

GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE
FAMÍLIAS DE MARACUJAZEIRO ORIUNDAS DA SELEÇÃO
RECORRENTE PARA RESISTÊNCIA AO cowpea aphid-borne
mosaic virus

GABRIELA TAVARES PIRES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2022

GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE
FAMÍLIAS DE MARACUJAZEIRO ORIUNDAS DA SELEÇÃO
RECORRENTE PARA RESISTÊNCIA AO cowpea aphid-borne
mosaic virus

GABRIELA TAVARES PIRES

“Dissertação 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 Mestra em Genética e Melhoramento de Plantas”

Orientador: Prof^a. Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P667

Pires, Gabriela Tavares.

GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE FAMÍLIAS DE MARACUJAZEIRO ORIUNDAS DA SELEÇÃO RECORRENTE PARA RESISTÊNCIA AO cowpea aphid-borne mosaic virus / Gabriela Tavares Pires. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

76 f. : il.

Bibliografia: 50 - 62.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.
Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

1. Maracujá. 2. virose. 3. dormência. 4. *Passiflora edulis*. 5. *Passiflora setacea*. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 631.5233

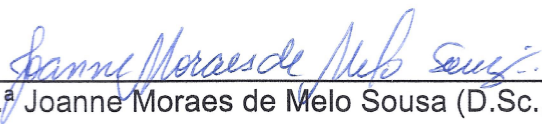
GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO
DE FAMÍLIAS DE MARACUJAZEIRO ORIUNDAS DA SELEÇÃO
RECORRENTE PARA RESISTÊNCIA AO cowpea aphid-borne
mosaic virus

GABRIELA TAVARES PIRES

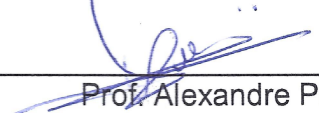
“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 24 de fevereiro de 2022.


Comissão Examinadora:




Prof.^a Joanne Moraes de Melo Sousa (D.Sc., Química) - UFRA



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



Prof.^a Claudete Santa-Catarina (D.Sc., Biotecnologia) - UENF



Prof.^a Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) - UENF
(Orientadora)

DEDICATÓRIA

À memória do meu querido avô, Jorge da Silva Pires que infelizmente, não pôde acompanhar a conclusão desta tão sonhada conquista, mas que sempre me apoiou e me incentivou com todo o amor.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente na minha vida, guiando meus caminhos e me amparando nos momentos difíceis;

A minha amada mãe, Simone, que sempre me apoiou em todas as decisões da minha vida e pela educação que pôde me conceder;

A toda minha família, meus queridos avós Maria Catarina e Jorge (*In memoriam*), meus tios Esmeraldo e Cristina, que mesmo distantes estão presentes e sempre me apoiaram. A minha querida sobrinha Ana Vitória. A minha amiga Ana Carolina pelo apoio e amizade que tem compartilhado comigo desde a graduação;

Aos meus queridos amigos, Cleidiane, Débora, Joameson e Leonardo pela amizade e pela ajuda durante a execução desse trabalho;

A minha orientadora e professora, Virginia Silva Carvalho, pelos conselhos e pela orientação na elaboração e execução do trabalho;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela estrutura e oportunidade de realizar o curso de mestrado;

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brasil – código de financiamento 001 pela concessão de bolsa de estudos e pelo financiamento da pesquisa;

Aos meus conselheiros, Alexandre Pio Viana e Telma Nair Santana Pereira, por todas as contribuições com o trabalho de mestrado;

Ao professor, Marcelo Vivas e ao colega do PPGMP Rafael Almeida, pelo auxílio nas análises com empenho e boa vontade e pelo conhecimento compartilhado;

Aos professores do PPGMP pelos ensinamentos durante esses dois anos;

Ao secretário, José Daniel, por ser sempre solícito, amigo, atencioso e incentivador;

À professora, Joanne Moraes de Melo Sousa, por aceitar o convite para participar da banca;

Aos colegas do curso de PPGMP, pelos dois anos de estudo que compartilhamos;

Aos meus queridos amigos e colegas do laboratório LFIT 112, Clarissa, Ísis, Kíssila, Otávio e Vinicius que estiveram dispostos a ajudar com a execução do trabalho;

E a todos que, de alguma forma, estiveram comigo durante esse período e que contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAGs	Bancos ativos de germoplasma
B.O.D	Câmara incubadora B.O.D.
CABMV	Cowpea aphid-borne mosaic virus
CCTA	Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias
CPA	Comprimento da parte aérea
CR	Comprimento da raiz
C.V.	Coeficiente de variação
DBC	Delineamento em Blocos ao Acaso
ENG	Embrião não germinado
FV	Fator de variação
F91	Família de irmãos completos 91 oriundos do cruzamento: <i>P. edulis</i> x <i>P. setacea</i>
F89	Família de irmãos completos 89 oriundos do cruzamento: <i>P. edulis</i> x <i>P. setacea</i>
F84	Família de irmãos completos 84 oriundos do cruzamento: <i>P. edulis</i> x <i>P. setacea</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IVG	Índice de velocidade de germinação

LFIT	Laboratório de Fitotecnia
MSPA	Massa da matéria seca da parte aérea
MSR	Massa da matéria seca da raiz
MST	Massa da matéria seca total
MS	Sais minerais de Murashige e Skoog, 1962
½ MS	Metade das concentrações dos sais minerais de Murashig & Skoog, 1962
MSM	Sais minerais de Monteiro et al., 2000
½ MSM	Metade das concentrações dos sais minerais Monteiro et al, 2000
M1	Meio de cultivo ½ MS + 20 g L ⁻¹ de sacarose
M2	Meio de cultivo ½ MS + 30 g L ⁻¹ de sacarose
M3	Meio de cultivo ½ MSM + 20 g L ⁻¹ de sacarose
M4	Meio de cultivo ½ MSM + 30 g L ⁻¹ de sacarose
NF	Número de folhas
PA	Plântulas anormais
PE	<i>Passiflora edulis</i>
PI	Índice fotossintético
PN	Plântulas normais
PS	<i>Passiflora setacea</i>
NaClO	Hipoclorito de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
RAS	Regras para Análise de Sementes
SNG	Sementes não germinadas
UENF	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
UFRA	Universidade Federal Rural da Amazônia

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Geral.....	4
2.2. Específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Origem e botânica do gênero <i>Passiflora</i> L.....	5
3.2. Importância socioeconômica do gênero <i>Passiflora</i> L.....	6
3.3. Propagação do gênero <i>Passiflora</i> L.....	8
3.3.1. Propagação sexuada.....	8
3.3.2. Propagação assexuada.....	9
3.4. Virose do endurecimento dos frutos do maracujazeiro-azedo.....	10
3.5. Melhoramento genético do maracujazeiro-azedo.....	11
3.6. Cultura de tecidos vegetais no melhoramento genético do maracujazeiro-azedo.....	13
3.6.1. Cultivo de embriões.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Germoplasma.....	16
4.2. Experimento I: Quebra de dormência.....	18
4.3. Experimento II: Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros.....	20

4.4. Experimento III: Crescimento <i>in vitro</i> e aclimatização de plantas oriundas de embriões zigóticos maduros.....	21
4.4.1. Determinação da fluorescência da clorofila <i>a</i> e índice fotossintético...	22
4.4.2. Intensidade de verde.....	22
4.5. Determinação da matéria seca.....	23
4.6. Análises estatísticas.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. Experimento I: Quebra de dormência.....	24
5.2. Experimento II: Germinação <i>in vitro</i> de embriões zigóticos maduros.....	33
5.3. Experimento III: Crescimento <i>in vitro</i> e aclimatização de plantas oriundas de embriões zigóticos maduros.....	38
6. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

RESUMO

PIRES, Gabriela Tavares; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro de 2022; GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO *IN VITRO* E ACLIMATIZAÇÃO DE FAMÍLIAS DE MARACUJAZEIRO ORIUNDAS DA SELEÇÃO RECORRENTE PARA RESISTÊNCIA AO cowpea aphid-borne mosaic virus; Orientadora: D.Sc. Virginia Silva Carvalho; Conselheiros: D.Sc. Alexandre Pio Viana e D.Sc. Telma Nair Santana Pereira.

O Brasil é o maior produtor e consumidor de maracujazeiro-azedo, porém os pomares vêm sofrendo com a virose do endurecimento dos frutos, causada pelo cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), que é a principal doença ocasionada por vírus na cultura. A obtenção de cultivares resistentes é a principal medida de controle, visando transferir a resistência de espécies silvestres para *P. edulis*, por meio de cruzamentos interespecíficos. Porém, a germinação de sementes obtidas desses cruzamentos geralmente é baixa e desuniforme. Portanto, esse trabalho buscou estudar a germinação *in vitro* de sementes de progênies de irmãos completos obtidos via seleção recorrente para resistência à virose do Programa de Melhoramento Genético de maracujazeiro-azedo da UENF. Foram três experimentos: 1) Quebra de dormência *in vitro*: foi realizado em DBC, 5x3, 5 genótipos (*P. edulis*, *P. setacea* e 3 famílias de irmãos completos F91, F89 e F84) x (sementes intactas, sementes sem tegumento e embrião zigótico), colocados para germinar em meio ½MS e feitas análises de vigor: Índice de velocidade de germinação (IVG), germinação acumulada, matéria seca da parte aérea (MSPA),

raiz (MSR) e total (MST), comprimento da parte aérea (CPA) e das raízes (CR) e número de folhas (NF), plântulas normais (PN) e anormais (PA) e sementes não germinadas (SNG). 2) Germinação *in vitro*: foi realizado em DBC, utilizando embriões isolados, 5x4, 05 genótipos, e quatro meios de cultura ($\frac{1}{2}$ MS+20 g L⁻¹ de sacarose - M1, $\frac{1}{2}$ MS+30 g L⁻¹ de sacarose - M2; $\frac{1}{2}$ MSM+20 g L⁻¹ de sacarose - M3; $\frac{1}{2}$ MSM+30 g L⁻¹ de sacarose - M4) com 08 repetições. Foram avaliados: IVG, porcentagem de germinação e germinação acumulada. 3) crescimento *in vitro* e aclimatização. As plantas do experimento 2, permaneceram *in vitro* até 45 dias e foi avaliado o vigor em quatro repetições, metade das repetições não avaliadas foram transferidas para casa de vegetação, seguindo o fatorial 5x4. Após 35 dias, foi avaliado a porcentagem de sobrevivência, análises de vigor, índice de verde (SPAD), índice fotossintético (PI) e fluorescência da clorofila *a* (Fv/Fm). O uso de embriões isolados foi eficiente para a quebra de dormência em sementes de todos os genótipos avaliados de *Passiflora* germinadas *in vitro* e favoreceu a formação de PN. No experimento 2 de germinação *in vitro*, os meios de cultura M2 ($\frac{1}{2}$ MS + sacarose 30 g L⁻¹) e M4 ($\frac{1}{2}$ MSM + sacarose 30 g L⁻¹) alcançaram maiores médias para obtenção de PN. A concentração de 30 g L⁻¹ de sacarose foi eficaz para formação de PN. Para o crescimento *in vitro*, para F84 o M2 favoreceu maiores médias de CPA (90 mm) e CR (143,19 mm). Na aclimatização, para F89 o meio M2 proporcionou menor MSPA (0,20 g) e MST (0,21 g), para F84 o meio M2 teve média superior para MST (0,40 g). As mudas obtidas ao final da aclimatização estavam vigorosas. O cultivo *in vitro* de diferentes famílias de maracujazeiro-azedo é recomendado usando embriões zigóticos maduros isolados, podendo utilizar os meios de cultura $\frac{1}{2}$ MS ou $\frac{1}{2}$ MSM + sacarose 30 g L⁻¹.

Palavras-chave: Maracujá; virose; dormência; *Passiflora edulis*, *Passiflora setacea*.

ABSTRACT

PIRES, Gabriela Tavares; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; February 2022; *In vitro* GERMINATION AND GROWTH AND ACLIMAZATION OF PASSION FRUIT FAMILIES FROM RECURRENT SELECTION FOR RESISTANCE TO THE cowpea aphid-borne mosaic virus; Advisor: D.Sc. Virginia Silva Carvalho; Counselors: D.Sc. Alexandre Pio Viana and D.Sc. Telma Nair Santana Pereira.

Brazil is the largest producer and consumer of sour passion fruit, but the orchards have been suffering from the fruit hardening virus, caused by the cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), which is the main disease caused by viruses in the crop. Obtaining resistant cultivars is the main control measure, aiming to transfer the resistance of wild species to *P. edulis*, through interspecific crosses. However, the germination of seeds obtained from these crosses is generally low and uneven. Therefore, this work aimed to study the *in vitro* germination of seeds of full-sib progenies obtained via recurrent selection for virus resistance in the sour passion fruit genetic improvement program of UENF. There were three experiments: 1) *In vitro* dormancy breaking: it was carried out in DBC, 5x3, 5 genotypes (*P. edulis*, *P. setacea* and 3 full-sib families F91, F89 and F84) x (intact seeds, seeds without tegument and zygotic embryo), placed to germinate in ½MS medium and vigor analyzes were performed: germination speed index (IVG), accumulated germination, shoot dry matter (MSPA), root (MSR) and total (MST), shoot length aerial (CPA) and roots (CR) and number of leaves (NF), normal (PN) and abnormal

(PA) seedlings and non-germinated seeds (SNG). 2) *In vitro* germination: it was carried out in DBC, using isolated embryos, 5x4, 05 genotypes, and four culture media ($\frac{1}{2}$ MS+20 g L⁻¹ sucrose - M1, $\frac{1}{2}$ MS+30 g L⁻¹ sucrose - M2; $\frac{1}{2}$ MSM+20 g L⁻¹ sucrose - M3; $\frac{1}{2}$ MSM+30 g L⁻¹ sucrose - M4) with 08 repetitions. The following were evaluated: IVG, percentage of germination and accumulated germination. 3) *in vitro* growth and acclimatization. The plants of experiment 2 remained *in vitro* for up to 45 days and vigor was evaluated in four replications, half of the non-evaluated repetitions were transferred to the greenhouse, following the 5x4 factorial. After 35 days, the percentage of survival, vigor analysis, green index (SPAD), photosynthetic index (PI) and chlorophyll a fluorescence (Fv/Fm) were evaluated. The use of isolated embryos was efficient to break dormancy in seeds of all evaluated *Passiflora* genotypes germinated *in vitro* and favored the formation of NP. In experiment 2 of *in vitro* germination, the culture media M2 ($\frac{1}{2}$ MS + sucrose 30 g L⁻¹) and M4 ($\frac{1}{2}$ MSM + sucrose 30 g L⁻¹) reached the highest means for obtaining PN. The concentration of 30 g L⁻¹ of sucrose was effective for PN formation. For *in vitro* growth, for F84, M2 favored higher means of CPA (90 mm) and CR (143.19 mm). In acclimatization, for F89 the M2 medium provided lower MSPA (0.20 g) and MST (0.21 g), for F84 the M2 medium had a higher average for MST (0.40 g). The seedlings obtained at the end of acclimatization were vigorous. The *in vitro* cultivation of different families of sour passion fruit is recommended using isolated mature zygotic embryos, using $\frac{1}{2}$ MS or $\frac{1}{2}$ MSM + sucrose 30 g L⁻¹.

Keywords: Passion fruit; virus; dormancy; *Passiflora edulis*, *Passiflora setacea*

1. INTRODUÇÃO

Maracujá é o nome geral dado a várias espécies do gênero *Passiflora* L., com a maioria delas podendo produzir frutos para o consumo *in natura* e beneficiamento industrial, flores com potencial ornamental e diferentes partes das plantas para uso medicinal. O gênero *Passiflora* L. é de ocorrência nativa das regiões tropicais, e pode ser encontrado em diversos países da América tropical, Estados Unidos, Ásia e Austrália (Bernacci et al., 2015; Faleiro e Junqueira, 2016). Brasil e Colômbia são os mais tradicionais produtores da cultura (Bernacci et al., 2005), e apresenta alta relevância social, principalmente por poder ser cultura principal para a agricultura familiar (Faleiro et al., 2019).

No Brasil as espécies *Passiflora edulis* Sims (maracujá-azedo) e *Passiflora alata* Curtis (maracujá-doce) (Bernacci et al., 2008; Ataíde et al., 2012) são as mais produzidas. O maracujazeiro-azedo é uma importante cultura agrícola, o país é o maior produtor e consumidor da fruta, com área de 46.530 hectares destinada à cultura em 2020 (IBGE, 2021). Contudo, apesar dos bons preços obtidos pelos frutos, os rendimentos não têm sido lucrativos, pois os cultivos sofrem com os problemas fitossanitários, como pragas e doenças (Pinto et al., 2008).

A virose do endurecimento dos frutos, que no Brasil é causada pelo vírus cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) é uma das principais doenças da cultura, em termos de virose é a principal, pois reduz o período produtivo da safra e o valor comercial dos frutos (Cerqueira-Silva et al., 2015).

Alguns dos objetivos do melhoramento genético do maracujazeiro são: desenvolver cultivares mais adaptadas as diversas condições de cultivo e

resistentes as principais pragas e doenças da cultura; facilitar o processo de polinização natural, pois um dos principais custos do cultivo está ligado a polinização mecânica; também melhorar a produtividade e qualidade dos frutos (Faleiro et al., 2008). Nesse sentido, o uso de espécies nativas nos programas de melhoramento genético vindo sendo estudada e utilizada como fonte de diversidade (Meletti et al., 1997).

Nesse contexto, a espécie nativa *Passiflora setacea* DC. vem sendo utilizada como fonte de resistência a doenças dos maracujazeiros azedo e doce (Sacoman et al., 2017; Santos et al., 2019a e b; Preisigke et al., 2020a e b; Vidal et al., 2021), também como possíveis usos como porta-enxerto em micro enxertia (Vieira, et al., 2011). Contudo, estudos relatam que essa espécie tem problemas para germinação (Santos et al., 2010) e para enraizamento de estacas (Pádua, et al., 2011), isso possivelmente é devido ao estado silvestre da espécie *P. setacea* que ainda não passou por processo de seleção e melhoramento genético.

Técnicas biotecnológicas têm contribuído para o desenvolvimento da agricultura nas últimas décadas, e a cultura de tecidos vegetais tem sido fundamental em programas de melhoramento de culturas agrícolas, como o maracujazeiro-azedo. Dentre as técnicas temos a germinação *in vitro*, de criopreservação, crescimento *in vitro* de embriões isolados, cultura de endosperma, transformação genética e suas mais diferentes técnicas, dentre outras (Pacheco et al., 2016; Silva et al., 2020). No entanto, a maioria das técnicas de cultivo *in vitro* são desenvolvidas para cultivares comerciais, necessitando serem ajustadas para outras espécies, visto a grande diversidade de espécies que o gênero *Passiflora* comporta.

