

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR



CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA, MOLECULAR,  
MORFOLÓGICA E REPRODUTIVA DE *Passiflora capsularis*  
LINN E *Passiflora rubra* LINN

JULIANE DOS SANTOS AMORIM

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

Fevereiro de 2009

JULIANE DOS SANTOS AMORIM

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA, MOLECULAR, MORFOLÓGICA E  
REPRODUTIVA DE *Passiflora capsularis* LINN E *Passiflora rubra* LINN

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular.

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

Fevereiro de 2009

JULIANE DOS SANTOS AMORIM

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA, MOLECULAR, MORFOLÓGICA E  
REPRODUTIVA DE *Passiflora capsularis* LINN E *Passiflora rubra* LINN

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Área de Concentração:** Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: 16 de fevereiro de 2009

Prof. Dra. Telma Nair Santana Pereira

(UENF)

Prof. Dr. Armando Carlos Cervi

(UFPR)

Prof. Dr. Ronan Xavier Corrêa

(UESC)

Prof. Dra. Margarete Magalhães de Souza

(UESC - Orientadora)

Aos meus pais, *Rosário e Juscelita*, pelo exemplo de vida e por serem os melhores pais que eu poderia ter, e a minha irmã *Josiane*, que nunca mediu esforços e incentivos para que todos os meus anseios e objetivos pudessem ser alcançados

## **DEDICO**

## **AGRADECIMENTO**

A DEUS, pelo mais belo dos presentes, a vida.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pela realização de minha formação profissional, ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela oportunidade concedida, e por alguns dos melhores anos de minha vida.

Agradeço a todas as pessoas que, de forma direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, especialmente:

À Prof. Dra. Margarete Magalhães de Souza, pela orientação, pelo apoio, confiança, paciência e incentivo na realização desse projeto e acima de tudo pelo exemplo de profissional que é.

Aos meus co-orientadores Dra. Ioná Santos Araújo e Dr. Dário Anhert, pelo apoio e orientação, e pela cordialidade com a qual sempre me atenderam quando precisei de auxílio.

Aos pesquisadores Dr. Luís Carlos Bernacci, Dr. Armando Carlos Cervi pela identificação taxonômica do material botânico, e ao Dr. Vitor Osmar Becker, pela permissão de coleta na reserva RPPN Serra Bonita, Camacan – BA.

Aos técnicos do Laboratório de Citogenética e do Centro de Biotecnologia e Genética, pelo apoio recebido.

Aos funcionários da Universidade Estadual de Santa Cruz e deste programa de pós-graduação, em especial a Luciana Calazans e Lúcia, pela amizade e pelo carinho no atendimento.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial Leandro, Fernanda, Cristina, Martin, Dário, e Ronan, pelos ensinamentos e pela convivência harmoniosa durante este período.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

As quatro pessoas mais importantes da minha vida, que amo incondicionalmente, meu pai Rosário, minha mãe Juscelita, minha irmã Josiane e meu sobrinho Felipe, pelo incentivo, confiança, amizade e por tudo que significam para mim, vocês são meu porto seguro, essa conquista não é somente minha, mas de vocês família, obrigada.

A família que eu pude escolher (meus amigos) Carlos Bernard, Ângela, Drika, Elisa, Beth, Gabi, Karin, Tahíse, Dayane, Dani, Braz, Sizenando, Cristiano, Igor, Tia Zeli, Thiago e em especial ao meu amigo-irmão Américo pelos momentos de descontração, pela agradável convivência, amizade, conselhos, broncas, sugestões, paciência, companhia e por todo auxílio prestado no desenvolvimento do projeto.

Aos amigos de Itabuna e Ilhéus “Salobrinho”, em especial a Luciano, Maurício, Robson, Liane, Raquel, Lucas, Ramon, Hugo e Alex, que conheci durante este período importante de minha vida e que de alguma maneira contribuíram para este trabalho, obrigada pela compreensão, incentivo e confiança.

Aos colegas de Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular Aplicada, Priscilla, Vilminha, Vanderly, Olívia, Cínthia, Grazi, Sheila, Daniella, Samuel, Tony, Isamires, pelo apoio.

Ao amigos que fazem parte do Grupo de Pesquisa PASSIFLORA, Dr. Léo Duc Haa Carson Schwartzaupt da Conceição, Jôsie, Eileen, Gabi, Pablíane, Marla, Thalíne, Paulo Sérgio, Abel, a IC Jr. Cleonice, a ajuda de vocês em campo e nas coletas foram essenciais.

Aos amigos que deixei em Paranaíba, Vanclei, Jeise, Fabi, Jú, Maykon, Jean, Aline, que não estiveram fisicamente próximos, mas que de alguma forma contribuíram para este trabalho e em especial minha grande amiga de graduação Gislaine, pelo apoio quando cheguei aqui e incentivo inicial.

À professora Dr. Mariza Barion Romagnolo, minha primeira orientadora, obrigada pela amizade, estímulo e confiança, que muito contribuiu para minha formação científica.

