e dormência induzida pelo armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 33(11):80-85.

- Paiva, C.L.; Viana, A.P.; Santos, E.A.; Silva, R.N, et al. (2014a). Diversidade genética de espécies do gênero *Passiflora* com o uso da estratégia Ward-MLM. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 2, p. 381- 390, Junho.
- Paiva, C. L.; Viana, A. P.; Santos, E. A.; Freitas, J. C. D. O.; Silva, R. N. O.; Oliveira, E. J. D. (2014b) Genetic variability assessment in the genus *Passiflora* by SSR markers. Chilean J. Agric. Res. 74:355-360.
- Passos, I. R. S. (1999) Comportamento in vitro em *Vitis* ssp. e em *Passiflora nitida* HBK.122 f. Tese (Doutorado)-Piracicaba: Universidade de São Paulo.
- Penha, H. A.; Pereira, G. D. S.; Zucchi, M. I.; Diniz, A. L.; Vieira, M. L. C. (2013) Development of microsatellite markers in sweet passion fruit, and identification of length and conformation polymorphisms within repeat sequences. *Plant Breed.* 132: 731-735.
- Pereira, K. J. C.; Dias, D. C. F. S. (2000) Germinação e vigor de sementes de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* forma flavicarpa Deg.) submetidas a diferentes métodos de remoção de mucilagem. Revista Brasileira de Sementes, v. 22, p. 288-291.
- Pereira, T. N. S.; Nicoli, R. G.; Madureira, H. C.; Junior, P. C. D.; Gaburro, N. O. P.; Coutinho, K. (2005) Caracterização morfológica e reprodutiva de espécies silvestres do gênero *Passiflora*. In: IV Reunião Técnica de Pesquisas em Maracujazeiro. Embrapa Cerrado, Brasília – DF, p. 29-34.
- Pereira, T. N. S. (2010) Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas. In: Pereira, T.N.S (eds)., Costa, F.R., Damasceno Junior, P.C. *Espécies silvestre: um germoplasma importante para as atividades do melhoramento*. 1. ed. Viçosa: Arca, p.177-204.
- Pereira, W. V. S.; Vieira, L. M.; Ribeiro, L. M.; Mercadante-Simões, M. O.; Oliveira, T. G. S. (2011) Passionfruit seeds storage. Pesquisa Agropecuária Tropical, v. 41, n. 2, p. 273-278.

- Pereira, G.S.; Nunes, E.S.; Laperuta L.D.C.; Braga, M.F.; Penha, H.A.; Diniz A.L.; Munhoz, C.F.; Gazaffi, R.; Garcia, A.A.F.; Vieira, M.L.C. (2013) Molecular polymorphism and linkage analysis in sweet passion fruit, an outcrossing species. *Ann. Appl. Biol.* 162: 347-361.
- Pereira, T. N. S.; Geronimo, I. G. D. C.; Rossi, A. A. B.; Pereira, M. G. (2017) *Passiflora cristalina* and *Passiflora miniata*: meiotic characterization of two wild species for use in breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 17, n. 3, p. 273-279.
- Praça-Fontes, M. M.; Mendonça, M. A. C.; Carvalho, C. R. (2011) Estudo dos cromossomos do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) com palicação de ferramentas citogenéticas. In: XI Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, XV INIC, VINICJr. As contribuições para a Sustentabilidade do Planeta, São José dos Campos – SP.
- Rauscher, G.; Simko, I. (2013) Development of genomic SSR markers for fingerprinting lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars and mapping genes. *BMC Plant Biol.* 13:1-11.
- Raven, P. H. (1975) The bases of Angiosperm Phylogeny: Cytology. *Annals of the Missouri Botanic Garden.* 62: 724 – 764.
- Reddy, P. M.; Sarla, N.; Andsididq, E. A. (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica.* v.128, p. 9–17.
- Rossetto, C. A. V.; Coneglian, R. C. C.; Nakagawa, J.; Shimizu, M. K.; Marin, V. A. (2000) Germinação de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand) em função de tratamento pré-germinativo. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 22, p. 247-252.
- Salisbury, F. B.; Ross, C. W. (1992) *Plant physiology.* 4^a ed. California: Wadsworth, 682p.
- Sanchez, S.V. (1980) Influência de tipos de dosagens e armazenamento sobre a germinação de sementes e estudo sobre a quebra de dormência de maracujá