Um dos grandes desafios atuais das pesquisas de melhoramento genético de maracujazeiro-azedo é a obtenção de cultivares resistentes à virose causada pelo CABMV, pois mesmo com a grande diversidade genética existente do gênero *Passiflora*, não há registros de cultivares resistentes. Nesse contexto, o grupo de pesquisa do Programa de Melhoramento Genético de maracujazeiro-azedo para resistência ao CABMV da UENF obteve híbridos entre *P. edulis* e *P. setacea*, e a partir disso empregou-se o método do retrocruzamento visando transferir genes de resistência à doença na nova cultivar (Freitas et al., 2015; Preisigke et al., 2020a e b; Vidal et al., 2021).

Atualmente, foi implementada a seleção recorrente no programa de melhoramento para resistência à doença, e a população da primeira geração de

seleção recorrente é objeto de estudo do presente trabalho. Pois, sabe-se que problemas de germinação de sementes são muito comuns no gênero *Passiflora*, até mesmo no maracujá-azedo, e têm se mostrado um fator limitante para os programas de melhoramento genético da cultura (Meletti et al., 2005; Santos et al., 2016). Além disso, sementes de híbridos resultantes do cruzamento de *P. edulis* x *P. setacea* apresentam dificuldades para germinar (Freitas et al., 2015).

Portanto, o desenvolvimento de um protocolo de germinação *in vitro* eficiente, é uma alternativa que viabiliza a germinação de sementes oriundas dos diferentes cruzamentos obtidas via seleção recorrente para resistência ao CABMV e, contribui com o avanço de etapas do Programa de Melhoramento Genético de maracujazeiro-azedo da UENF para a obtenção de novas cultivares.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estabelecer condições adequadas para a germinação *in vitro* de sementes, crescimento *in vitro* e aclimatização das plântulas de diferentes famílias de irmãos completos do primeiro ciclo de seleção recorrente para resistência ao CABMV do Programa de Melhoramento Genético de Maracujazeiro da UENF.

2.2. Específicos

- i. Determinar um protocolo eficiente para a quebra de dormência física e fisiológica em sementes de maracujazeiro-azedo oriundas de diferentes famílias de irmãos completos sob seleção recorrente intrapopulacional, obtidos a partir de cruzamentos interespecíficos de *P. edulis* x *P. setacea* do Programa de Melhoramento Genético de maracujazeiro da UENF;
- ii. Verificar o efeito do meio de cultura e outros componentes no crescimento *in vitro* das plântulas com o objetivo de aumentar a qualidade e o vigor das mudas obtidas de diferentes famílias de irmãos completos selecionados do programa de seleção recorrente intrapopulacional de maracujazeiro da UENF;
- iii. Verificar o efeito do meio de cultura e outros componentes que afetam a aclimatização das plantas obtidas na etapa de crescimento *in vitro* para as diferentes famílias de irmãos completos selecionados do programa seleção recorrente intrapopulacional de maracujazeiro da UENF.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Origem e botânica do gênero *Passiflora* L.

A família Passifloraceae pertence à ordem Malpighiales, que compreende mais de 16000 espécies, uma ordem com alta diversidade morfológica e ecológica (Wurdach e Davis, 2009). A família Passifloraceae teve origem na África, depois foi dispersada pela Europa, Ásia e chegou ao Novo Mundo onde se tornou mais diversificada (Antonelli et al., 2009; Antonelli e Sanmartín, 2011). As plantas da família ocorrem nas regiões tropicais e subtropicais, são constituídas por cerca de 650 espécies e 20 gêneros (Killip, 1938; Cervi, 1997; Ulmer e Macdougall, 2004).

O gênero *Passiflora* L., o maior e mais importante representante da família, compreende mais de 500 espécies que estão distribuídas principalmente na região que vai do México ao extremo sul da América do Sul (Ulmer e Macdougall 2004). Estão incluídas no gênero as principais espécies de importância comercial (Borges et al., 2020). Brasil e Colômbia são os países que concentram o maior número de espécies (Cervi, 1997).

No Brasil ocorrem quatro gêneros: *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L., com 154 espécies, das quais 87 endêmicas, sendo o país um dos principais centros de diversidade genética (Cervi e Rodrigues, 2010). O gênero *Passiflora* L. é o mais expressivo devido ao número de espécies e importância econômica (Jesus e Faleiro, 2016), com cerca de 520 espécies (Borges e Milward-de-Azevedo, 2017). As principais espécies do gênero são diploides ($2n=2x=18$ cromossomos), alógamas e autoincompatíveis (Martin e Nakasone, 1970).

O gênero *Passiflora* L. é constituído por espécies de trepadeiras lenhosas ou herbáceas, podendo atingir de cinco a dez metros de comprimento (Jesus; Faleiro, 2016) e formam gavinhas (Costa et al., 2015). As raízes são do tipo axial, podendo ser adventícias, se forem propagadas por estacas. Os caules necessitam de outras plantas como suporte, são eretos, cilíndricos, com ou sem pilosidade, angulados, angular-estriados, angular-alados, podem ser achatados e alguns retratados como subangular e estriados. As espécies em geral possuem estípulas do tipo setáceas, lineares, foliáceas e decíduas (Cunha et al., 2002; Ulmer e Macdougall, 2004).

As folhas são simples e alternas, elípticas ou orbiculares, inteiras ou lobadas, pecíolos com ou sem glândulas, as gavinhas, normalmente solitárias, encontram-se nas axilas foliares, em espécies de trepadeiras lenhosas são ausentes (Cunha et al., 2002; Ulmer e Macdougall, 2004).

As flores são hermafroditas, grandes, vistosas e protegidas na base por brácteas foliares. A corona é formada por vários filamentos ou fimbrias, é a marca característica do gênero *Passiflora* L. A floração e a formação de frutos estão diretamente ligadas ao período do dia e varia de acordo com a espécie (Jesus e Faleiro, 2016). O maracujazeiro é uma planta de dias longos, e para emitir botões florais necessita, de no mínimo, 11 horas e 20 minutos de luz (Watson e Bowers, 1965; Meletti, 1996). Entretanto, algumas espécies como *Passiflora setacea* e *Passiflora coccinea* se comportam como plantas de dias curtos, em condições da região central do Brasil, florescem e frutificam nos dias mais curtos do ano, e a colheita ocorre de agosto a outubro, período de entressafra do maracujazeiro comercial (Faleiro et al., 2012).

Os frutos são do tipo baga, indeiscentes ou cápsulas deiscentes, globosos ou ovoides, com coloração variando entre amarelo, verde, amarelo-esverdeado, vermelha, rosada, laranja, roxa e laranja-avermelhada (Ulmer e Macdougall, 2004; Nunes e Queiroz, 2006; Costa et al., 2015). As sementes podem ser longas, reticuladas, pontuadas ou foveoladas e envolvidas por arilo mucilaginoso (Nunes e Queiroz, 2006; Costa et al., 2015).

3.2. Importância socioeconômica do gênero *Passiflora* L.

Algumas espécies de *Passiflora* L. são cultivadas comercialmente gerando empregos e renda para as cidades e para o campo, possuem alta relevância social,

servindo como cultura alternativa para a agricultura familiar (Bernacci et al., 2005; Faleiro et al., 2019). O cultivo de maracujazeiro é uma importante opção de renda para os produtores, pois os frutos têm alto valor de comercialização, oferece rápido retorno econômico e receita distribuída na maior parte do ano, quando comparado a maioria das outras frutíferas (Meletti, 2011; Santos et al., 2017),

A espécie *P. edulis* Sims (maracujá-azedo) é a mais produzida comercialmente no Brasil, podendo ser encontrada em mais de 90% dos pomares do país. Outras espécies são cultivadas em menor escala, como *P. alata* Curtis (maracujá-doce), *P. setacea* DC. (maracujá-do-sono, maracujá-pérola) *P. nítida* Kunth (maracujá-suspiro), *P. quadrangulares* L. (maracujá-gigante) (Faleiro et al., 2015). Além do mercado de frutas, existem outros segmentos que utilizam esta cultura, como plantas ornamentais, medicinais e indústrias cosméticas (Cerqueira-Silva et al., 2014; Pacheco et al., 2016).

O Brasil é o maior produtor e consumidor do fruto com uma produção de 690.364 toneladas em uma área de 46.530 ha, um leve crescimento que está relacionado ao aumento da área plantada em comparação ao ano de 2019 (41.830 ha), e rendimento médio em cerca de 14,87t/ha, no ano de 2020. As regiões brasileiras com as maiores produções são Nordeste, responsável por cerca de 71,17% da produção brasileira, destaque para os estados da Bahia e Ceará que juntos somam 57,55% da produção total do país, e a região Sudeste com 12,21%. Quanto ao rendimento médio, as regiões Sul (18,83 t/ha/ano) e Centro-oeste (17,56 t/ha/ano) obtiveram maiores resultados, sendo que o Distrito Federal alcançou a maior média (27,675 t/ha/ano) (IBGE, 2021).

Apesar de ser o maior produtor da cultura do maracujazeiro-azedo, as exportações ainda são limitadas e ocorrem principalmente na forma de frutas frescas e suco concentrado. Cerca de 1,5% da produção é exportada, devido ao alto consumo interno que consegue absorver quase a totalidade da produção (Meletti, 2011). A cultura do maracujazeiro-azedo tem grande potencial mercadológico, visto que a procura pelos frutos e subprodutos é crescente, mas a produção não consegue acompanhar a demanda (Faleiro et al., 2017). Dessa forma, é importante que estratégias que visem a melhoria dos cultivos e consequentemente o aumento da produtividade sejam aprimorados.

3.3. Propagação do gênero *Passiflora* L.

A maioria das espécies comerciais de maracujazeiro são autoincompatíveis, do tipo homomórfica esporofítica de herança monofatorial (Bruckner et al., 1995; Madureira et al., 2014), porém, há indícios de um gene de efeito gametofítico associado ao sistema esporofítico (Suassuna et al., 2003), sendo necessário manter diferentes genótipos nos pomares para que ocorra a produção de frutos (Faleiro et al., 2019). O método de propagação por sementes é o mais empregado, embora também seja possível via assexuada ou vegetativa, como clones por meio de estacas, enxertia ou cultura de tecidos vegetais (Alexandre et al., 2004).

3.3.1. Propagação sexuada

As vantagens no uso do método sexual incluem: processo simples para produção e formação das mudas, menor demanda em mão de obra e infraestrutura, facilidade de transporte e comercialização de sementes, possibilidade de obter plantas livres de patógenos não transmitidos por sementes, e produção de plantas geneticamente distintas, um fator importante para minimizar os efeitos da autoincompatibilidade das plantas de maracujazeiro (Faleiro et al., 2019).

Em espécies silvestres de maracujazeiro, a propagação por sementes é dificultada pela presença de dormência, como em *P. setacea*, um problema para formação de mudas (Pádua et al., 2011). A dormência é um mecanismo em que sementes viáveis não germinam, mesmo em condições ideais de temperatura e umidade. É mais comum em espécies não domesticadas de maracujazeiro (Faleiro et al., 2019).

Castillo et al. (2020), ao trabalharem com a germinação e viabilidade de sementes de maracujá-roxo, observaram que as maiores porcentagens de germinação e viabilidade ocorreram na seguinte ordem: cultivares comerciais, variedades tradicionais e acessos de bancos de germoplasma. Essa diferença foi relacionada ao processo de domesticação que seleciona para melhorar o processo germinativo e para melhor resistência ao armazenamento.

Segundo Silva et al. (2019), os fatores que afetam a germinação são: a origem genética (variação entre espécies e cultivares), o manejo (injúrias mecânicas durante a colheita, problemas fitossanitários, variações climáticas, secagem,

armazenamento), morfológicos e fisiológicos (dormência, maturidade do embrião, vigor), dentre outros.

Há ainda fatores relacionados à dificuldade de germinação que pode ocorrer ao se trabalhar com cruzamentos interespecíficos. No trabalho realizado por Freitas et al. (2015) foi testada a resistência ao CABMV de híbridos interespecíficos de *P. edulis* x *P. setacea* retrocruzados com o genitor recorrente *P. edulis*, e na etapa de obtenção da população segregante observaram que a taxa de pegamento da polinização foi maior quando o doador de pólen foi o *P. edulis* e a menor ocorreu quando o genótipo comercial foi o receptor, portanto, a mãe.

3.3.2. Propagação assexuada

A propagação assexual tem como principal vantagem a possibilidade de clonar plantas com características agrônomicas desejáveis, por exemplo, plantas com maior produtividade, resistência a doenças, frutos maiores, além disso, os pomares seriam mais uniformes (Junqueira et al.,2006). Os métodos de propagação assexuada disponíveis são: por estaca, enxertia e cultura de tecidos vegetais. Contudo, ainda são pouco empregados por serem de alto custo e complexidade, por exigir mais mão de obra, mão de obra qualificada, infraestrutura necessária e pela dificuldade em produzir mudas livres de doenças, principalmente virais (Alexandre et al.,2009; Faleiro et al.,2019).

A propagação vegetativa via estaquia tem sido utilizada com frequência em espécies de maracujazeiro ornamental, pois busca-se garantir identidade visual e beleza de suas flores. O sucesso desta técnica varia entre e dentro das espécies, devido a variações genéticas, condições fitossanitárias e nutricionais da matriz, época de colheita, substrato e as condições ambientais (Faleiro et al.,2019). Viana et al. (2019) verificaram o potencial de enraizamento de diferentes acessos de espécies silvestres e ornamentais de *Passiflora* e foi possível obter mudas viáveis em mais de 90% dos genótipos testados. O que evidencia o potencial dessa técnica para a propagação de diversas espécies do gênero.

A propagação por enxertia tem sido estudada para aumentar a resistência a patógenos que vivem no solo e melhorar as características agrônomicas dos pomares (Faleiro et al., 2019). Ao testar a combinação de diferentes espécies silvestres de maracujazeiro como porta enxerto e o enxerto *P. edulis*, Morgado et

al. (2015) verificaram que as mudas enxertadas mais vigorosas foram as do tratamento controle *P. edulis/P. edulis*, porém houve pegamento em todas as combinações, com exceção das mudas enxertadas em *Passiflora morifolia*, em que todas as mudas morreram. A compatibilidade genética é fundamental para que ocorra o pegamento.

Segundo Santos et al. (2014b), na enxertia ocorre muita variação no pegamento dos enxertos, que está ligado a diferença do diâmetro dos caules, ocasionando a incompatibilidade entre enxertos e porta-enxertos, estudos mais detalhados de compatibilidade entre as espécies são necessários.

Os métodos de propagação vegetativa são importantes para caracterização e conservação em programas de melhoramento e uso de recursos genéticos, pois ainda não há informações necessárias sobre a melhor forma de conservação de sementes que atenda a ampla diversidade de espécies de *Passiflora* (Faleiro et al., 2019).

3.4. Virose do endurecimento dos frutos do maracujazeiro-azedo

A virose do endurecimento dos frutos do maracujazeiro é a doença causada por vírus mais importante para a cultura e, é encontrada na maioria das regiões produtoras do país (Nascimento et al., 2006). Diversas formas de controle já foram adotadas, porém sem sucesso (Costa et al., 2018). No Brasil, é causada pelo cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV), espécie do gênero *Potyvirus* e família Potyviridae (Adams et al., 2012).

A disseminação da virose ocorre principalmente por afídeos (Aphididae) de diversas espécies, tornando inviável o controle químico destes insetos (Rezende, 2006). A transmissão também pode ocorrer durante os tratamentos culturais, por exemplo, a poda, ao utilizar ferramentas contaminadas em plantas saudáveis (Fonseca et al., 2009). Para doenças causadas por vírus, a melhor medida de controle é a obtenção de cultivares melhoradas, que possuam genes de resistência (Van Der Plank, 1963). Por não existir medidas curativas, a medida de exclusão é a principal recomendação técnica para evitar a disseminação do vírus. Áreas bastante afetadas são condenadas mesmo contendo plantas que ainda não iniciaram a primeira safra (Meletti et al., 2005).

A presença de mosaico e algumas vezes acompanhado de enrugamento, bolhas e distorção foliar, são os principais sintomas resultantes da infecção por CABMV (Rezende, 2006). Além disso, os frutos ficam menores, endurecidos e podem ficar deformados, o endocarpo se expande e reduz a quantidade de polpa, ou seja, há perda de qualidade e produção (Silva et al., 2016).

3.5. Melhoramento genético do maracujazeiro-azedo

O processo de valorização da cultura do maracujá impulsiona a busca por tecnologias que melhorem o cultivo e aumentem a produtividade para atender a demanda dos diferentes mercados. Para Cerqueira-Silva et al. (2018) a produção de frutas frescas (*in natura*) para atender o mercado ou indústria, é um dos principais desafios dos programas de melhoramento. Com o intuito de corrigir os fatores limitantes do cultivo, o melhoramento genético busca desenvolver cultivares mais produtivas e adaptadas às diversas regiões produtoras, resistentes às diversas pragas e doenças (Junqueira et al., 2005; Meletti, 2011).

O melhoramento em maracujazeiro é favorecido pela grande diversidade de espécies endêmicas existentes, que podem ser doadoras de genes de interesse para serem incorporadas nas cultivares comerciais (Junqueira et al., 2005). Vários são os métodos de melhoramento que podem ser aplicados a cultura como, por exemplo, a seleção recorrente e o método massal (Silva et al., 2009). No geral, todos os métodos de melhoramento de alógamas podem ser utilizados para o maracujazeiro, o interessante é escolher métodos que proporcionem aumento de alelos favoráveis na população, por exemplo, a resistência a doenças.

Diversos estudos buscam plantas de maracujá resistente ao CABMV, pois ainda não existe uma cultivar registrada de maracujazeiro resistente à virose (Cerqueira-Silva et al., 2015; Santos et al., 2015a e b). Sacoman et al. (2017) buscaram identificar genótipos de *P. setacea* resistentes ao CABMV, para uso em programa de melhoramento genético de maracujazeiro. Foram inoculados 30 genótipos com isolados de CABMV, ao final 29 genótipos foram identificados como resistentes. A identificação de fontes de resistência é um passo fundamental nos programas de melhoramento que visem a introgressão de genes de resistência a novas cultivares.