“A todos, obrigada por tornar concreto, mais um passo para minhas realizações”.

Amar o perdido  
deixa confundido  
este coração.

Nada pode o olvido  
contra o sem sentido  
apelo do Não.

As coisas tangíveis  
tornam-se insensíveis  
à palma da mão

Mas as coisas findas  
muito mais que lindas,  
essas ficarão.

*Carlos Drummond de Andrade*

## ÍNDICE

EXTRATO.....	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	5
<b>CAPÍTULO 1: Estudos citogenéticos, moleculares e morfológicos como estratégia para delimitação entre <i>Passiflora capsularis</i> LINN e <i>Passiflora rubra</i> LINN.....</b>	<b>24</b>
Resumo.....	24
Abstract.....	26
1. Introdução.....	27
2. Material e Métodos.....	30
3. Resultados.....	35
4. Discussão.....	48
5. Conclusão.....	56
6. Agradecimentos.....	56
7. Referências Bibliográficas.....	57



<b>CAPÍTULO 2: Caracterização do sistema reprodutivo de <i>Passiflora capsularis</i> LINN e <i>Passiflora rubra</i> LINN. ....</b>	<b>62</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>62</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>64</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>65</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>67</b>
<b>3. Resultados.....</b>	<b>70</b>
<b>4. Discussão.....</b>	<b>75</b>
<b>5. Conclusão.....</b>	<b>81</b>
<b>6. Agradecimentos.....</b>	<b>81</b>
<b>4. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>82</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>88</b>
<b>REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....</b>	<b>89</b>

## EXTRATO

AMORIM, Juliane dos Santos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2009. Caracterização citogenética, molecular, morfológica e reprodutiva de *Passiflora capsularis* LINN e *Passiflora rubra* LINN. Orientadora: Margarete Magalhães de Souza. Co-orientadores: Ioná Santos Araújo e Dário Ahnert. Colaborador: Ronan Xavier Corrêa.

*Passiflora capsularis* Linn. e *Passiflora rubra* Linn. ( $2n = 12$ ), família *Passifloraceae*, são plantas nativas do Brasil, apresentadas como bons genitores para programa de melhoramento visando à obtenção de híbridos ornamentais, por possuírem flores pequenas e abundantes, além de folhagens e frutos favoráveis à ornamentação. Morfológicamente, são espécies bastante similares, diferenciando-se taxonomicamente apenas na cor do fruto e pilosidade do ovário. Neste trabalho foram realizadas análises citogenéticas, moleculares, morfológicas e reprodutivas em *P. capsularis* Linn. e *P. rubra* Linn. com o objetivo de delimitá-las e indicá-las em programas de melhoramento genético de híbridos ornamentais. As características cariomorfológicas observadas estão de acordo com o descrito para alguns taxa do gênero *Passiflora*. Seus cariótipos apresentam  $2n = 12$ , com 8 cromossomos metacêntricos, 4 submetacêntricos, e presença de satélite no braço longo do segundo par cromossômico para ambas as espécies. O comprimento médio dos cromossomos foi de 2,77 e 2,66  $\mu\text{m}$ , e a razão média entre os braços foi de 1,38 e 1,39  $\mu\text{m}$  para *P. rubra* e *P. capsularis*, respectivamente. Quanto às características

morfológicas, foram avaliados os aspectos foliares, e caracteres dos frutos, sementes e pólen. Para a análise de agrupamento baseado nos descritores morfológicos e polínicos citados, classificado segundo a distância de Mahalanobis pelo método de UPGMA e Ward, não se obteve uma nítida separação entre os genótipos de *P. capsularis* e *P. rubra*, que foi subsidiado pelo alto índice de correlação cofenética (0,96), confirmando a eficiência destes descritores para a classificação das espécies. Utilizando a ferramenta da biologia molecular para corroborar com os dados citogenéticos e morfológicos, optou-se por marcadores microssatélites, que amplificam bandas via PCR. Dos 12 primers testados, sete amplificaram para ambas as espécies, porém, todas foram monomórficas. Para os estudos de biologia da reprodução, utilizou-se as metodologias de polinização in vivo, germinação in vitro e razão pólen:óvulo (P:O). Nas autopolinizações, *P. capsularis* apresentou a média de 62,5% de fertilizações, enquanto *P. rubra* apresentou a média de 67,18%, mostrando-se autocompatível, categorizando-a como autógama. Nos cruzamentos interespecíficos tendo *P. rubra* como doadora de grãos de pólen, a taxa de fertilização observada foi de 68,77%, já nos cruzamentos tendo *P. capsularis* como doadora de grãos de pólen observou-se a taxa de fertilização de 62,5%. Para o teste de germinação in vitro obteve-se a taxa de 52,17% e 64,20% de germinação para *P. capsularis* e *P. rubra*, respectivamente. Na razão P:O fez-se a contagem de óvulos por ovário e grãos de pólen por antera, obtendo-se a razão de 27,42 para *P. capsularis* e 22,51 para *P. rubra*, que as inclui na categoria de autógama obrigatória. Os dados citogenéticos, morfológicos, moleculares e reprodutivos possibilitaram uma melhor caracterização taxonômica para as espécies, e permitiram inferir que, embora *P. capsularis* e *P. rubra* possuam algumas características fenotípicas diferentes, ambas podem se tratar de uma mesma espécie, sendo essa diferença categorizada em variedade dentro da espécie, devendo ser duas formas botânicas. Assim inferimos que *P. capsularis* e *P. rubra* não foram separadas, taxonomicamente, como espécies diferentes com base nas características analisadas.