- doce (*Passiflora alata* Ait). Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 21p. Monografia.
- Santos, M.C.; Sousa, G.R.L.; Silva, J.R.; Santos, V.L.M. (1999) Efeito da temperatura e do substrato na germinação de sementes de maracujá (*Passiflora edulis* Sims. var. *flavicarpa* Deg.). *Revista Brasileira de Sementes*, v.21, n.1, p.1-6.
- Santos, L. F.; Oliveira, E. J.; Silva, A. S.; Carvalho, F. M.; Costa, J. L.; Pádua, J. G. (2011) ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in *Passiflora*. *Biochemical Genetics*, v.49, p. 540–554.
- Santos, T. M.; Flores, P. S.; Oliveira, S. P.; Silva, D. F. P.; Bruckner, C. H. (2012) Tempo de armazenamento e métodos de quebra de dormência em sementes de maracujá de restinga. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 6 (1): 26-31.
- Santos, E.A.; Viana, A.P.; Freitas, J.C.O.; Souza, M.M.; Paiva, C.L.; Rodrigues, D.L.; Tavares, R.F. (2014a) Phenotyping of *Passiflora edulis*, *P. setacea*, and their hybrids by a multivariate approach. *Genet. Mol. Res.*13: 9828-9845.
- Santos, A. A.; Penha, H. A.; Bellec, A.; De Freitas Munhoz, C.; Pedrosa-Harand, A.; Bergès, H.; Vieira, M.L.C. (2014b) Begin at the beginning: A BAC-end view of the passion fruit (*Passiflora*) genome. *BMC genomics*, 15: 816-832
- Sharma, A. K; Sharma, A. (1994) *Chromosome Techniques – A Manual* Hardwood Academic Publishers. Switzerland. 368p.
- Sawadogo, M.; Ouedraogo, J. T; Balma, D.; Ouedraogo, M. et al. (2009) The use of cross-species SSR Primers to study genetic diversity of okra from Burkina Faso. *Afr J. Biotechnol*, v.11, p. 2476-2482.
- Selkoe, K.A.; Toonen, R.J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*. 9(5): 615–29.
- Silva, E.O.; Moreira Dos Santos, U.J.; Aguiar Dias, A.C.A. (2013) *Passifloraceae* in the Environmental Protection Area of Belém, Pará, Brazil. *Rodriguésia* v.64, n.4, p.829-845.

- Silva, F.H.L.; Viana, A.P.; Ferreira, R.T.; Freitas, J.C.O.; Santos J.O.; Rodrigues, D.L. (2014) Measurement of genetic diversity in progenies of sour passion fruit by Ward-MLM methodology: a strategy for heterotic group formation. *Ciênc. Agrotec.* 38:1234-1239.
- Silveira, G. F. da (2012) Sistema reprodutivo de duas espécies de *Passiflora* nativas da Amazônia Meridional. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Alta Floresta – MT, Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT, 40p.
- Singh, R. J. (2003) *Plant cytogenetics*. 2ª ed. CRC Press.
- Snow, N.; Macdougall, J. P. (1993) New Chromosomes Reports in *Passiflora* (Passifloraceae). *Syst. Bot.*, v. 18, n. 2, p. 261-273.
- Soares, J. (1999) *Biologia no Terceiro Milênio*. São Paulo: Sipione.
- Soares-Scott, M. D. (1998) Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos inter-específicos de *Passiflora*. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Soares-Scott, M. D. et al. (2005) Citogenética clássica e molecular em *Passifloras*. In: Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. In: Faleiro FG, Junqueira NTV e Braga MF (Ed.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 9, p. 213- 237.
- Sousa, A.G.R.; Souza, M.M.; Melo, C. A. F.; Sodré, G. A. (2015). ISSR markers in wild species of *Passiflora* L. (Passifloraceae) as a tool for taxon selection in ornamental breeding. *Genetics and Molecular Research* 14 (4): 18534-18545.
- Souza, M. M. et al. (2003b) Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Sacco (Passifloraceae). *Caryologia*. v. 56, p. 157-165.
- Souza, M.M.; Pereira, T.N.S.; Silva, L.C.; Reis, D.S.S.; Sudré, C.P.. (2003a) Karyotype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro. *Cytologia* 68:165-171.
- Souza, M.M.; Pereira, T.N.S.; Viana, A.P.; Pereira, M.G.; Amaral Júnior, A.T.; Madureira, H.C. (2004) Flower receptivity and fruit characteristics associated