O Programa de Melhoramento do maracujazeiro da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) utiliza fontes de resistência ao CABMV via incorporação de genes de resistência ao CABMV. Esse processo foi realizado via cruzamento interespecífico entre *P. setacea* (resistente ao CABMV) e *P. edulis* (espécie de interesse comercial e suscetível), em seguida, os híbridos foram selecionados quanto a resistência ao CABMV e as características agrônômicas de interesse (Santos et al., 2014a; 2015b; Freitas et al., 2016). A partir deste cruzamento foram selecionados os melhores híbridos, e, desde então, vêm sendo conduzido retrocruzamentos, seleções e recombinações (Santos et al., 2015a; Santos et al., 2019; Preisigke et al., 2020a e b; Vidal et al., 2021).

Atualmente, o Programa de Melhoramento Genético de maracujazeiro da UENF iniciou estudos com a seleção recorrente visando a resistência ao CABMV.

A população inicial (C0), denominada população-base, é oriunda do cruzamento de diferentes genótipos, a saber: indivíduos selecionados da população de RC1 do cruzamento da cultivar UENF Rio Dourado (*P. edulis*) x *P. setacea* (Gonçalves et al., 2021); indivíduos selecionados da população RC2 (retrocruzamento entre o genitor recorrente UENF “Rio Dourado” x genótipos selecionados da população RC1) (Vidal et al., 2021); híbridos interespecíficos (*P. edulis* x *P. setacea*). Os genótipos superiores foram aqueles que apresentaram resistência ao CABMV e que apresentaram bom desempenho agrônômico. Após a avaliação e o ranqueamento desses genótipos, foram selecionados os 38 melhores, que foram inter cruzados em pares, originando as 90 famílias de irmãos completos que estão sendo conduzidas e avaliadas no primeiro ciclo de seleção recorrente visando desenvolver cultivares resistentes e com bom desempenho agrônômico e que são materiais de estudo do presente trabalho (Figura 1).

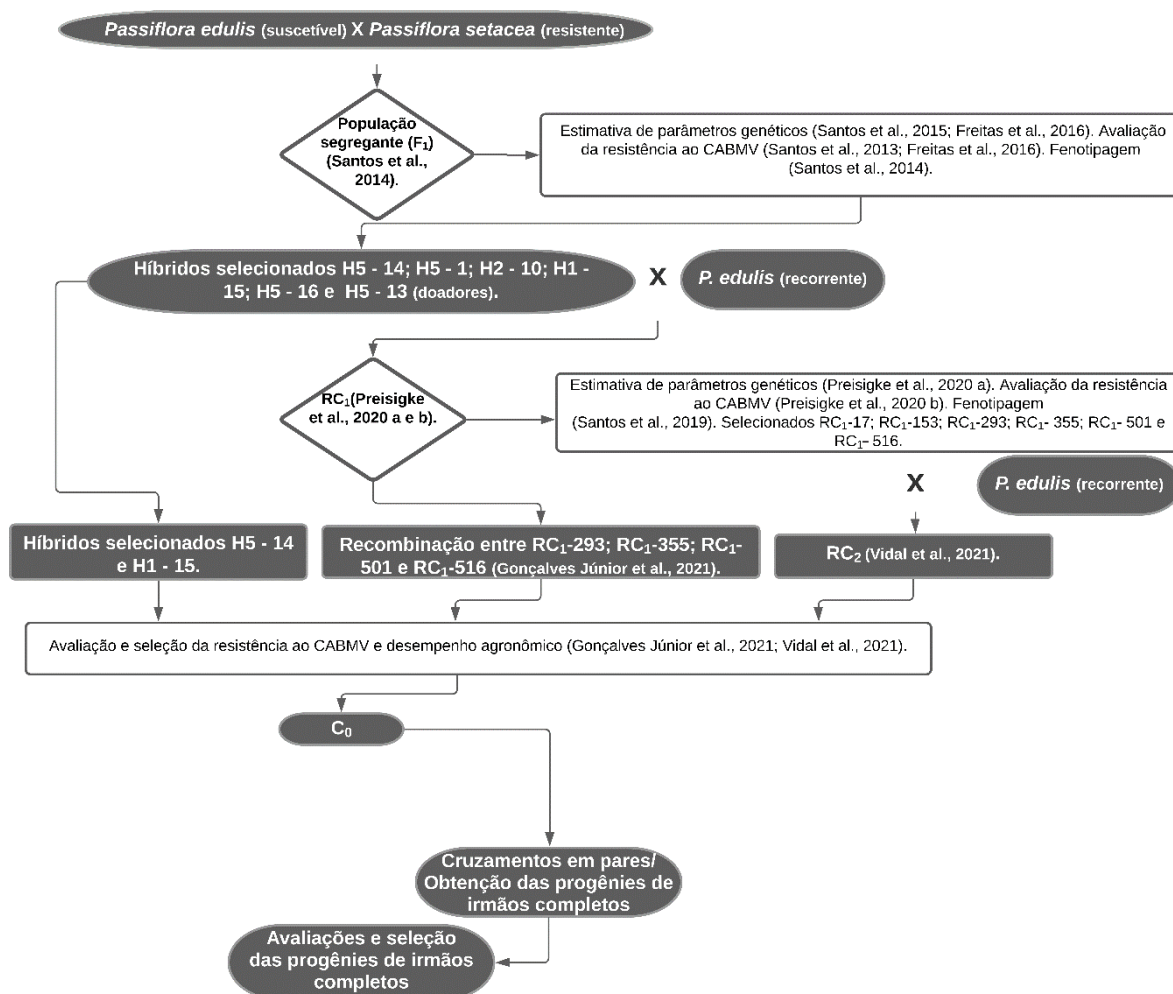


Figura 1 – Fluxograma das etapas do Programa de Melhoramento de maracujazeiro para resistência à CABMV da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

3.6. Cultura de tecidos vegetais no melhoramento genético do maracujazeiro-azedo

A difusão de práticas biotecnológicas tem contribuído para avanços significativos na agricultura moderna, auxiliando na obtenção de características agrônômicas desejáveis no cultivo de plantas (Carrer et al., 2010). Dentre as aplicações biotecnológicas destaca-se a cultura de tecidos vegetais, com diferentes formas de uso para a melhoria da agricultura.

A cultura de tecidos ou cultivo *in vitro* de plantas consiste no cultivo em meio nutritivo, dentro de tubos de ensaio ou similares, em ambiente asséptico e condições de temperatura, trocas gasosas e umidade controladas. Pode ser usada para multiplicar plantas livres de vírus, propagação em larga escala de genótipos

superiores, na conservação de germoplasma e melhoramento genético (Carvalho et al., 2011). É importante para o melhoramento genético, podendo ser usada na transformação genética de plantas, na polinização *in vitro*, na produção de haploides, no cultivo de embriões, dentre outros (Silva-Neto e Andrade, 2011).

3.6.1. Cultivo de embriões

A cultura de embriões é uma técnica da cultura de tecidos vegetais baseada no processo de isolamento, crescimento e desenvolvimento de um embrião zigótico *in vitro*, com o objetivo de dar origem a uma planta completa (Rappapot, 1954). Outrossim, a cultura de embriões é usada para reproduzir aspectos fisiológicos e nutricionais relacionados ao desenvolvimento do embrião, encurtar o ciclo de reprodução, resgatar híbridos provenientes de cruzamentos incompatíveis, também utilizados para superação de dormência das sementes ou esterilidade (Carvalho et al., 2011). Embriões zigóticos são excelentes explantes para propagação clonal *in vitro* uma vez que sua natureza juvenil tem alto potencial regenerativo (Ferreira e Hu, 1998).

Especificamente em cruzamentos interespecíficos podem ocorrer problemas que ocasionam a dificuldade de germinação dos embriões, levando a formação de sementes com embriões abortivos ou dificuldades de germinação (Carvalho et al., 2011). Nesse caso, a aplicação da técnica se torna essencial, já que permite o resgate e a conservação do genótipo que, posteriormente, poderá ser utilizado nos programas de melhoramento genético. Essa técnica permite que os híbridos resgatados possam ser usados como fonte de variabilidade genética (Walter et al., 2019). O sucesso da técnica está ligado a diversos fatores como a maturidade fisiológica da semente, as condições ambientais de cultivo, a desinfestação da semente, a excisão do embrião, o meio de cultivo adequado (Carvalho e Araújo, 2007).

O trabalho realizado por Bernal-Moreno et al. (2018) teve por objetivo avaliar a capacidade embriogênica de embriões zigóticos maduros de *Passiflora maliformis* para regenerar novas plantas, testando concentrações de fitorreguladores, e verificaram que as maiores porcentagens para o potencial embriogênico e formação de plântulas ocorreu quando o meio de cultivo foi suplementado com 1 mg L⁻¹ de BA e depois transferidos para meio de expressão sem fitorregulador, quando suplementado com 1 mgL⁻¹ de BA + 3 mgL⁻¹ de 2,4-D e

depois transferidos para meio com CA (carvão ativado). Um trabalho promissor e que pode ser ajustado para outras espécies.

Generoso et al. (2019), trabalhando com germinação de embriões zigóticos maduros de *P. edulis* criopreservados, concluíram que estes são os explantes mais indicados para a germinação e formação de plantas normais. Entretanto, faltam estudos em outras espécies e híbridos de *Passiflora*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Setor de Horticultura do Laboratório de Fitotecnia (LFIT) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em Campos dos Goytacazes, RJ. O município se situa na latitude 21° 45' S e na longitude 41° 20' W e possui altitude média de 11 metros.

4.1. Germoplasma

Foram utilizadas sementes provenientes do Programa de Melhoramento Genético de maracujazeiro visando à resistência ao CABMV da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF. As sementes foram obtidas de frutos de polinização aberta do cultivo experimental de famílias de progênies de irmãos completos de *P. edulis* x *P. setacea* submetidas à seleção recorrente, conduzido na área experimental da Escola Agrícola Antônio Sarlo, no Município de Campos dos Goytacazes, região norte do estado do Rio de Janeiro, descrito no item 3.7.

A seleção foi feita com base no fenótipo da planta mãe e no nível de resistência à virose. Para os experimentos foram usados os indivíduos mais parecidos com o parental *P. setacea* e que em observações preliminares apontaram para resistência alta e moderada à virose, onde provavelmente poder-se-ia ter problemas com a germinação de sementes. Dessa forma, foi possível selecionar sementes de três famílias de irmãos completos (Família 91, Família 89 e Família 84). As sementes da cultivar UENF Rio Dourado e da espécie *P. setacea*

foram utilizadas como testemunhas. Todas as plantas foram cultivadas no mesmo campo experimental (Tabela 1).

Tabela 1 – Origem, identificação e características agronômicas de três famílias de irmãos completos (F91, F89 e F84) do primeiro ciclo de seleção recorrente de *Passiflora* da UENF para resistência ao CABMV, de *P. edulis* e de *P. setacea*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Identificação dos genótipos	F91	F89	F84	<i>P. edulis</i>	<i>P.setacea</i>
Descrição	FSR91	FSR89	FSR84	<i>P edulis</i> **	<i>P.setacea</i> *
Cruzamentos	231(FIC ₁) x 583(RC ₂ -355)	231(FIC ₁) x 495(RC ₂ -293)	34(FIC ₂) x 24 (FIC ₂)	'UENF Rio Dourado'	BAG UENF
AACPDM	861,43	956,25	956,31	1312,5	435
Massa média do fruto (g)	115,28	90,24	96,72	147,19	56,40
Comprimento médio do fruto (mm)	79,64	70,11	72,11	81,63	55,23
Diâmetro médio do fruto (mm)	65,57	61,19	59,79	71,65	47,14
Brix°	11,27	10,33	12,60	11,54	12,53

FSR – Famílias de irmãos completos do primeiro ciclo de seleção recorrente. FIC – Famílias de irmãos completos oriundas da recombinação de genótipos selecionados do RC1 (Gonçalves et al., 2021). HI – Híbridos interespecíficos (Santos et al., 2015b). RC2 – Famílias de irmãos completos da segunda geração de retrocruzamento (Vidal et al., 2021). AACPDM – área abaixo da curva de progresso da doença média. *Espécie silvestre do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da UENF. **Cultivar UENF Rio Dourado (Viana et al., 2016).

As sementes, de frutos recém colhidos, foram lavadas em água corrente com o auxílio de uma peneira, para remover toda mucilagem. Em seguida, foram colocadas para secar em papel toalha em temperatura ambiente por 24 horas. Antes da execução de cada experimento foi realizado o teste do tetrazólio seguindo as recomendações de Brasil (2009). Para isso as sementes sem tegumento foram

colocadas em solução 2,3,5 -Trifenil cloreto de tetrazólio a 1% por 12 horas em câmara BOD. A viabilidade foi verificada pela mudança de coloração nas sementes.

4.2. Experimento I: Quebra de dormência

Neste experimento foram utilizadas sementes de três famílias de irmãos completos: Família 91, Família 89 e Família 84, sementes da cultivar UENF Rio Dourado e da espécie *P. setacea* como testemunhas. O experimento foi conduzido em um delineamento em blocos ao acaso (DBC) em esquema fatorial de 5x3 (cinco genótipos e três tipos de explante: sementes com tegumento, sementes sem tegumento e embrião isolado), com quatro repetições. Cada repetição foi constituída por uma placa de Petri (90 x 15 mm) com quatro explantes.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes com e sem tegumento (removidas com auxílio de uma mini morsa) foram desinfestadas com álcool 70%, por 60 segundos e em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (NaClO) com duas gotas de Tween® 20 a cada 100 mL, durante 15 minutos e enxaguadas por três vezes em água deionizada e autoclavada. Para a excisão dos embriões, foram usados pinças, bisturis estéreis e um microscópio estereoscópico (Tecnival®), devidamente desinfestado. Em seguida, sementes com tegumento, sem tegumento e os embriões zigóticos isolados foram inoculados em meio de cultivo.

O meio de cultivo foi composto por metade da concentração dos sais minerais do meio MS (Murashige e Skoog, 1962), vitaminas de Gamborg (Gamborg, 1968), 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarose, pH ajustado para 5,7 e solidificado com 7 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Sigma®, segundo protocolo definido por Generoso et al. (2018). Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm e distribuídos 25 mL por placa de Petri (90 x 15 mm). Após inoculados os explantes no meio de cultivo, as placas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 27±2°C no escuro, por 15 dias, pois as sementes de maracujazeiro são fotoblásticas negativas, e depois transferidas para luz com fotoperíodo de 16:8 horas de luz:escuro, por mais 13 dias. A luminosidade foi fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia com intensidade luminosa de 50 µmol m⁻² s⁻¹.

As avaliações foram diárias ao longo de 28 dias. Após esse período foram feitas as seguintes avaliações:

Índice de Velocidade de Germinação (IVG): Durante o período do teste de germinação, todos os dias, foi avaliado o IVG, contabilizando sementes que emitiram o sistema radicular. Para o cálculo do IVG foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962) (Figura 2).

Figura 2. Fórmula para o cálculo de IVG.

$$\text{IVG} = G_1N_1 + G_2N_2 + \dots + G_nN_n$$

Em que:

IVG = índice de velocidade de germinação;

G1 a Gn = é o número de plântulas germinadas a cada dia;

N1 a Nn = Número de dias de cada contagem.

Taxa de germinação das sementes: Foi contabilizado ao final do período de teste o total de sementes germinadas em relação ao quantitativo inicial de sementes postas para germinar.

Germinação acumulada: Feito ao final do período de teste onde foram contabilizadas o quantitativo de sementes germinadas em cada dia.

Massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total: Para determinar o peso da matéria seca, as quatro plântulas medidas de cada repetição, foram colocadas separadamente (parte aérea e raiz) em envelopes de papel e levadas para a estufa com circulação forçada de ar, a 70°C constante, durante 72h. Após o tratamento de secagem, as amostras foram pesadas em balança com precisão 0,0001 g, sendo os resultados expressos em g/plântula.

Comprimento das plântulas: Para o comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR) foram utilizadas as quatro plântulas de cada repetição do teste. Com o auxílio de um paquímetro digital foi mensurado o tamanho da parte aérea e do sistema radicular, sendo os resultados expressos em milímetros. O CPA foi obtido pela distância entre a inserção da porção basal da raiz primária ao ápice da parte aérea. O CR foi mensurado pela distância entre a parte apical e a parte basal.

Número de folhas: Foram contabilizadas ao final do período de teste, em todas as plântulas obtidas em todos os tratamentos e fazendo média em todas as repetições. Foram consideradas todas as folhas emitidas em cada plântula.

Plântulas normais e plântulas anormais e sementes não germinadas: Foram consideradas germinadas normais, as plântulas que desenvolveram as seguintes estruturas: sistema radicular (raiz primária e secundária) e parte aérea (hipocótilo, epicótilo, cotilédones) (BRASIL, 2009). Plântulas germinadas anormais, as plantas que não desenvolveram alguma das estruturas do sistema radicular e parte aérea. E sementes não germinadas, sementes que não emitiram raiz primária e não houve desenvolvimento do embrião.

4.3. Experimento II: Germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros

O experimento foi conduzido em DBC, em esquema fatorial 5x4, três famílias de irmãos completos: Família 91, Família 89 e Família 84, sementes da cultivar UENF Rio Dourado e da espécie *P. setacea* (Tabela 1) e quatro meios de cultura (M1 - ½ MS e 20 g L⁻¹ de sacarose; M2 - ½ MS e 30 g L⁻¹ de sacarose; M3 - ½ MSM e 20 g L⁻¹ de sacarose; M4 - ½ MSM e 30 g L⁻¹ de sacarose), os tipos de sais minerais dos meios foram o MS (Murashige; Skoog, 1962) e o MSM (Monteiro et al., 2000) (Tabela 2). O experimento foi composto por oito repetições. Foram avaliadas quatro repetições aleatoriamente. Cada repetição foi composta por um frasco (125mm x 60mm) com quatro explantes.

A remoção do tegumento, assepsia e excisão dos embriões foram feitos seguindo o protocolo utilizado no item 4.2.

Os meios de cultivo foram compostos por duas concentrações de sais minerais (½ MS e ½ MSM) combinados com duas concentrações de sacarose (20 e 30 g L⁻¹), acrescidos de vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, pH ajustado para 5,7 e solidificado com 6 g L⁻¹ de ágar bacteriológico Sigma®. Em seguida, 40 mL dos meios de cultivo foram distribuídos em cada frasco que foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C e 1,1 atm. Após inoculados os embriões, os frascos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura ±27°C no escuro, por 15 dias e depois transferidas para luz com fotoperíodo 16:8 horas de luz :escuro e luminosidade fornecida por lâmpadas OSRAM® luz do dia, com intensidade luminosa de 50 µmol m⁻² s⁻¹.

Tabela 2 – Constituintes do meio de cultura MS e do meio de cultura modificado MSM (Monteiro et al., 2000 adaptado)

Constituintes	MS (mg L ⁻¹)	MSM (L ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650,00	1000,00
KNO ₃	1900,00	1520,00
CaCl ₂ ·H ₂ O	440,00	-
Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	1300,00
KH ₂ PO ₄	170,00	272,00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370,00	616,00
H ₃ BO ₃	6,20	4,50
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,30	-
MnSO ₄ ·4H ₂ O	-	28,00
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60	2,90
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	1,25
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,250	0,250
KI	0,830	-
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	33,60	74,84
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,80	55,60
Ácido nicotínico	0,5	0,5
Piridoxina	0,5	0,5
Tiamina	0,1	0,1
Glicina	2,0	2,0
Myoinositol	100,0	100,0

As avaliações foram diárias ao longo de 28 dias. Após esse período foi avaliado o IVG, a taxa de germinação, plântulas normais, plântulas anormais e embriões não germinados, de acordo como descrito no item 4.2. Não foram feitas análises destrutivas (massa da matéria seca da raiz, parte aérea e total).

4.4. Experimento III: Crescimento *in vitro* e aclimatização de plantas oriundas de embriões zigóticos maduros

Para o experimento de crescimento *in vitro*, foram utilizadas as plântulas germinadas no experimento II, seguindo os mesmos tratamentos e mantendo as oito repetições.

As plântulas germinadas na etapa de germinação *in vitro* com 28 dias foram mantidas em sala de crescimento nas mesmas condições de luminosidade e temperatura mencionadas no experimento II (item 4.3) até aos 45 dias. Ao final da fase *in vitro* (45 dias) foram realizadas análises de vigor em quatro repetições escolhidas ao acaso. Foram avaliados o número de folhas, o comprimento da parte aérea e da raiz, a massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total (item 4.2).

Para o experimento de aclimatização foram utilizadas as plantas das quatro repetições restantes. O experimento de aclimatização foi realizado em casa de vegetação, seguindo os mesmos tratamentos da fase *in vitro*, foi conduzido em DBC e esquema fatorial 5x4 (item 4.3). O experimento foi constituído por quatro blocos, cada parcela composta por quatro plantas. A casa de vegetação é coberta com filme agrícola de 150 micrômetros de espessura e tela de sombreamento de 30%. As plantas foram lavadas em água corrente para a remoção do meio de cultivo das raízes e depois transferidas para bandejas de plástico com capacidade de 200 mL por célula, preenchidas com substrato comercial Basaplant®Hortaliças e irrigadas duas vezes por dia. Após 35 dias, foram feitas análises fisiológicas: índice fotossintético (PI), fluorescência da clorofila *a* (usando a variável F_v/F_m – rendimento quântico máximo do PSII) e intensidade de verde. Foram avaliados também o comprimento das plantas, o número de folhas, a sobrevivência, a massa da matéria seca da parte aérea, raiz e total.

4.4.1. Determinação da fluorescência da clorofila *a* e índice fotossintético

A fluorescência da clorofila *a* (F_v/F_m) e o índice fotossintético (PI), foram determinados por meio de um fluorímetro de luz não modulado, modelo Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter (Hansatech Instruments – King's Lynn, Norfolk). A avaliação foi feita com a terceira folha a contar do ápice para a base, a qual estava plenamente expandida e intacta, sempre às 16:00 horas. Foram feitas três leituras por planta. Com o auxílio de uma pinça, as folhas foram adaptadas ao escuro por 15 minutos para que todos os centros de reação do fotossistema II (PSII) adquirissem a condição de “abertos” e a perda de calor fosse mínima (Bøllhar-Nordenkampf et al., 1989).

4.4.2. Intensidade de verde

A intensidade da cor verde das folhas foi determinada por um medidor portátil de clorofila, modelo SPAD-502 (Chlorophyll meter – Minolta, Japão). Foram feitas três leituras por planta e, em seguida, obtidas as médias. A avaliação foi feita com a terceira folha a contar do ápice para a base (mesma folha, mesmo horário e dia na qual foi feita a determinação da fluorescência da clorofila *a* e do índice fotossintético). O medidor portátil de clorofila tem sido usado como ferramenta para detectar estresses abióticos em diversas culturas, como o hídrico, o de nitrogênio e o salino. Este medidor apresenta simplicidade no uso e possibilita uma avaliação

não destrutiva do teor de clorofila presente no tecido foliar (Torres Netto et al., 2002; Torres Netto, 2005; Peçanha, 2010; Castro, 2011).

4.5. Determinação da matéria seca

Para determinar a massa da matéria seca nos experimentos I e III, a parte aérea e as raízes das plantas foram acondicionadas separadamente em sacos de papel identificados e secados em estufa de circulação forçada de ar, a 70°C, até atingirem massa constante. Posteriormente, foram pesadas em balança analítica para determinação da massa da matéria seca da parte aérea, da raiz e total.

4.6. Análises estatísticas

As variáveis dos experimentos de quebra de dormência, germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros, crescimento *in vitro* e aclimatização de plantas oriundas de plantas de embriões zigóticos maduros foram submetidas à análise de normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico R versão 4.1.1, pacote ExpDes.pt.

Para o experimento I foi utilizado o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + B_k + G_i + A_j + GA_{ij} + E_{ijk}$$

Onde:

$Y_{(ijk)}$ = é o valor observado na parcela ijk que recebeu o efeito do i -ésimo tratamento (genótipo) da k -ésima repetição no j -ésimo corte; μ é uma constante geral; B_k é o efeito do k -ésimo bloco (repetição); G_i é o efeito fixo do i -ésimo genótipo; A_j é efeito do i -ésimo corte; GA_{ij} é efeito da interação entre o i -ésimo genótipo e o j -ésimo meio de cultivo; E_{ijk} é o erro aleatório associado à observação Y_{ijk} .

Para o experimento II e III foi utilizado o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + B_k + G_i + A_j + GA_{ij} + E_{ijk}$$

Onde:

$Y_{(ijk)}$ = é o valor observado na parcela ijk que recebeu o efeito do i -ésimo tratamento (genótipo) da k -ésima repetição no j -ésimo meio de cultivo; μ é uma constante geral; B_k é o efeito do k -ésimo bloco (repetição); G_i é o efeito fixo do i -ésimo genótipo; A_j é efeito do i -ésimo meio de cultivo; GA_{ij} é efeito da interação entre o i -ésimo genótipo e o j -ésimo meio de cultivo; E_{ijk} é o erro aleatório associado à observação Y_{ijk} .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento I: Quebra de dormência

Todas as sementes da Família 91, da Família 89, da Família 84, das espécies *P. edulis* e *P. setacea* apresentaram viabilidade acima de 90% pelo teste do tetrazólio realizado.

A análise de variância demonstrou diferença significativa ($p \leq 0,05$), entre as famílias de irmãos completos avaliadas, para todas as características, com exceção para a variável sementes não germinadas (SNG) (Tabela 3). Tal resultado indica a existência de variabilidade genética na população, permitindo, desse modo, a exploração da variabilidade, a fim de melhorar a população neste ciclo e em ciclos futuros, para favorecer o avanço no processo seletivo de famílias superiores.

Os coeficientes de variação, para as variáveis Plântulas normais (PN), Número de folhas (NF), Comprimento da parte aérea (CPA), Comprimento da raiz (CR), Massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e Massa da matéria seca total (MST), apresentaram valores de CV% (19,39%, 14%, 14,01%, 22,06%, 21,48%, 31,62%, respectivamente), indicando boa precisão experimental e confiabilidade dos dados.

Para os caracteres índice de velocidade de germinação (IVG), Plântulas anormais (PA), Sementes não germinadas (NG) os altos valores de CV% (45,43%, 166,89%, 346,84%, respectivamente) podem ser explicados pela presença de muitos zeros, pois a maioria das famílias apresentou alta porcentagem de germinação. E para a variável Massa da matéria seca da raiz (MSR) o alto valor de CV% (42,37%) pode ser explicado pela desuniformidade dos dados. Portanto, a

natureza das observações não é homogênea, o que se traduz em um coeficiente maior.

As sementes colocadas para germinar *in vitro* com tegumento não germinaram e houve incidência de contaminação por fungos e bactérias nesse tipo de explante. Na germinação *in vitro* das sementes sem tegumento e embrião zigótico houve diferença significativa entre os genótipos para a variável IVG e NF. Houve efeito significativo do tipo de explante para PN, CR, MSPA e da MSR.

Houve interação entre os explantes e os genótipos para as variáveis PN, CPA e MST. Não houve efeito dos tratamentos para SNG. (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para as variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação (IVG), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), sementes não germinadas (SNG), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR) e da matéria seca total (MST), em função do tipo de explante (semente sem tegumento e embrião zigóticos) e genótipos de *Passiflora* L. (Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* e *P. setacea*). Após 28 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

FV	QM					
	GL	IVG	PN	PA	SNG	NF
Bloco	3	0,14 ^{ns}	57,30 ^{ns}	62,50 ^{ns}	140,63 ^{ns}	0,36 ^{ns}
Genótipo	4	0,62 *	4528,10 ^{ns}	195,32 ^{ns}	156,25 ^{ns}	3,32*
Explante	1	0,13 ^{ns}	1890,63*	1000,00*	15,60 ^{ns}	0,019 ^s
Genótipo* Explante	4	0,15 ^{ns}	1031,25*	257,82 ^{ns}	250,00 ^{ns}	0,49 ^{ns}
Resíduo	27	1,32	300,35	108,79	117,47	0,22
CV%		45,43	19,39	166,89	346,84	14,00
FV	GL	CPA	CR	MSPA	MSR	MST
Bloco	3	54,24 ^{ns}	371,50 ^{ns}	0,000004 ^{ns}	0,000018 ^{ns}	0,000168 ^{ns}
Genótipo	4	425,67*	740,50 ^{ns}	0,000086*	0,000038 ^{ns}	0,0003815*
Explante	1	2288,56*	7773,20*	0,000518*	0,000389*	0,0007022*
Genótipo* Explante	4	278,05*	562,10 ^{ns}	0,000036 ^{ns}	0,000029 ^{ns}	0,0003490*
Resíduo	27	35,98	332,30	0,000019	0,000018	0,0000791
CV%		14,01	22,06	21,48	42,37	31,62

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns}Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Para a variável PN, houve interação entre os genótipos e os tipos de explante. Embriões zigóticos foram superiores na obtenção de PN para F84 (100%) e para *P. setacea* (100%), mas não diferiu para os outros genótipos. Quando os explantes foram sementes sem tegumento, o genótipo F89 (100%) foi superior ao genótipo F84 e a espécie *P. setacea* (62,5%), mas não diferiu de F91 e *P. edulis*. Não houve diferença entre os genótipos quando o explante foi o embrião zigótico (Figura 2 e Tabela 4).

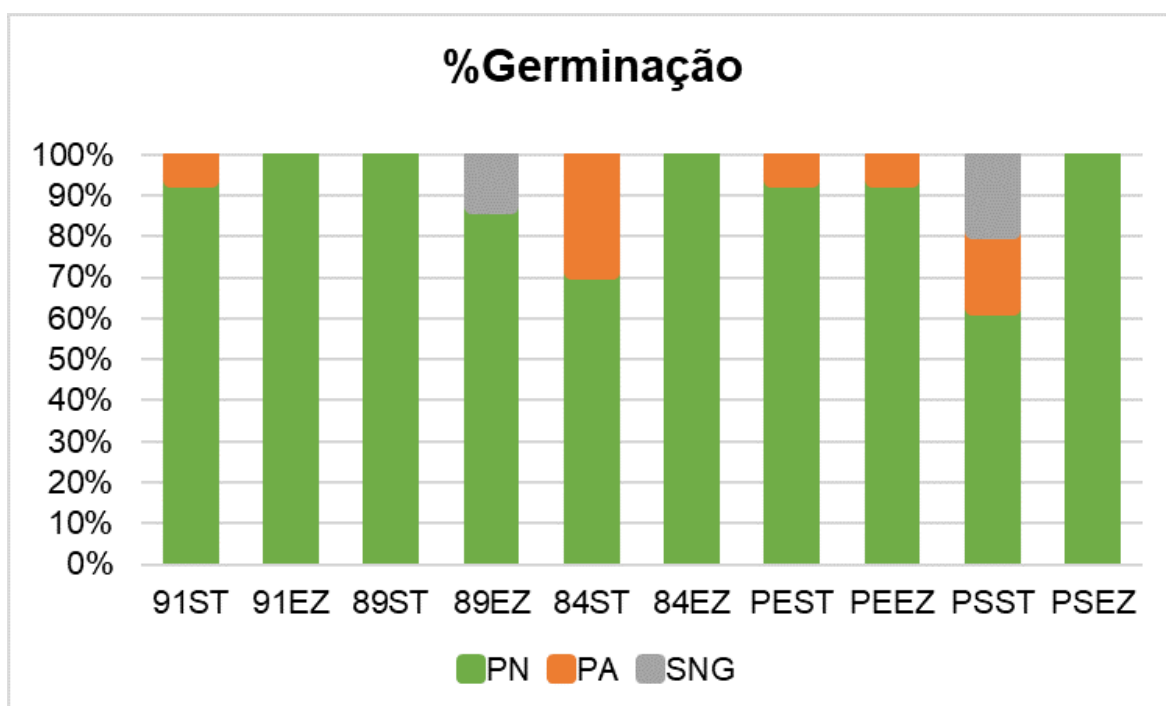


Figura 2 –Porcentagem de germinação *in vitro* dos genótipos de *Passiflora* para as variáveis: Plântulas normais (PN), Plântulas anormais (PA) e sementes não germinadas (SNG) em relação à Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* (PE) e *P. setacea* (PS), e tipo de explante: sementes sem tegumento (ST) e embrião zigótico (EZ), após 28 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022.

As menores médias de CPA foram obtidas com explante embrião zigótico para a maioria dos genótipos, para a espécie *P. setacea* não houve diferença entre os explantes. Sementes sem tegumento proporcionaram maior CPA para *P. edulis* (68,10 mm) e menor média para *P. setacea* (37,23 mm), os genótipos F89 e F84 não diferiram de *P. setacea*. Embriões zigóticos favoreceram maiores CPA para *P.*

edulis (43,37 mm) e *P. setacea* (42,61 mm), as menores médias de CPA foram obtidas pelos genótipos F91 (29,87 mm) e F89 (28,43) (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de desdobramento das variáveis de vigor: plântulas normais (PN), comprimento da parte aérea (CPA) e massa da matéria seca total (MMST), em função da interação entre genótipos de *Passiflora* (Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* e *P. setacea*) e tipo de explante (semente sem tegumento e embrião zigótico), após 28 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Genótipos	Plântulas normais (%)		
	Sem tegumento	Embrião zigótico	Média
F91	93,75 abA	100,00aA	96,88
F89	100,00 aA	87,50aA	93,75
F84	62,50 bB	100,00 aA	81,25
<i>P. edulis</i>	93,75 abA	93,75aA	93,75
<i>P. setacea</i>	62,50 bB	100,00 aA	81,25
Média	82,50	96,24	-

Genótipos	Comprimento da parte aérea (mm)		
	Sem tegumento	Embrião zigótico	Média
F91	49,74 bA	29,87 bB	39,81
F89	47,53 bcA	28,43 bB	37,98
F84	49,23 bcA	31,90 abB	40,57
<i>P. edulis</i>	68,10 aA	43,37 aB	55,74
<i>P. setacea</i>	37,23 cA	42,62 aA	39,93
Média	50,37	35,31	-

Genótipos	Matéria seca total (g)		
	Sem tegumento	Embrião zigótico	Média
F91	0,043 aA	0,020 aB	0,032
F89	0,043 aA	0,022 aB	0,033
F84	0,024 bcA	0,025 aA	0,025
<i>P. edulis</i>	0,036 abA	0,033 aA	0,035
<i>P. setacea</i>	0,015 cA	0,021 aA	0,018
Média	0,032	0,024	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Em relação a MST houve interação entre os genótipos e tipo de explante. Embriões zigóticos apresentaram menores médias de MST para F91 (0,020 g) e

F89 (0,022 g), mas não diferiu de sementes sem tegumento para os demais genótipos. Para sementes sem tegumento, os genótipos F91 (0,043 g) e F89 (0,043 g) apresentaram maiores médias de MST, mas não foram diferentes de *P. edulis*. Não houve diferença de MST entre os genótipos para o explante embrião zigótico (Tabela 4).

Na avaliação do IVG os genótipos testados F91(0,58), F89 (0,45) e F84 (0,35) apresentaram médias intermediárias em relação aos parentais, o maior índice foi observado em *P. edulis* (0,68) e a menor média para *P. setacea* (0,35). O IVG não foi influenciado pelo tipo de explante, embora as sementes sem tegumento (0,43) tenham apresentado um IVG menor que os embriões zigóticos (0,54) (Tabela 5). Portanto, o IVG variou principalmente com o genótipo.

Não houve diferença entre os genótipos na formação de PN. Contudo, ao comparar o tipo de explante, a porcentagem de PA quando se utilizou os embriões zigóticos (1,25%) foi menor em relação a sementes sem tegumento (11,25%) (Figura 2, Tabela 5).

Para a variável NF houve diferença significativa entre os genótipos As espécies *P. setacea* (4,14) e *P. edulis* (3,66) e o genótipo F84 (3,46) apresentaram médias maiores em relação aos genótipos F91 (2,68) e F89 (2,65). Para o tipo de explante não houve diferença em relação ao NF (Tabela 5).

Em relação ao CR, não houve diferença significativa entre os genótipos. Houve efeito dos explantes, nas sementes sem tegumento a média (96,58 mm) foi superior à média obtida nos embriões zigóticos (68,70 mm) (Tabela 5).

Para a variável MSPA, houve efeito isolado dos fatores genótipos e explantes. As médias de MSPA de *P. edulis* (0,023 g) e os genótipos F84 (0,021 g) e F89 (0,022 g) foram superiores a *P. setacea* (0,015 g). Sementes sem tegumento acumularam maior MSPA (Tabela 5).

Não houve diferença para os genótipos quanto a variável MSR. Em relação aos explantes, sementes sem tegumento apresentaram maior MSR (0,013 g) em relação aos embriões zigóticos (0,007 g) (Tabela 5).