- to time of pollination in the yellow passion fruit *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Passifloraceae). *Scientia Horticulturae*, 101(4),373–385.
- Souza, M.M.; Palomino, G.; Pereira, M.G.; Viana, A.P. (2004) Flow cytometric analysis of genome size variation in some *Passiflora* species. *Hereditas*, Landskrona, 141: 31-38.
- Souza, M. M. et al. (2007) Utilização de espécies de *passiflora* como plantas ornamentais na Bahia. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 58, Anais... São Paulo, CD Rom.
- Souza, L. S.; Junqueira, N. T. V.; Lima, C. A.; Silva, D. G. P.; Faleiro, F. G.; Neto, F. C. C.; Bernacci, L. C. (2008) Determinação da compatibilidade genética entre espécies de *Passifloras* visando à obtenção de híbridos resistentes a doenças. In: IX Simpósio Nacional Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais, Brasília – DF.
- Souza, M. M.; Pereira, T. N. S.; Vieira, M. L. C. (2008) Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 51: 247 – 258.
- Souza, A. S.; Souza, F. V. D.; Santos-Serejo, J. A.; Junghans, T. G.; Paz, O. P.; Montarroyos, A. V. V.; Santos, V. S.; Morais, L. S. (2009) Preservação de germoplasma vegetal, com ênfase na conservação in vitro de variedades de mandioca. Circular Técnica 90, Cruz das Almas – BA, Embrapa Mandioca e Fruticultura, 24p.
- Sorza, M.M.; Pereira, T.N.S.; Silva L.C.; Reis, D.S.S.; Sudre, C.P. (2003) Karyotype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro. *Cytologia*, v.68, p.165–171, DOI 10.1508/cytologia.68.165.
- Stevens, P. F. (2001) Angiosperm Phylogeny Website. Version 12. July 2012. (onwards). Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Último acesso em 26/09/2018.
- Storey, W. B. (1950) Chromosome numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. *Pacific Science*, v. 4, p. 37-42.

- Sumner, A. T. (2003) Chromosomes - organization and function. Blackwell Publishing, North Berwick, UK.
- Sybenga, J. (1992) Some sources of error in the determination of chromosome length. *Chromosoma*, 10:355-364p.
- The Plant List. The Plant List. V. 1.1, 2016. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/>. Acesso em: 20 Dez. 2018.
- Ulmer, T.; Macdougall, J. M. (2004) *Passiflora*: Passionflowers of the World. Portland-Cambridge: Timber Press. 430p.
- Vanderplank, R. J. R. (2000) Passion flowers. 3ªed. Cambridge: The MIT Press. 224p.
- Vanderplank, J.; Blanco, E.G.; Feuillet, C.; Frank, A.; King, L.; Kugler, E.; Laurens, C.; Macdougall, J. M.; Skimina, T. (2003) The International *Passiflora* Registrar 2003. *Passiflora* Society International pp 1-36
- Vanderplank, R. J. R. (2006) *PASSIFLORA miniata* Passifloraceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew,
- Vanderplank, R. J. R. (2007) There are... lies, damned lies and statistics. A statistical look at the genus *Passiflora*. *Passiflora* 17: 14 – 15.
- Vanderplank, R. J. R.; Zappi, D. (2011) *Passiflora cristalina*, a striking new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso, Brazil. *Curtis's Botanical Magazine*. 66: 149 – 153.
- Varshney, R.K.; Graner, A.; Sorrells, M.E. (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology*, v.23, n.1, p.48-55.
- Vaz Patta, M.C.; Satovic, Z.; Pego, S.; Feveirei, P. (2004). Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica*, v.137, p.63-72.
- Viana, A. P.; Pereira, T. N. S.; Pereira, M. G.; Souza, M. M.; Maldonado, J. F. M.; Amaral Jr, A. T. (2003) Genetic diversity among yellow passion fruit commercial

- genotypes and among *Passiflora* species using RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.25, n.3, p.489-493.
- Viana, A.P.; Silva, F.H.L.; Gonçalves, G.M.; Silva, M.G.M.; Ferreira, R. T.; Pereira, T.N.S.; Pereira, M.G.; Amaral Júnior, A.T.; Carvalho, G.F. (2016) UENF Rio Dourado: a new passion fruit cultivar with high yield potential. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 16: 250-253.
- Vieira, M. L. C.; Barbosa, L. V.; Mayeda, L. Y. Citogenética Dos Maracujzeiros. In: Lima, A. A.; Cunha, M. A. P. (Eds.). (2004) *Maracujá: Produção e Qualidade na Passicultura*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p. 47–65.
- Watson, L.; Dallwitz, M.J. (1992) The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. onwards Version: 19th December 2018.
- Wettstein, R. (1935) *Handbuch der systematischen Botanik*. Edn. Germ. Review article General article, Anatomy, vol. 2.
- Yotoko, K.S.C.; Dornelas, M.C.; Togni, P.D.; Fonseca, T.C.; Salzano, F.M.; Bonatto, S.L.; Freitas, L. (2011) Does variation in genome sizes reflect adaptive or neutral processes? New clues from *Passiflora*. *Plos One*, San Francisco, v. 6. <<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0018212> > Acesso em: 02 out. 2017.
- Zheng, J. S.; Sun, C. Z.; Xiao, D.; Zhang, S. N.; Bonnema, G.; Hou, X. L. (2015). Karyotype variation and conservation in morphotypes of non-heading Chinese cabbage. *Plant Systematics and Evolution*, v. 301, p. 1781-1791.
- Zietkiewicz, E.; Rafalski, A.; Labuda, D. (2014) Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. v.20, p.176- 183.
- Zucarelli, V.; Ferreira, G.; Amaro, A. C. E.; Araujo, F. P. (2009) Fotoperíodo, temperatura e reguladores vegetais na germinação de sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 31, n. 3, p. 106-114.