Tabela 5. Médias das variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação (IVG) e plântulas anormais (PA), número de folhas (NF) e massa seca da parte aérea (MSPA), comprimento da raiz (CR) e massa seca da raiz (MSR) para os genótipos de *Passiflora* (Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* e *P. setacea*) e tipo de explante (semente sem tegumento e embrião zigótico), após 28 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Genótipos	IVG	PA (%)	NF (un)	CR (mm)	MSPA (g)	MSR (g)
F91	0,58 ab	3,13 a	2,68 b	84,21 a	0,019 ab	0,013 a
F89	0,45 ab	-	2,65 b	83,81 a	0,022 a	0,012 a
F84	0,38 ab	12,5 a	3,46 a	74,10 a	0,021 a	0,010 a
<i>P. edulis</i>	0,68 a	6,25 a	3,66 a	97,30 a	0,023 a	0,010 a
<i>P. setacea</i>	0,35 b	9,38 a	4,14 a	73,80 a	0,015 b	0,010 a
Média	0,48	6,25	3,32	82,64	0,02	0,011
Explantos	IVG	PA (%)	NF (un)	CR (mm)	MSPA (g)	MSR (g)
Sem tegumento	0,43 a	11,25 a	3,27 a	96,58 a	0,024 a	0,013 a
Embrião zigótico	0,54 a	1,25 b	3,37 a	68,70 b	0,015 b	0,007 b
Média	0,49	6,25	3,32	82,64	0,019	0,01

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Em relação a germinação acumulada, a germinação teve início no terceiro dia após a inoculação *in vitro* dos embriões zigóticos e das sementes sem tegumento, com exceção das sementes sem tegumento de *P. setacea* que começaram a germinar no sétimo dia após a inoculação. Foi observado que ao 22º dia todos os genótipos já haviam alcançado o máximo de germinação. O embrião zigótico para todos os genótipos (F91, F89, F84, PE, PS) resultou em máxima germinação no 14º dia (Figura 3).

A redução no tempo de obtenção de plântulas é benéfica. O uso de embriões pode reduzir o tempo de produção de mudas por meio da uniformização e redução do período de germinação das sementes (Silva, 2002). O máximo de germinação no 14º dia para os tratamentos usando o embrião zigótico maduro representou a redução de 50% no tempo recomendado pela RAS (Brasil, 2009) para testes de germinação de maracujazeiro.

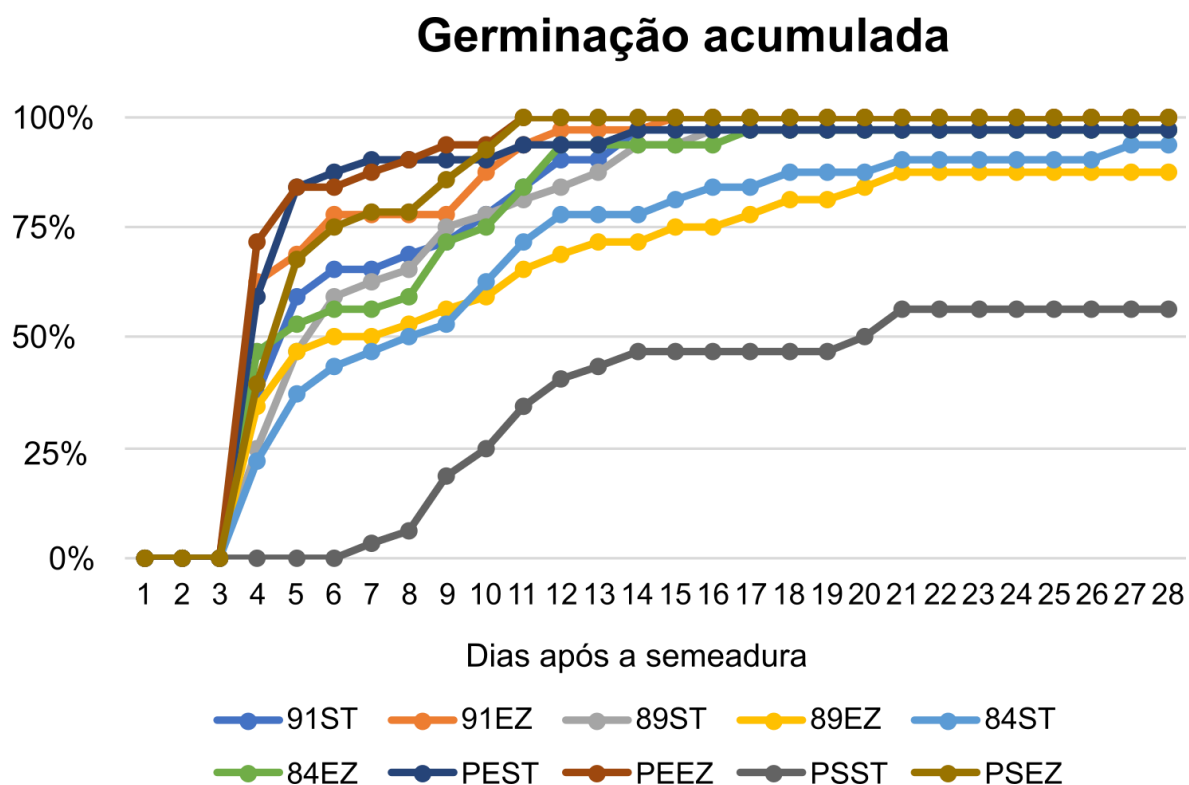


Figura 3. Germinação acumulada dos genótipos de *Passiflora*: Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* (PE) e *P. setacea* (PS), em função do tipo de explante: sementes sem tegumento (ST) e embrião zigótico (EZ), após 28 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022.

De modo geral, foi possível observar diferenças relacionadas ao genótipo e ao tipo de explante para as variáveis de vigor em estudo. O tipo de explante foi importante para a germinação de plântulas normais, sendo o embrião zigótico o que resultou em maior porcentagem de formação de plântulas normais para todos os genótipos. A literatura sugere que a retirada completa do tegumento supera a dormência física, e melhora a germinação (Rego et al., 2014).

Existem substâncias presentes nos tecidos que recobrem as sementes que podem prejudicar o processo germinativo, como as substâncias presentes no arilo, o qual consiste em uma capa gelatinosa rica em pectina, que pode prejudicar a uniformidade da germinação por atuar como barreira ou conter substâncias inibidoras de crescimento (Martins et al., 2010). Dessa forma, a remoção completa do tegumento e do endosperma elimina os resquícios de possíveis substâncias inibidoras provenientes do arilo.

A retirada do tegumento proporcionou aumento significativo na germinação das sementes em todos os genótipos avaliados (Figura 4), contudo, a germinação não foi uniforme e houve incidência de plântulas anormais (Figura 2).

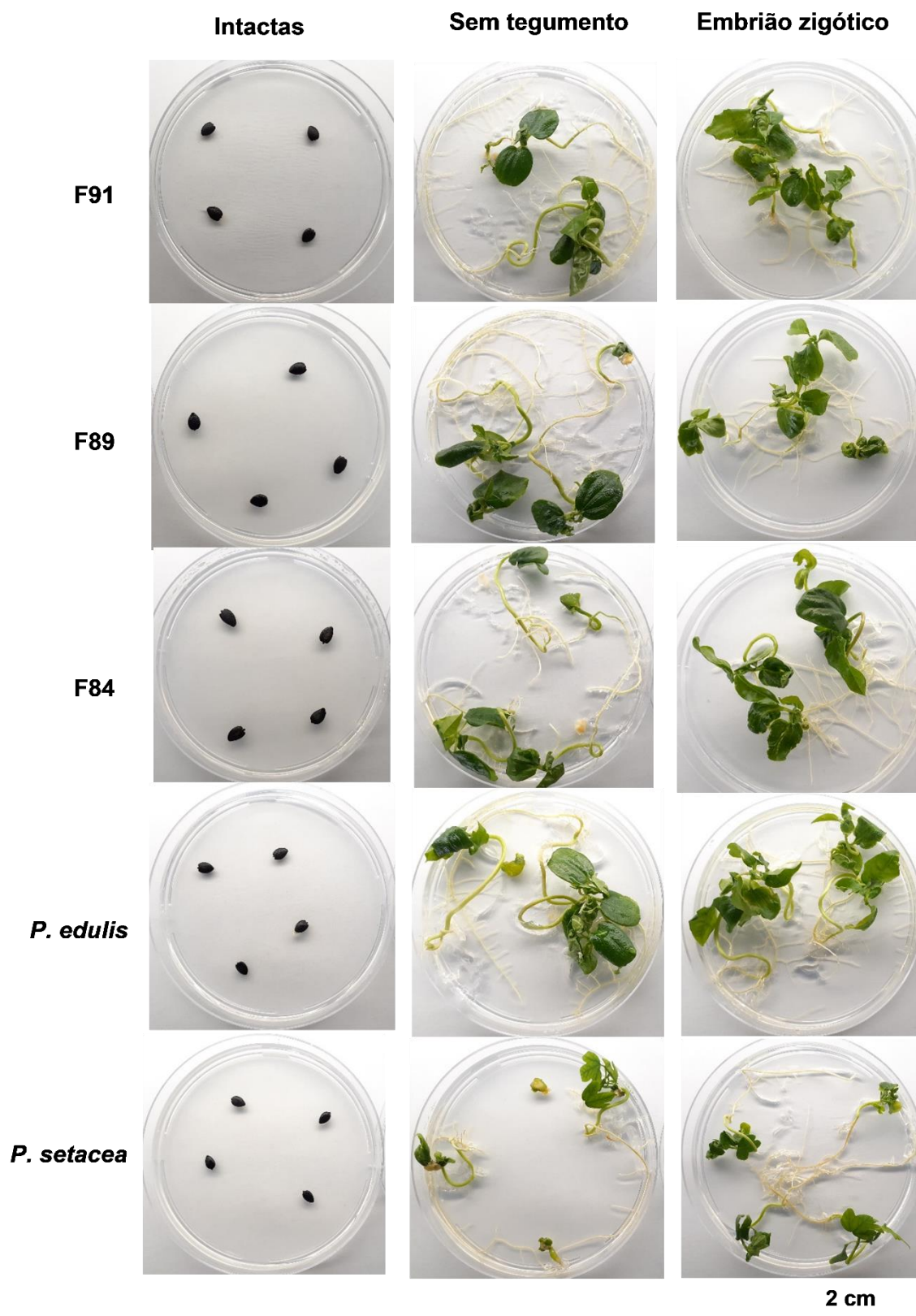


Figura 4 – Germinação *in vitro* dos genótipos de *Passiflora*: Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* e *P. setacea*, em função do tipo de explante: sementes intactas, sementes sem tegumento e embrião zigótico, após 28 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022.

A manutenção do endosperma ainda pode representar uma barreira física e, ou fisiológica para o pleno desenvolvimento do embrião e formação de plântulas normais, pois algumas espécies de *Passiflora* possuem endosperma residual, que pode conter substâncias inibidoras e podem prejudicar o crescimento do embrião e a germinação, como é o caso do maracujazeiro-azedo (Morley-Bunker, 1980; Junghans et al., 2006).

Quando o embrião foi excisado a porcentagem de PN passou de 82,5% (sementes sem tegumento) para 96,24% (embrião zigótico) (Tabela 4, Figura 2). Do mesmo modo, aconteceu com a formação de PA (11,25% em sementes sem tegumento) para 1,25% (embrião zigótico) (Tabela 5). Além disso, foi possível observar (Figura 2) que os embriões isolados de três famílias de meio irmãos (F91, F89 e F84) e de *P. setacea* e *P. edulis* também resultaram em maior formação de plântulas normais. Fato este que já havia sido observado por Generoso (2018) para a espécie *P. edulis*.

Em relação as variáveis CPA, CR, MSPA, MSR e MST, foi possível perceber que as reservas do endosperma foram essenciais para garantir o desenvolvimento das plântulas. O endosperma desempenha papel importante no desenvolvimento, otimização e manutenção do meio adequado para o crescimento do embrião como fonte de nutrientes e condições essenciais para o crescimento e diferenciação (Carvalho; Nakagawa, 2012). Isso indica que o meio de cultivo precisa repor as necessidades do embrião zigótico maduro para que se desenvolva melhor. O número de folhas é uma característica morfológica ligada a cada genótipo e não foi influenciada pelo explante.

A partir dos dados apresentados foi possível concluir que o uso de explantes contendo o endosperma proporcionou a produção de mudas mais vigorosas, porém proporcionou maior número de plântulas anormais e desuniformidade na germinação. Ou seja, o meio de cultivo não foi suficiente para fornecer todos os requerimentos nutricionais que o embrião precisa para desenvolver plântulas mais vigorosas. Portanto, para garantir que a germinação dos diferentes genótipos de *Passiflora* ocorra e seja mais uniforme, recomenda-se o cultivo de embriões zigóticos maduros como explante. Contudo, é preciso testar outras combinações de meio de cultivo para atender as necessidades nutricionais do embrião zigótico.

5.2. Experimento II: Germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros

Todas as sementes da Família 91, da Família 89, da Família 84, das espécies *P. edulis* e *P. setacea* apresentaram viabilidade acima de 90% pelo teste do tetrazólio realizado.

A análise de variância demonstrou diferença significativa ($p \leq 0,05$), entre as famílias de irmãos completos avaliadas, para a variável índice de velocidade de germinação (IVG), e diferença significativa ($p \leq 0,01$), para a variável embriões não germinados (ENG) (Tabela 6). Tal resultado indica a existência de variabilidade genética na população.

Os coeficientes de variação, para as variáveis IVG e Plântulas normais (PN), apresentaram valores de CV% (20,47%, 31,70%) indicando boa precisão experimental e confiabilidade dos dados.

Para os caracteres Plântulas anormais (PA) e ENG os altos valores de CV% (168,84%, 246,05%, respectivamente) podem ser explicados pela presença de muitos zeros, pois a maioria das famílias apresentaram alta porcentagem de germinação. Portanto, a natureza das observações não é homogênea, o que se traduz em um coeficiente maior.

Na germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros dos genótipos de *Passiflora* a análise de variância identificou efeito significativo da interação entre meio de cultura para a variável IVG (Tabela 6).

A análise de variância não identificou efeito dos tratamentos para as variáveis PN e PA. Para a variável ENG foi verificada diferença entre os genótipos (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para as variáveis de vigor: índice de velocidade de germinação (IVG), plântulas normais (PN), plântulas anormais (PA), sementes não germinadas (ENG) em função da interação entre genótipos de *Passiflora* (Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* e *P. setacea*) e meio de cultura: $\frac{1}{2}$ MS + 20 g L⁻¹ de sacarose (M1); $\frac{1}{2}$ MS + 30 g L⁻¹ de sacarose (M2); $\frac{1}{2}$ MSM + 20 g L⁻¹ de sacarose (M3); $\frac{1}{2}$ MSM + 30 g L⁻¹ de sacarose (M4). após 28 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

FV	QM				
	GL	IVG	PN	PA	ENG
Bloco	3	0,01 ^{ns}	843,60 ^{ns}	695,33 ^{ns}	341,13 ^{**}
Genótipo	4	0,22 [*]	949,25 ^{ns}	644,50 ^{ns}	324,22 ^{**}
Meio	3	0,11 [*]	802,00 ^{ns}	278,66 ^{ns}	257,80 ^{ns}
Genótipo*Meio	12	0,08 [*]	235,60 ^{ns}	181,00 ^{ns}	146,38 ^{ns}
Resíduo	57	0,03	673,78	563,70	99,91
CV%		20,47	31,70	168,84	246,05

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

**Significativo pelo teste F a 1% de probabilidade.

^{ns}Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

Para a variável IVG nos meios de cultivo $\frac{1}{2}$ MS + 30 g L⁻¹ de sacarose - M2 e $\frac{1}{2}$ MSM + 30 g L⁻¹ de sacarose - M4 não houve diferença entre os genótipos. No meio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS + 20 g L⁻¹ de sacarose - M1 foi observado para os genótipos F91 e F89 alcançaram as maiores médias (1,11) de IVG em relação à F84 (0,69) e *P. setacea* (0,62). Em relação ao meio de cultivo $\frac{1}{2}$ MSM + 20 g L⁻¹ de sacarose - M3, os genótipos F91, F89 e F84 apresentaram médias significativamente superiores (1,08) em relação à *P. setacea* (0,71) (Tabela 7).

Entre os meios de cultivo houve diferença significativa para o genótipo F91 e os meios M1 e M2 apresentaram um IVG superior. Para F89, F84 e *P. edulis* não houve diferença entre os meios de cultivo. E para *P. setacea* a menor média de IVG foi observada no meio M1 (Tabela 7).

Tabela 7. Análise de desdobramento da variável de vigor: índice de velocidade de germinação (IVG) em função da interação entre genótipos de *Passiflora* (Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* e *P. setacea*) e meio de cultura em função dos tipos dos meios de cultura: $\frac{1}{2}$ MS e 20 g L⁻¹ de sacarose (M1), $\frac{1}{2}$ MS e 30 g L⁻¹ de sacarose (M2), $\frac{1}{2}$ MSM e 20 g L⁻¹ de sacarose (M3) e $\frac{1}{2}$ MSM e 30 g L⁻¹ de sacarose (M4), após 28 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Genótipos	Índice de velocidade de germinação (IVG)				
	M1	M2	M3	M4	Média
F91	1,11 aA	1,17 aA	1,08 aAB	0,75 aB	1,03
F89	1,11 aA	1,17 aA	1,08 aA	0,88 aA	1,06
F84	0,69 bA	0,87 aA	1,08 aA	0,90 aA	0,88
<i>P. edulis</i>	0,90 abA	0,90 aA	0,9 abA	1,03 aA	0,93
<i>P. setacea</i>	0,62 bB	1,04 aA	0,71 bAB	0,8 aAB	0,79
Média	0,88	1,03	0,97	0,87	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Para a variável PN não foi identificado interação nem efeito isolado dos fatores, contudo, foi realizado análise descritiva dos resultados. A formação de plântulas normais variou de 80 a 100% no meio de cultivo: $\frac{1}{2}$ MS e 20 g L⁻¹ de sacarose (PEM1), para o meio: $\frac{1}{2}$ MS e 30 g L⁻¹ de sacarose (91M2, 89M2, PEM2 e PSM2), para o meio $\frac{1}{2}$ MSM e 20 g L⁻¹ de sacarose (89M3, PEM3 e PSM3) e para o meio de cultivo $\frac{1}{2}$ MSM e 30 g L⁻¹ de sacarose (91M4, 89M4, PEM4 e PSM4). O M1, foi o que proporcionou a menor quantidade de médias obtidas entre 80 e 100% de germinação de plântulas normais. Houve formação de PA na maior parte dos tratamentos, contudo em 91M1, 89M1 e 84M4, ocorreram 25% de plântulas anormais, as maiores taxas observadas (Figura 5). A formação de PN e PA a partir do embrião zigótico maduro de diferentes genótipos de *Passiflora* são dependentes do genótipo, tipos de sais e concentração de sacarose.

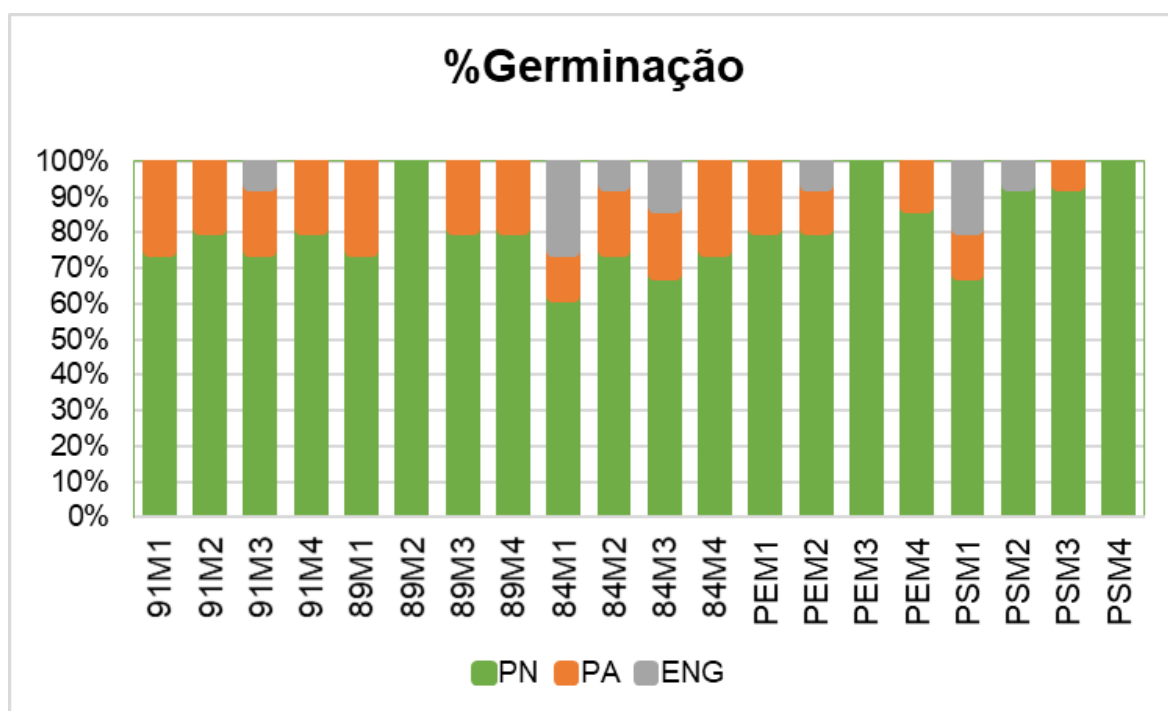


Figura 5 –Porcentagem de germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros para as variáveis: Plântulas normais (PN), Plântulas anormais (PA) e embrião não germinado (ENG) em relação aos genótipos de *Passiflora*: Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis*(PE) e *P. setacea*(PS), e dos meios de cultura: $\frac{1}{2}$ MS e 20 g L⁻¹ de sacarose (M1), $\frac{1}{2}$ MS e 30 g L⁻¹ de sacarose (M2), $\frac{1}{2}$ MSM e 20 g L⁻¹ de sacarose (M3) e $\frac{1}{2}$ MSM e 30 g L⁻¹ de sacarose (M4), após 28 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022.

Para a variável ENG, o genótipo F84 obteve maior média de ENG (10,93%) e para F89 houve 100% de germinação dos embriões. Não houve diferença entre os meios de cultivo, porém o meio de cultivo M4 proporcionou 100% de embriões germinados (Tabela 8). Os tratamentos 91M3 (6,25%), 84M1(25%), 84M2 (6,25%), 84M3 (12,5%), PEM2 (6,25%), PSM1 (18,75%), PSM2(6,25%) representaram as maiores médias de embrião não germinado (Tabela 8 e Figura 5).

Portanto, a retirada completa do endosperma resultou na quebra das barreiras impostas pela dormência mecânica e, ou física, e a germinação foi influenciada principalmente pelo genótipo.

Tabela 8. Médias da variável de vigor: embriões não germinados (ENG) para os genótipos de *Passiflora* (Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* e *P. setacea*) e meio de cultura ($\frac{1}{2}$ MS + 20 g L⁻¹ de sacarose – M1; $\frac{1}{2}$ MS + 30 g L⁻¹ de sacarose – M2; $\frac{1}{2}$ MSM + 20 g L⁻¹ de sacarose – M3; $\frac{1}{2}$ MSM + 30 g L⁻¹ de sacarose – M4, após 28 dias de germinação *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022
Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05)

Genótipos	ENG	Meio de cultura	ENG
F91	1,56 ab	M1	8,75 a
F89	0 b	M2	3,75 a
F84	10,93 a	M3	3,75 a
<i>P. edulis</i>	1,56 ab	M4	0 a
<i>P. setacea</i>	6,25 ab	-	-
Média	4,06	Média	4,06

Na literatura é comum ver a utilização dos sais MS para germinação e aplicação de diversas outras técnicas da cultura de tecidos em diversas espécies de *Passiflora* (Faria et al., 2020; Araújo et al., 2022), mesmo com o desenvolvimento do meio de cultivo MSM, que foi adaptado a partir do MS para atender as necessidades nutricionais do cultivo *in vitro* de maracujazeiro-azedo (Monteiro et al., 2000).

Foi possível observar que neste estudo a formação de plântulas normais se concentrou principalmente em M2 e M4, indicando a viabilidade de usar ambos os meios de cultivo, resultado semelhante obtido por Generoso (2018), quando testou metade das concentrações e concentrações máximas dos sais MS e MSM para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros de *P. edulis*, no qual as maiores taxas de plântulas normais ocorreram com $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ MSM. A autora também observou que nas concentrações entre 10 e 40 g L⁻¹ não ocorrem diferenças significativas na obtenção de plântulas normais. Neste estudo, utilizando as concentrações intermediárias 20 e 30 g L⁻¹, percebeu-se que o aumento de 20 para 30 g L⁻¹ gerou aumento na taxa de plântulas normais.

A sacarose é a principal fonte de carbono utilizada nos meios de cultura, e normalmente se usa a concentração de 30 g L⁻¹ (Sacoman et al., 2017; Bernal-Moreno et al, 2018; Generoso et al., 2019), ela desempenha papel importante no potencial osmótico no meio de cultura, sendo também a fonte de energia na

biossíntese de aminoácidos, proteínas, oligossacarídeos estruturais e diversos compostos orgânicos importantes para o crescimento das células (Raghavan, 2003; Caldas et al., 1998).

Para as variáveis avaliadas foi possível perceber que a concentração de sacarose é um elemento importante para o cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros de *Passiflora*. Sendo importante o ajuste e determinação da melhor concentração para diferentes genótipos de interesse para garantir sempre o máximo vigor e desempenho produtivo (Raghavan, 2003).

Portanto, levando em consideração os resultados obtidos para as variáveis de vigor PN, PA, SNG (Figura 3) e IVG (Tabela 8), é possível o uso $\frac{1}{2}$ MS e do $\frac{1}{2}$ MSM para a germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros das famílias de irmãos completos F91, F89 e F84 obtidos do cruzamento entre *P. edulis* e *P. setacea*, da cultivar 'UENF Rio Dourado' (*Passiflora edulis*), da espécie *Passiflora setacea*. E quanto à concentração de sacarose, recomenda-se o uso de 30 g L⁻¹.

5.3. Experimento III: Crescimento *in vitro* e aclimatização de plantas oriundas de embriões zigóticos maduros

O ajuste do melhor meio de cultivo para crescimento *in vitro* de embriões zigóticos maduros influencia no desenvolvimento vigoroso das plântulas. Já existe protocolo para cultivo *in vitro* de embriões zigóticos maduros de maracujazeiro-azedo (*P. edulis*) (Generoso, 2018), contudo é preciso ajustes para mais espécies e novos genótipos de interesse obtidos no melhoramento genético para a cultura.

Para Pereira et al. (2006) o meio de cultivo adequado para o cultivo de embriões deve ser adaptado para cada espécie. Por isso foi realizado o trabalho com diferentes genótipos obtidos do melhoramento genético do maracujazeiro-azedo para resistência ao CABMV, para que possa contribuir com o desenvolvimento de uma nova cultivar nesta etapa do processo.

A análise de variância do experimento de crescimento *in vitro* de plântulas de maracujazeiro-azedo, demonstrou diferença significativa ($p \leq 0,05$), entre as famílias de irmãos completos avaliadas, para todas as características (Tabela 9). O resultado indica a existência de variabilidade genética na população.

Os coeficientes de variação, para as variáveis Comprimento da parte aérea (CPA), Comprimento da raiz (CR), Número de folhas (NF) apresentaram valores de

CV% (16,82%, 22,9% e 22,86%, respectivamente), indicando boa precisão experimental e confiabilidade dos dados.

Para os caracteres Massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), Massa da matéria seca da raiz (MSR) e Massa da matéria seca total (MST) apresentaram os altos valores de CV% (39,06%, 68,12%, 38,42%, respectivamente) podem ser explicados pelas diferenças entre as famílias e desuniformidade dos dados. Portanto, a natureza das observações não é homogênea, o que resulta em um coeficiente maior.

A análise de variância indica que houve interação significativa entre os meios de cultivo e os genótipos apenas para as variáveis CPA e CR. As demais variáveis NF, MSPA, MSR e MST foram significativas apenas para a fonte de variação isolada dos genótipos (Tabela 9).

Tabela 9. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para as variáveis de vigor: número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), massa da matéria seca da raiz (MSR) e massa da matéria seca total (MST), em função do meio de cultura e cinco genótipos de *Passiflora* L. após 45 dias de crescimento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

FV	QM						
	GL	CPA	CR	NF	MSPA	MSR	MST
Bloco	3	856,6*	159,3 ^{ns}	10,37*	0,00016 ^{ns}	0,00023 ^{ns}	0,00044 ^{ns}
Genótipo	4	5813*	7423,7*	24,57*	0,00179*	0,00035752*	0,00352*
Meio	3	129 ^{ns}	905,6 ^{ns}	4,37 ^{ns}	0,00084 ^{ns}	0,00009 ^{ns}	0,000688 ^{ns}
Genótipo *Meio	14	1072,2*	962,36*	2,26 ^{ns}	0,00049 ^{ns}	0,000073 ^{ns}	0,00056 ^{ns}
Resíduo	57	276,2	442,03	1734, 7	0,00026	0,000078	0,00044
CV%		16,82	22,9	22,86	39,06	68,12	38,42

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns} Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

O desdobramento da interação entre genótipo e meio de cultivo para a variável CPA mostrou as maiores médias para as plântulas cultivadas no meio de

cultivo $\frac{1}{2}$ MS + 30 g L⁻¹ de sacarose -M2 com (102,508 mm), seguido do meio de cultivo $\frac{1}{2}$ MSM + 30 g L⁻¹ de sacarose - M4 com (98,328 mm), não houve diferença entre os genótipos para o meio M4. Os meios de cultivo $\frac{1}{2}$ MS + 20 g L⁻¹ de sacarose - M1, M2 e $\frac{1}{2}$ MSM + 20 g L⁻¹ de sacarose - M3 proporcionaram maiores médias de CPA para *P. setacea*, para M4 não houve diferença entre os genótipos (Tabela 10).

Para a variável CR o meio de cultivo M2 seguido do meio de cultivo M1, proporcionaram as maiores médias, 98,914 mm e 96,2 mm, respectivamente. Para os genótipos F91, F89 e *P. edulis* não houve diferença entre os meios de cultivo. Para F84 o meio M1 apresentou a menor média de CR e para *P. setacea* não houve diferença entre os meios de cultivo (Tabela 10).

Tabela 10. Análise de desdobramento das variáveis de vigor: comprimento da parte aérea (CPA) e comprimento da raiz (CR), em função da interação entre genótipos de *Passiflora* (Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* e *P. setacea*) e meio de cultivo ($\frac{1}{2}$ MS + 20 g L⁻¹ de sacarose – M1; $\frac{1}{2}$ MS + 30 g L⁻¹ de sacarose – M2; $\frac{1}{2}$ MSM + 20 g L⁻¹ de sacarose – M3; $\frac{1}{2}$ MSM + 30 g L⁻¹ de sacarose – M4), após 45 dias de crescimento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Genótipos	Comprimento da parte aérea (mm)				
	M1	M2	M3	M4	Média
F91	93,03 bA	112,32 abA	100,91 abA	85,53 aA	97,95
F89	90,74 bA	100,94 abA	87,59 abA	101,09 aA	95,09
F84	42,33 cB	90,00 bA	84,42 bA	91,47 aA	77,06
<i>P. edulis</i>	104,59 bA	84,73 bA	93,77 abA	94,10 aA	94,30
<i>P. setacea</i>	155,81 aA	124,55 aB	118,39 aB	119,45 aB	129,55
Média	97,30	102,51	97,02	98,33	-

Genótipos	Comprimento da raiz (mm)				
	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Média
F91	101,85 abA	104,54 abA	104,40 aA	89,25 abA	100,01
F89	95,86 abA	108,86 abA	92,45 abA	107,78 aA	101,24
F84	124,68 aAB	143,19 aA	76,39 abC	88,20 abBC	108,12
<i>P. edulis</i>	97,15 abA	85,43 bcA	104,90 aA	94,97 aA	95,61
<i>P. setacea</i>	61,46 bA	52,55 cA	54,93 bA	47,61 bA	54,14
Média	96,20	98,91	86,51	85,56	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey (P≤0,05).

Analisando os efeitos simples para o fator genótipo, a espécie *P. setacea* apresentou maior média de NF em relação aos outros genótipos. Para a variável

MSPA, F91 (0,053 g) e F84 (0,051 g) apresentaram as maiores médias em relação à *P. setacea* (0,027 g).

Para MSR, F91 (0,02 g) foi o genótipo com maior média em relação à *P. edulis* (0,010 g) e *P. setacea* (0,008 g). Em relação a variável MST, F91 (0,071 g) e F84 (0,065 g) apresentaram médias superiores à *P. setacea* (0,033 g). Para o efeito de meio de cultura, verificou-se que não houve diferença para as variáveis de vigor analisadas (Tabela 11).

Tabela 11. Médias das variáveis de vigor: número de folhas (NF), massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), massa da matéria seca da raiz (MSR) e massa da matéria seca total (MST) em função da interação entre genótipos de *Passiflora* (Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* e *P. setacea*) e meio cultivado ($\frac{1}{2}$ MS + 20 g L⁻¹ de sacarose – M1; ($\frac{1}{2}$ MS + 30 g L⁻¹ de sacarose – M2; $\frac{1}{2}$ MSM + 20 g L⁻¹ de sacarose – M3; $\frac{1}{2}$ MSM + 30 g L⁻¹ de sacarose – M4), após 45 dias de crescimento *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Genótipo	NF	MSPA (g)	MSR(g)	MST(g)
F91	4,81 b	0,053 a	0,02 a	0,071 a
F89	5,53 b	0,038 ab	0,014 ab	0,050 ab
F84	5,16 b	0,051 a	0,014 ab	0,065 a
<i>P. edulis</i>	5,39 b	0,040 ab	0,010 b	0,052 ab
<i>P. setacea</i>	7,92 a	0,027 b	0,008 b	0,033 b
Média	5,76	0,042	0,013	0,055
Meio de cultura	NF	MSPA (g)	MSR(g)	MST(g)
M1	5,63 a	0,040 a	0,015 a	0,056 a
M2	5,35 a	0,042 a	0,014 a	0,056 a
M3	5,60 a	0,037 a	0,010 a	0,047 a
M4	6,47 a	0,046 a	0,014 a	0,061 a
Média	5,76	0,041	0,013	0,055

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

As variáveis de vigor CPA e CR foram influenciadas pelos genótipos e a composição do meio de cultivo. Para os resultados apresentados, percebe-se que para o crescimento *in vitro* o aumento na concentração de sacarose proporcionou maior desenvolvimento.

Contudo, a composição do meio de cultivo não influenciou a formação de NF, que é uma característica morfológica designada por cada genótipo. Também não influenciou as variáveis de vigor MSPA, MSR e MST.

A literatura relata que há prejuízos no cultivo *in vitro* de maracujazeiro na ausência de sacarose (Generoso et al., 2019). Isso ocorre pois, ao serem cultivados *in vitro* a incorporação natural de carbono se torna muito limitada, precisando que este componente seja fornecido no meio de cultivo. Sozo et al. (2016) observaram que a sacarose influenciou a altura de plântulas de *P. tenuifila* cultivadas *in vitro*.

O meio de cultivo MS foi desenvolvido para atender as necessidades nutricionais das folhas de tabaco (Murashige e Skoog, 1962), porém se tornou o meio de cultura mais utilizado para diferentes culturas no cultivo *in vitro*.

Para o cultivo de maracujazeiro-azedo há um meio de cultivo adaptado a partir do meio MS, que foi desenvolvido para atender as necessidades nutricionais da cultura, pois a literatura relata alguns sintomas de deficiência nutricional das plantas de maracujá cultivadas *in vitro* em meio MS (Dornelas e Vieira, 1994; Monteiro et al., 2000). No entanto, é comum trabalhos com maracujazeiro-azedo e diversas espécies de *Passiflora* utilizando meio MS (Vieira et al., 2014; Sacoman et al., 2017; Faria et al., 2020).

Para atender as necessidades nutricionais do maracujazeiro-azedo, as principais diferenças entre o meio MS e o meio MSM ocorrem na substituição de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pelo $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e a remoção do KI, e alterações nas concentrações de alguns sais de macronutrientes e micronutrientes (Tabela 3) (Monteiro et al., 2000).

Portanto, as fontes de sais MS e MSM e o aumento na concentração de sacarose foram eficientes para o crescimento *in vitro* das famílias de irmãos completos F91, F89 e F84 obtidos do cruzamento entre *P. edulis* e *P. setacea*, da cultivar 'UENF Rio Dourado' (*Passiflora edulis*), da espécie *Passiflora setacea*. As plântulas formadas ao final de 45 dias estavam vigorosas (Figura 6).



Figura 6– Plântulas oriundas da germinação *in vitro* de embriões zigóticos maduros dos genótipos de *Passiflora* (Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* e *P. setacea*), cultivados nos meios de cultivo: $\frac{1}{2}$ MS e 20 g L⁻¹ de sacarose (M1), $\frac{1}{2}$ MS e 30 g L⁻¹ de sacarose (M2), $\frac{1}{2}$ MSM e 20 g L⁻¹ de sacarose (M3) e $\frac{1}{2}$ MSM e 23 g L⁻¹ de sacarose (M4), após 45 dias de cultivo *in vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022.

Parte das mudas oriundas do experimento de crescimento *in vitro* em diferentes fontes de sais minerais e concentrações de sacarose foram aclimatizadas durante 35 dias em casa de vegetação. A análise de variância do experimento de aclimatização de plantas oriundas de embriões zigóticos maduros de maracujazeiro-azedo, demonstrou diferença significativa ($p \leq 0,05$), entre as famílias de irmãos completos avaliadas, com exceção para as variáveis índice fotossintético (PI) e fluorescência da clorofila *a* (Fv/Fm) (Tabela 12). O resultado indica a existência de variabilidade genética na população.

Os coeficientes de variação, para as variáveis Índice de sobrevivência (SBR), Massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), Massa da matéria seca total (MST), Número de folhas (NF), Comprimento da parte aérea (CPA), Comprimento da raiz (CR), SPAD e Fv/Fm apresentaram baixos valores de CV% (17,32%, 29,83%, 28,83%, 10,70%, 15,80%, 17,40%, 14,81% e 3,41%, respectivamente), indicando boa precisão experimental.

Para os caracteres Massa da matéria seca da raiz (MSR) PI apresentaram os altos valores de CV% (36,75% e 33,68%, respectivamente) podem ser explicados pelas diferenças entre as famílias e dispersão dos dados. Portanto, a natureza das observações não é homogênea, o que resulta em um coeficiente maior.

Houve alto percentual de sobrevivência (SBR) das mudas aclimatizadas, não houve diferença significativa para o fator genótipo e para o fator meios de cultivo, também não houve interação significativa (Tabela 12). Resultado semelhante foi observado para a cultivar 'UENF Rio Dourado' (*P. edulis* Sims), que foi obtido 100% de sobrevivência das mudas oriundas do cultivo de embriões zigóticos maduros aclimatizadas (Generoso, 2018).

Na análise de variância das mudas aclimatizadas houve interação significativa entre genótipo e meio de cultivo para MSPA e MST (Tabela 12).

Para as variáveis NF, CPA, CR, MSR, SPAD, houve diferença significativa para genótipo (Tabela 12).

As variáveis Fv/Fm PI não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos (Tabela 12).

Tabela 12. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para as variáveis: porcentagem de sobrevivência (SBR), número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa da matéria seca da parte aérea (MSPA), massa da matéria seca da raiz (MSR) e massa da matéria seca total (MST), intensidade de verde (SPAD), índice fotossintético (PI) e fluorescência da clorofila *a* (Fv/Fm) em função do meio de cultivo e cinco 5 genótipos de *Passiflora* L. (F91, F89, F84, *P. edulis* e *P. setacea*) após 35 dias de aclimatização em casa de vegetação. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

FV	QM					
	GL	SBR	MSPA	MST	NF	CPA
Bloco	3	491,63 ^{ns}	0,0173*	0,0174*	1,324 ^{ns}	11,33 ^{ns}
Genótipo	4	249,1 ^{ns}	0,06798*	0,1271*	6,829*	9790,70*
Meio de cultura	3	137,43 ^{ns}	0,0013 ^{ns}	0,0051*	1,692 ^{ns}	51,66 ^{ns}
Genótipo*Meio	12	269,82 ^{ns}	0,0067*	0,014*	0,505 ^{ns}	457,66 ^{ns}
Resíduo	57	243,68	0,0034	0,0052	0,613	327,89
CV%		17,32	29,83	28,83	10,70	15,80
FV	GL	CR	MSR	SPAD	Fv/Fm	PI
Bloco	3	1161,30*	0,0016*	66,04*	0,0043 ^{ns}	0,0048 ^{ns}
Genótipo	4	7367,75*	0,0135*	229,50*	0,0001 ^{ns}	0,0276 ^{ns}
Meio de cultivo	1	655,00 ^{ns}	0,0003 ^{ns}	23,65 ^{ns}	0,0004 ^{ns}	0,0139 ^{ns}
Genótipo*Meio	4	1124,80 ^{ns}	0,001 ^{ns}	16,45 ^{ns}	0,0009 ^{ns}	0,0431 ^{ns}
Resíduo	27	330,60	0,0005	11,63	0,0006	0,0214
CV%		17,40	36,75	14,81	3,41	33,68

*Significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

^{ns}Não significativo pelo teste F a 5% de probabilidade.

O desdobramento da interação entre genótipo e meio de cultivo para a variável MSPA mostrou que na maior média obtida houve diferença para os meios de cultura em relação ao genótipo F89, que obteve maior média (0,32 g) de MSPA no meio de cultivo $\frac{1}{2}$ MSM + 30 g L⁻¹ de sacarose - M4 e a menor média (0,20 g) no meio de cultivo $\frac{1}{2}$ MS + 30 g L⁻¹ de sacarose - M2, os meios de cultivo: $\frac{1}{2}$ MS + 20 g L⁻¹ de sacarose - M1 e $\frac{1}{2}$ MSM + 20 g L⁻¹ de sacarose - M3, não diferiram. Para o genótipo F89 (0,30 g) o meio de cultivo M1, proporcionou maior média de MSPA em relação ao *P. setacea* (0,08 g). Em M2, F84 (0,29 g) foi superior a *P. edulis* (0,15 g) e *P. setacea* (0,09 g). Em M3, F91 (0,21 g) e F89 (0,25 g) foram superiores a *P. setacea* (0,11 g). E no meio M4, F89 (0,32 g) foi superior a *P. edulis* (0,15 g) e *P. setacea* (0,10 g) (Tabela 13).

Para a variável MST houve diferença entre os meios de cultivo para os genótipos F89 e F84. Para F89 os meios M1 (0,37 g) e M4 (0,42 g) apresentaram

médias superiores a M2 (0,21 g). Para F84 o meio de cultura M2 (0,40 g) proporcionou a maior média de massa seca total, mas não diferiu de M4 (0,34 g). Em relação aos genótipos para cada meio de cultivo: em meio M1, F89, F84 e *P. edulis* tiveram maiores médias de MST em relação à *P. setacea*; em M2 F84 foi maior que *P. edulis* e *P. setacea*; em M3 *P. setacea* teve a menor média em relação à F91 e F89; em M4 *P. setacea* foi inferior a F91, F89 e F84 (Tabela 13).

Tabela 13. Análise de desdobramento das variáveis de vigor: massa da matéria seca da parte aérea (MSPA) e massa da matéria seca total (MST), em função da interação entre genótipos de *Passiflora* (Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* e *P. setacea*) e tipo de meio de cultivo: ½ MS e 20 g L⁻¹ de sacarose (M1), ½ MS e 30 g L⁻¹ de sacarose (M2), ½ MSM e 20 g L⁻¹ de sacarose (M3) e ½ MSM e 23 g L⁻¹ de sacarose (M4), após 35 dias de aclimatização em casa de vegetação. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Genótipos	Matéria seca da parte aérea (g)				
	M1	M2	M3	M4	Média
F91	0,18 bcA	0,23 abA	0,21 abA	0,22 abcA	0,21
F89	0,30 aAB	0,20 abB	0,25 aAB	0,32 aA	0,27
F84	0,20 abA	0,29 aA	0,19 abA	0,25 abA	0,23
<i>P. edulis</i>	0,22 abA	0,15 bcA	0,20 abA	0,15 bcA	0,18
<i>P. setacea</i>	0,08 cA	0,09 cA	0,11 bA	0,10 cA	0,01
Média	0,196	0,192	0,192	0,208	-
Genótipos	Matéria seca total (g)				
	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Média
F91	0,24 abA	0,28 abA	0,28 aA	0,30 abA	0,28
F89	0,37 aA	0,21 bcB	0,32 aAB	0,42 aA	0,33
F84	0,27 aB	0,40 aA	0,27 abB	0,34 aAB	0,32
<i>P. edulis</i>	0,28 aA	0,18 bcA	0,26 abA	0,18 bcA	0,23
<i>P. setacea</i>	0,10 bA	0,10 cA	0,13 bA	0,13 cA	0,12
Média	0,252	0,234	0,252	0,274	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Analisando os efeitos simples para o fator meio de cultivo, não houve diferença significativa para as variáveis relacionadas. Para os efeitos simples do fator genótipo houve diferença para as variáveis. Em relação ao NF e CPA, *P. setacea* obteve maiores médias, foi possível observar que essa espécie tende a alongar mais e formar maior número de folhas que *P. edulis*. (Tabela 14).

Para as variáveis CR e MSR os genótipos F89, F84 e F91 tiveram maiores médias, *P. edulis* não diferiu de F91. Para o fator intensidade de verde a menor média foi obtida por *P. setacea*. O que pode indicar ser uma característica da própria espécie, que na fase de plântula e na aclimatização as folhas apresentaram coloração mais clara em relação a *P. edulis* e os demais genótipos (Tabela 14).

Tabela 14. Médias das variáveis de vigor: número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa da matéria seca da raiz (MSR) e intensidade de verde (SPAD) em função da interação entre genótipos de *Passiflora* (Família 91, Família 89, Família 84, *P. edulis* e *P. setacea*) e tipo de meio de cultivo: ½ MS e 20 g L⁻¹ de sacarose (M1), ½ MS e 30 g L⁻¹ de sacarose (M2), ½ MSM e 20 g L⁻¹ de sacarose (M3) e ½ MSM e 23 g L⁻¹ de sacarose (M4), após 35 dias de aclimatização em casa de vegetação. Campos dos Goytacazes-RJ, 2022

Genótipos	NF	CPA (mm)	CR (mm)	MSR (g)	SPAD
F91	7,49 ab	101,48 b	108,31 ab	0,07 ab	24,46 a
F89	7,04 bc	113,63 b	125,77 a	0,08 a	24,93 a
F84	7,60 ab	97,95 b	119,45 a	0,09 a	24,04 a
<i>P. edulis</i>	6,36 c	102,46 b	97,85 b	0,05 b	25,41 a
<i>P. setacea</i>	8,09 a	157,61 a	71,22 c	0,014 c	16,32 b
Média	7,32	114,63	104,52	0,06	23,03
Meio de cultivo	NF	CPA (mm)	CR (mm)	MSR (g)	SPAD
M1	7,49 a	114,43 a	97,55 a	0,055 a	23,44 a
M2	6,89 a	114,77 a	105,94 a	0,062 a	23,71 a
M3	7,35 a	112,69 a	103,27 a	0,060 a	21,41 a
M4	7,53 a	116,61 a	111,31 a	0,064 a	23,58 a
Média	7,32	114,63	104,52	0,06	23,03

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

As concentrações de sacarose e fontes de sais do cultivo *in vitro* não influenciaram o desenvolvimento das plantas na fase de aclimatização. Houve apenas influência nas características MSPA e MST em poucos genótipos. Portanto, as diferenças observadas estão predominantemente ligadas ao genótipo. Segundo Marin e Gella (1987), no cultivo *in vitro* as plantas perdem a capacidade de assimilação natural de nutrientes e de carbono, sendo necessário fornecer esses

elementos no meio de cultivo, mas quando são aclimatizadas passam a assimilar os próprios sais minerais do substrato e o carbono atmosférico.

O índice SPAD, é um método utilizado que faz o diagnóstico rápido e não destrutivo do conteúdo para determinar o teor de nitrogênio das culturas, é um elemento relacionado à produtividade vegetal (Porto et al., 2014). Há na literatura ensaios que mensuram a concentração de clorofila para maracujazeiro-azedo (Morgado et al., 2011; Miyake et al., 2017). Dessa forma é possível relacionar que a menor média de SPAD para *P. setacea* se relaciona com as menores médias nas taxas de acumulação de matéria seca da parte aérea, da raiz e total (Tabela 13 e Tabela 14). Também é possível afirmar que os genótipos testados F91, F89 e F84 possuem características mais parecidas com *P. edulis*.

De modo geral, os sais $\frac{1}{2}$ MS e $\frac{1}{2}$ MSM acrescidos de 30 g L^{-1} de sacarose foram os meios de cultura mais satisfatórios para o crescimento *in vitro* e aclimatização das famílias de irmãos completos F91, F89 e F84 obtidos do cruzamento entre *P. edulis* e *P. setacea*, da cultivar 'UENF Rio Dourado' (*Passiflora edulis*) e da espécie *Passiflora setacea*.

6. CONCLUSÕES

Para a germinação *in vitro* das famílias de irmãos completos obtidos do cruzamento entre *P. edulis* e *P. setacea*, da cultivar UENF Rio Dourado (*Passiflora edulis*) e da espécie *Passiflora setacea* é indicado o uso de embriões zigóticos maduros, usando meio de cultivo com metade da concentração dos sais minerais de MS ou MSM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose para garantir a germinação de plântulas normais e vigorosas e para a redução no período de obtenção de plântulas. Para o crescimento das plântulas *in vitro* oriundas do cultivo de embriões, é indicado o uso de sais minerais de MS ou MSM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M.J, Zerbini, F.M, Frecha, R., Rabenstein, F., Stenger, D.C., Valkonen, J.P.T. (2012) Potyviridae. In: King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. (eds.). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 1. ed. London: Elsevier Academic Press, p. 1069-1089.
- Alexandre, R.S., Wágner Júnior, A., Negreiros, J.R.S., Parizzotto, A., Bruckner, C.H. (2004) Germinação de sementes de genótipos de maracujazeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39:1239-1245.
- Alexandre, R.S., Couto, F.A.D., Dias, J.M.M., Otoni, W.C., Cecon, P.R., Gomes, B.S. (2009) Factors affecting *in vitro* germination of passion fruit seeds. *Plant Cell, Culture and Micropropagation*, 5:27-35.
- Antonelli, A., Nylander, J. A.A., Persson, C., Sanmartín, I. (2009) Traçando o impacto do levantamento andino na evolução das plantas neotropicais. *Proceedings of the National Academy Sciences*, 106: 9749-9754.
- Antonelli, A., Sanmartín, I. (2011) Por que existem tantas espécies de plantas nos Neotrópicos? *Taxon*, 60:403-414.
- Araújo, L.S., Carvalho, V.S., Generoso, A.L., Santana, J.G.S., Campbel, G., Walter, R., Cunha, M. da. (2022) BA and TDZ in the morphogenesis *in vitro* of *Passiflora setacea*. *Research Square*, 1:1-13.

- Ataíde, E.M., Oliveira, J.C de., Ruggiero, C. (2012) Florescimento e frutificação do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea* D.C cultivado em Jaboticabal, SP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34:377-381.
- Bernacci, L.C., Meletti, L.M.M., Soaresscott, M.D., Passos, I.R.S. (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.D.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*, 30:566-576.
- Bernacci, L.C., Cervi, A.C., Milward-de-Azevedo, M.A., Nunes, T.S., Imig, D.C., Mezzonato, A.C. (2015) Lista de Espécies da Flora do BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available via DIALOG. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB182>>.
- Bernal-Moreno, S.C., Duarte Rodríguez, L.C., Bohórquez Quintero, M. de. Los. A; Johanna Araque, E., Constantino Pacheco, J. (2018) Embryogenesis in *Passiflora maliformis*. *Revista Peruana de Biología*, 25:281-290.
- BFG - The Brazil Flora Group (2018) Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). *Rodriguésia*, 1513-1527.
- Bolhàr-Nordenkamph, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Schreiber, U., Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*, 3:497-514.
- Borges, K. F., Milward-de-Azevedo, M. A. (2017) Passifloraceae sensu stricto do Parque Estadual Cachoeira da Fumaça, Espírito Santo, Brasil. *Rodriguésia*, 1939-1949.

- Borges, K.F., Milward-de-Azevedo, M.A. (2020) Passifloraceae sensu stricto de Parque Estadual Cachoeira da Fumaça, Espírito Santo Brasil. *Rodriguésia*, 68:1939-1949.
- Brasil. (2009) Regras para análise de sementes/ Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS, 399 p.
- Bruckner, C.H., Casali, V.W.D., Moraes, C.F., Regazzi, A.J., Silva, E.A.M. (1995) Self-incompatibility in passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). *Acta Horticulture*. 370:45-57.
- Caldas, L. S., Haridasan, P. Ferreira, M. E. (1998) Meios nutritivos. In: Torres, A. C., Caldas, L. S., Buso, J. A. (eds.). *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas* vol. 1. Brasília: Embrapa, p. 87-132.
- Carrer, H., Barbosa, A.L., Ramiro, D.A. (2010) Biotecnologia na agricultura. *Estudos Avançados*, 24:149-164.
- Carvalho, J.M.F. C., Araújo, S. De S. (2007) *Aplicação do cultivo de embrião zigótico ou imaturo, no melhoramento vegetal*. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão (Documentos nº 170). 35 p.
- Carvalho, A.C.P.P., Torres, A.C., Braga, E.J.B., Lemos, E.E.P.De., Souza, F.V.D., Peters, J.A., Willadino, L., Câmara, T.R. (2011) Glossário de cultura de tecidos de plantas. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, 7:30-60.
- Carvalho, NM, Nakagawa, J., (2012). *Sementes: ciência, tecnologia e produção*, 5 ed. Funep, 590p.
- Castillo, N.R., Melgarejo, L.M., Blair, M.W. (2020) Seed structural variability and germination capacity in *Passiflora edulis* Sims f. *Edulis*. *Frontiers in Plant Science*, 11:498.
- Castro, J.P.D., Araújo, E.R., Rêgo, M.M.D., Rêgo, E.R.D. (2011) *In vitro* germination and disinfestation of sweet cactus (*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dyck). *Acta Scientiarum, Agronomy*, 33:509-512.
- Cervi, C.A. (1997) Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora*. *FontQuerria*, 45:1-92.

- Cervi, A. C., Rodrigues, W. A. (2010) Nomenclatural and taxonomic review of Passifloraceae species illustrated and described by Vellozo in Flora Fluminensis. *Acta Botanica Brasilica.*, 1109-1111
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Jesus, O.N., Santos, E.S.L., Corrêa, R.X., Souza, A.P. (2014) Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. *International Journal Molecular Sciences*, 15:14122-14152.
- Cerqueira-Silva, C.B.M., Jesus, O.N., Oliveira, E.J., Santos, E.S.L., Souza, A.P. (2015) Characterization and selection of passion fruit (yellow and purple) accessions based on molecular markers and disease reactions for use in breeding programs. *Euphytica*, 202:345–359.
- Cerqueira-Silva C.B.M., Faleiro, F.G., Jesus, O.N.de, Santos, E.S.L. dos S., Souza, A.P. de S. (2018) Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Breeding *In*: Al-Khayri, J.M., Jain, S.M., Johnson, D.V. *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits*, 3:1-23.
- Costa, E.C.S., Nunes, T.S., Melo, J.I.M.D. (2015) Flora of Paraíba state, Brazil: Passifloraceae *sensu stricto*. *Rodriguésia*, 66:271-284.
- Costa, A.P., Nogueira, I., Peixoto, J.R., Blum, L.E.B., Vilela, M.S., Vendrame, W. (2018) Reaction of yellow passion fruit to passion fruit woodiness disease and to bacterial spot. *Bioscience Journal*, 34:189-196.
- Cunha, M.A.P. da., Barbosa, L.V., Junqueira, N.T.V. (2002) Aspectos botânicos. *In*: Lima, A.A. (eds.) *Maracujá produção: aspectos técnicos*. Embrapa mandioca e Fruticultura Cruz das Almas. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, p.15-24.
- Dornelas, M. C., Vieira, M. L. C. (1994) Tissue culture studies on species of *Passiflora*. *Plant Cell Tissue Organ and Culture*, 36: 211–217.
- Faleiro, G.F., Junqueira, N.T.V., Fávero, A.P., Lopes, M.A. (2008) Pré-melhoramento de plantas: experiências de sucesso. *In*: Faleiro, F. G., Farias Neto, A. L., Ribeiro Junior, W.Q. (eds.). *Pré-melhoramento, melhoramento e pós-melhoramento: estratégias e desafios*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.45-62.

- Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F., Costa, A.M. (2012) *Conservação e caracterização de espécies silvestres de maracujazeiro (Passiflora spp.) e utilização potencial no melhoramento genético, como porta-enxertos, alimentos funcionais, plantas ornamentais e medicinais* - resultados de pesquisa. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados (Documentos, N° 312). 34p.
- Faleiro, F.G., Junqueira, N.T.V., Braga, M.F., Costa, A.M. (2015). *Ações de pesquisa e desenvolvimento para o uso diversificado de espécies comerciais e silvestres de maracujá*. Planaltina DF: Embrapa Cerrados (Documentos, N° 329), 26p.
- Faleiro, G. F., Junqueira, N.T.V. (2016) *Maracujá: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília - DF: Embrapa (Coleção 500 perguntas, 500 respostas), 341p.
- Faleiro, G.F., Junqueira, N.T.V., Junghans, T.G., Jesus, O. N. de., Miranda, D., Otoni, W.C. (2019) Advances in passion fruit (*Passiflora* spp.) propagation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41:e-155.
- Faria, G.A., Oliveira., C.P.M de., Lopes, G.B., Rocha, P.S., Péron, G.M, Sousa, K da S., Garcia, C.K. (2020) Estabelecimento de protocolo para a propagação *in vitro* de *Passiflora caerulea*. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, 9:1-20.
- Ferreira, A.G., Hu, C.Y. (1998) Cultura de Embriões. In: Torres, A. C.; Caldas, L. S.; Buso, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: Embrapa - SPI/Embrapa – CNPH, p. 371-393.
- Fonseca, K.G., Faleiro, F.G., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T.V., Silva, M.S., Bellon, G., Junqueira, K.P., Vaz, C. De F. (2009) Análise da recuperação do genitor recorrente em maracujazeiro-azedo por meio de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 31:145-153.
- Freitas, J.C.O., Viana, A.P., Santos, E.A., Silva, F.H.L, Paiva, C.L., Rodrigues, R., Souza, M.M., Eiras, M. (2015) Genetic basis of the resistance of a passion fruit segregant population to cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV). *Tropical Plant Pathology*, 40:291-297.
- Freitas, J.C. de O., Viana, A.P., Santos, E.A., Paiva, C.L., Silva, F.H. de L., Souza, M.M. (2016) Sour passion fruit breeding: strategy applied to individual selection

- in segregating population of *Passiflora* resistant to cowpea aphid-borne mosaic virus(CABMV). *Scientia Horticulturae*, 211:241–247.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soy bean root cells. *Experimental Cell Research*, 50:151–158.
- Generoso, A.L. (2018). *Conservação e cultivo in vitro de embriões de maracujazeiro-azedo (Passiflora edulis Sims)*. Tese. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 184 p.
- Generoso, A.L., Carvalho, V.S., Walter, R., Campbell, G., Araujo, L.S., Santana, J.G.S., Cunha, M. (2019) Mature-embryo culture in the cryopreservation of passion fruit (*Passiflora edulis Sims*) seeds. *Scientia Horticulturae*, 256:1-6.
- Gonçalves, D. H., Viana, A. P., Santos, E. A., da Costa Preisigke, S., Vidal, R. F., Cavalcante, N. R. (2021) Prospecting on *Passiflora* back cross families: implications for breeding aiming at CABMV resistance. *Euphytica*, 4: 1-13.
- Gurung, N., Swamy, G.S.K., Sarkar, S.K., Bhutia S.O., Bhutia, K.C. (2014) Studies on seed viability of passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.*). *Journal of Crop and Weed*, 10:484-487.
- IBGE (2021) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes. Rio de Janeiro. Disponível em:<<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/bibliotecacatalogo?view=detalhes&id=76>>.
- Jesus, O.N. de., Faleiro, F.G. (2016) Classificação Botânica e Biodiversidade. In: Faleiro F.G; Junqueira, N.T.V; Braga, M.F. (eds.), *Maracujá: O produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, p.23-31.
- Junghans, T. G., Viana, A. J. C., Junghans, D. T. (2006) Germinação *in vitro* e *ex vitro* de sementes de maracujá gibertii com e sem tegumento parcialmente removido. In: *Congresso Brasileiro de Fruticultura - Cabo Frio*. Anais do Congresso Brasileiro de Fruticultura, p. 191.
- Junqueira, N.T.V., Braga, M.F., Faleiro, F.G., Peixoto, J.R., Bernacci, L.C. (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: Faleiro F.G; Junqueira, N.T.V., Braga M.F. (eds.), *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados,

p.81-108.

- Junqueira, N.T.V., Lage, D.A., Braga, M.F., Peixoto, J.R., Borges, T.A., Andrade, S.R.M. (2006) 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*, 28:97-100.
- Killip E.P. (1938) The American species of Passifloraceae. *Field Museum of Natural History*, Botany Series, 19:1-613.
- Maguire J.D. (1962) Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci*, 2:176–177.
- Marín, J.A., Gella, R. (1987) Acclimatization of the micropropagated cherry rootstock 'Masto de Montañana' (*Prunuscerasus* L.). *Acta Horticulturae*, 212: 603-606.
- Martin, F., Nakasone, H. (1970) The Edible Species of *Passiflora*. *Springer: Economic Botany*, 24:333-343.
- Martins, C.M., Vasconcellos, M.A. da S., Rossetto, C.A.V., Carvalho, M.G. de. (2010) Prospecção fitoquímica do arilo de sementes de maracujá-amarelo e influência em germinação de sementes. *Ciência Rural*, 40:1934- 1940.
- Madureira, H., Pereira, T., Cunha, M., Klein, D., Oliveira, M., Mattos, L., Souza Filho, G. (2014) Self-incompatibility in passionfruit: cellular responses in incompatible pollinations. *Biologia*, 69:574-584
- Meletti, L.M.M. (1996) *Maracujá: produção e comercialização em São Paulo*. Campinas, SP: Instituto Agrônômico, (Boletim Técnico, Nº 158), 26 p.
- Meletti, L.M.M., Soares-Scott, M.D., Bernacci, L.C., Martins, F.P. (1997) Caracterização de germoplasma de *Passiflora*, *P. amethystina*, *P. cincinnata*. In: *Simpósio Latino Americano De Recursos Genéticos Vegetais*, Campinas – SP: Aais. Campinas, UNICAMP, p.73-74.
- 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., Braga, M.F. (eds.) *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 55-78.
- Meletti, L.M.M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira*

- de Fruticultura*, 33:83-91.
- Monteiro, A.C.B.A., Higashi, E.N., Gonçalves, A.N., Rodriguez, A.P.M. (2000) A novel approach for the definition of their organic médium components for micropropagation of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 36:527-531.
- Morgado, M.A.D.; Fialho, G.S.; Bruckner, C.H., Melo, L.A (2011). Non-destructive estimation of chlorophyll content in yellow passion fruit leaves. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 1:74-78.
- Morgado, M.A.D.O., Bruckner, C.H., Rosado, L.D.S., Santos, C.E.M. dos. (2015) Desenvolvimento de mudas de maracujazeiro-azedo enxertadas em espécies silvestres de *Passiflora*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37:471- 479.
- Morley-Bunker, M. J. S. (1980) Seed coat dormancy in *Passiflora* species. *Annual Journal Royal New Zealand Institute of Horticulture*, 8: 72-84.
- Miyake, R.T.M., Creste, J.E., Narita, N., Guerra, W.E.X (2017). Substrato e adubação nitrogenada na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo em condições protegidas. *Colloquium Agrariae*, 13:57-65.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with to bacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:437-497.
- Nascimento, A.V.S., Santana, E.N., Braz, A.S.K., Alfenas, P. F., Pio-Ribeiro, G., Andrade, G.P., Carvalho, M.G., Zerbini, F.M. (2006) *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is wide spread in passion fruit in Brazil and causes passion fruit woodiness disease. *Archives of Virology*, 151:1797-1809.
- Nunes, T.S.; Queiroz, L.P. (2006) Flora da Bahia: Passifloraceae. *Sitientibus*, Série Ciências Biológicas 6:194-226.
- Pádua, J.G., Schwingel, L.C., Mundim, R.C., Salomão, A.N., José, S.C.B.R. (2011) Germinação de sementes de *Passiflora setacea* e dormência induzida pelo armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 33:080-085.
- Pacheco, G., Simão, M.J., Vianna, M.G., Garcia, R.O., Vieira, M.L.C., Mansur, E. (2016) *In vitro* conservation of *Passiflora* - A review. *Scientia Horticulturae*, 211:305-311.

- Passiflora in Flora Do Brasil. (2020). Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/o?id=FB12506>>. Acesso em: 19 Fev. 2021
- Peçanha, A.L. (2010) *Metabolismo fotossintético, crescimento e estado nutricional do mamoeiro (Caricacapaya L.) em resposta a condutividade elétrica da solução de cultivo*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 131p.
- Pereira, J.E.S., Maciel, T. M. S., Costa, F.H.D.S., Pereira, M.A.A. (2006) Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryumulei*). *Ciência e Agrotecnologia*, 30: 251–256.
- Pinto, P.H.D., Peixoto, J.R., Junqueira, N.T.V., Resende, R. de O., Mattos, J.K.A., Melo, B. (2008) Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (cowpea aphide-borne mosaic virus-CABMV). *Bioscience Journal*, 24:19-26.
- Porto, J.S.; Amorim, Y.F.; Rebouças, T.N.H.; Lemos, O.L.; Luz, J.M.Q.; Costa, R.Q (2014). Índice SPAD e crescimento do tomateiro em função de diferentes fontes e doses de nitrogênio. *Scientia Plena*, 11:1-8.
- Preisigke, S.C., Viana, A.P., Santos, E.A., Santos, P.R., Ambrósio, M., Santos, V. O. dos, Silva, F.A. da. (2020a) Individual selection of the first backcross Generation of passion fruit potentially resistant to the fruit woodiness disease. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92.
- Preisigke, S.C., Viana, A.P., Santos, E.A., Santos, P.R., Ambrósio, M., Santos, V. O. dos, Silva, F.A. da., Walter, F.H. de B. (2020b) Selection strategies in a segregating passion fruit population aided by classic and molecular techniques. *Bragantia*, 1: 47-61.
- Raghavan, V. (2003) One hundred years of zygotic embryo culture investigations. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 39: 437–442.
- Rappapot, J. (1954) *In vitro* culture of plant embryos and factors controlling their growth. *The Botanical Review*, 20:201-225.

- Rego, M. M., Rego, E. R., Nattrodt, L. P. A., Finger, F. L., Otoni, W. C. (2014) Evaluation of different methods to overcome *in vitro* seed dormancy from yellow passion fruit. *African Journal Biotechnology*, 13: 3657-3665.
- Rezende, J.A.M. (2006) Práticas culturais para prevenção e convivência com as viroses do maracujazeiro. In: Sampaio, A.C; Fumis, T.F; Rossi, A.D; Almeida, A.M; Garcia, M.J.M. (eds.). *Manejo no controle do vírus do endurecimento dos frutos (PWV) do maracujazeiro*. Jaboticabal - SP: Multipress, p.47-58.
- Sacomán, N.N., Viana, A.P., Carvalho, V.S., Santos, E.A., Rodrigues, R. (2017) Resistance to cowpea aphid-borne mosaic virus *in vitro* germinated genotypes of *Passiflora setacea*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40:e-607.
- Santos, F.C., Ramos, J.D., Pasqual, M., Rezende, J.C de., Santos, F.C., Villa, F. (2010) Micropropagação do maracujazeiro-do-sono. *Revista Ceres*, 571:12-117.
- 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. *Genetics and Molecular Research*, 13:9828–9845.
- Santos, V.A. dos., Ramos, J.D., Chagas, E.A., Dias, M.M., Locatelli, G., Oliveira, M.C.De. (2014b) Grafting of diferente combinations of scions and rootstocks of passion fruit plants. *Semina: Ciências Agrárias*, 35:1201-1208.
- Santos, E.A., Viana, A.P., de Oliveira Freitas, J.C., de Lima e Silva, F.H., Rodrigues, R., & Eiras, M. (2015b) Resistance to cowpea aphid-borne mosaic virus in species and hybrids of *Passiflora*: advances for the control of the passion fruit woodiness disease in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 143:85-98.
- Santos, E.A., Viana, A.P., Freitas, J.C.O., Rodrigues, D.L., Tavares, R.F., Paiva, C.L., Souza, M.M. (2015a) Genotypes election by REML/BLUP methodology in a segregating population from an interspecific *Passiflora spp.* crossing. *Euphytica*. 204: 1-11.
- Santos, C.H.B., Cruz Neto, A.J., Junghans, T.G., Jesus, O.N., Girardi, E.A. (2016) Estádio de maturação de frutos e influência de ácido giberélico na emergência e crescimento de *Passiflora spp.* *Revista Ciência Agronômica*, 481-490.

- Santos, V.A dos., Ramos, D.J., Laredo, R.R., Silva, F.O dos R., Chagas, E.A., Pasqual, M. (2017) Produção e qualidade de frutos de maracujazeiro-amarelo provenientes do cultivo com mudas em diferentes idades. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. 16:33-40.
- Santos, V.O. dos, Viana, A.P., Preisigke, S. da C, Santos, E.A. (2019). Backcrosses in a segregating population of *Passiflora* mediated by morphoagronomic and resistance traits. *Bragantia*, 4: 542-552.
- Silva, V. S. (2002). *Regeneração in vitro de embriões de Cocos nucifera L. Dissertação*. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 78 p.
- Silva, M.G. de M., Viana, A.P., Gonçalves, G.M., Júnior, A.T. do A., Pereira, M.G (2009) Seleção recorrente intrapopulacional no maracujazeiro-amarelo: alternativa de capitalização de ganhos genéticos. *Ciência e Agrotecnologia*, 33:170-176.
- Silva, M. dos S., Silva, R.P. da., Souza, A.V.L. da., Xavier, Y.P.M., Oliveira, A.C. de., Coqueiro, D.S.O. (2016) Aplicação exógena do ácido salicílico em maracujazeiro-amarelo para o controle do vírus do endurecimento dos frutos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 83:1-7.
- Silva-Neto, S.P., Andrade, S.R.M. (2011) Cultura de tecidos vegetais: princípios e aplicações. In: Faleiro, F.G., Andrade, S.R.M., Reis Júnior, F.B. (eds.) *Biotechnology: estado da arte e aplicações na agropecuária*, Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, p.409-434.
- Silva, A.L. da., Hilst, P.C., Dias, D.C.F. dos S., Rogalski, M. (2019) Superação da dormência de sementes de *Passiflora elegans* Mast. (Passifloraceae). *Revista Verde da Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 14:406-411.
- Silva, N.T. da., Silva, L.A.S., Reis, A.C., Machado, M., De Matos, E.M., Viccini, L.F., Da Silva, M.L. (2020) Endosperm culture: a facile and eficiente biotechnological tool to generate passion fruit (*Passiflora cincinnata* Mast.) triploid plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142:613-624.
- Sozo, E.S., Cruz, D.C., Pereira, I.M. da C., Wolfart., M., Ramlov, F., Montagner, D.F., Maraschin, M., Viana, A.M. (2016) Cultura *in vitro* e análise fitoquímica de

- Passiflora tenuifila* Killip e *Passiflora setacea* DC. (Passifloraceae). In: Jain S. (eds) *Protocolos para Culturas In vitro e Análise de Metabólitos Secundários de Plantas Aromáticas e Medicinais*, 2 ed. Methods in Molecular Biology, v.1391. Humana Press, Nova York, p.13-30.
- Suassuna, T.M.F., Bruckner, C.H., Carvalho, C.R., Borém, A. (2003) Self-incompatibility in passionfruit: evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theoretical and Applied Genetics*.106:298-302.
- Torres Netto, A. (2005) *Atributos fisiológicos e relações hídricas em genótipos de mamoeiro (Caricapapaya L.) na fase juvenil*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. 116p.
- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J.G., Yamanishi, O.K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14:203-210.
- Ulmer, T., Macdougall, J.M. (2004) *Passiflora: Passion flowers of the World*. 430p.
- Van Der Plank, J.E. (1963) *Plant diseases: epidemics and control*. New York: *Academic Press*. 349p.
- Viana, A. P., Silva, F. H. L., Gonçalves, G. M., Silva, M. G. M., Ferreira, R. F., 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 and Applied Biotechnology*, 16:250-253.
- Viana, M.L., Faleiro, F.G., Oliveira, J. da S., Viana, C.G., Junqueira, N.T.V. (2019) Potencial de enraizamento de diferentes acessos silvestres e comerciais de *Passiflora* spp. *Magistra*, 30:286-295.
- Vidal, R.F., Viana, A.P., Preisigke, S. da C., Cavalcante, N. R., Gonçalves Junior, D.H., Mendes, D.S. (2021) Evaluation of resistance to cowpea aphid-borne mosaic virus in passion fruit backcrosses for recurrent selection and development of resistant cultivars. *Genetics and Molecular Research*. 20:1-15

- Vieira, L.M., Ribeiro, L.M., Pereira, W.V.S., Mercadame-Simões, M.O. (2011) Avaliações anatômicas em caules de espécies de maracujazeiros utilizados como porta-enxertos na microenxertia. *Revista Científica Unimontes*, 1:57-62.
- Walter, R., Carvalho, V.S., Generoso, A.L., Campbell, G., Cunha, M., Rodrigues, R. (2019) Overcoming post-zygotic hybridization barriers in *Capsicum annuum* var. *annuum*. *Scientia Horticulturae*, 246:227-236.
- Watson, D.P., Bowers, F.A.I. (1965) Long days produce flowers on passion fruit. *Farm Science*, 14:3-5.
- Wurdach, K.J., Davis, C.C. (2009) Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *American Journal of Botany*. 96:1551-1570.