Palavras-chave: Passifloraceae, maracujazeiros silvestres, *Passiflora capsularis*, *Passiflora rubra*, delimitação entre espécies.

## ABSTRACT

AMORIM, Juliane dos Santos, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, fevereiro de 2009. Cytogenetic characterization, molecular, morphological and reproductive of *Passiflora capsularis* LINN and *Passiflora rubra* LINN. Advisor: Margarete Magalhães de Souza. Advisor Committee Members: Ioná Santos Araújo, Dário Ahnert. Collaborator: Ronan Xavier Corrêa.

*Passiflora capsularis* Linn. and *Passiflora rubra* Linn. ( $2n = 12$ ), family Passifloraceae, are native plants of Brazil, presented as good parents for breeding program aimed at obtaining ornamental hybrids, due to small and abundant flowers, and foliage and fruit pro-ornamentation. Morphologically, species are very similar, differing only taxonomically is the color of the fruit and pubescence of the ovary. This work was performed cytogenetic analysis, molecular, morphological and reproductive in *P. capsularis* Linn. and *P. rubra* Linn. aiming to delimit them, enter them in genetic improvement programs for ornamental hybrids. Cariomorfológicas features observed are in agreement with that described for some taxa of the genus *Passiflora*. Their karyotypes have  $2n = 12$ , with 8 chromosomes metacentric, 4 submetacentric, and the presence of satellite on the long arm of the second chromosome pair for both species. The average length of chromosomes was 2.77 and 2.66  $\mu\text{m}$ , and the average ratio between the arms was 1.38 and 1.39  $\mu\text{m}$  for *P. rubra* and *P. capsularis*, respectively. On the morphological characteristics were evaluated aspects leaf, and characters of the fruit, seeds and pollen. For the cluster analysis based on morphological descriptors and pollen cited, classified according to the distance of

Mahalanobis by the method of UPGMA and Ward is not obtained a clear separation between the genotypes of *P. capsularis* and *P. rubra*, which was subsidized by the high correlation coefficient (0.96), confirming the efficiency of these descriptors for the classification of species. Using the tools of molecular biology to support the cytogenetic and morphological data, we chose microsatellite markers, which amplify via PCR bands. Of the 12 primers tested, seven amplified for both species, but all were monomorphic. For the study of biology of reproduction, using the methods of pollination in vivo, in vitro germination and rate pollen:ovule (P:O). In the self-pollination, *P. capsularis* showed an average of 62.5% of fertilizations, while *P. rubra* had an average of 67.18% being self-compatible, categorizing it as autogamic. In interspecific crosses with *P. rubra* as donor of pollen grains, the rate of fertilization was observed in 68.77%, already in the crosses with *P. capsularis* as donor of pollen grains was observed in the fertilization rate of 62.5%. For the germination test in vitro were obtained by the rate of 52.17% and 64.20% germination for *P. capsularis* and *P. rubra*, respectively. In The ratio P:O were counted eggs per ovary and pollen grains per anther, yielding a ratio of 27.42 for *P. capsularis* and 22.51 for *P. rubra*, which includes the category of autogamic mandatory. Data cytogenetic, morphological, molecular and reproductive allowed a better characterization taxonomic for the species, and have inferred that, although *P. capsularis* and *P. rubra* some phenotypic characteristics are different, both can handle the same species, that difference being categorized in variety within species, should be two botanical forms. Well infer that *P. capsularis* and *P. rubra* were not separated, taxonomically, as different species based on the analyzed characteristics.

Key-words: Passifloraceae, passion fruit wild, *Passiflora capsularis*, *Passiflora rubra*, delimitation between species.

## 1. INTRODUÇÃO

A família Passifloraceae Juss. está incluída na ordem Malpighiales (MILWARD-DE-AZEVEDO, BAUMGRATZ, 2004), sendo dividida em duas tribos, *Paropsieae* e *Passiflorieae*. Essa última está representada no continente latino-americano por quatro gêneros: *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. (CERVI, 2005). Compreende 19 gêneros (BERNACCI, 2003) dispersos em várias partes do globo terrestre, como a África, Ásia, Ilhas do Pacífico Sul, Nova Guiné e Nova Zelândia. *Passiflora* L. é o gênero mais importante da família. No Brasil ocorrem quatro gêneros de Passifloraceae: *Mitostemma*, *Dilkea*, *Tetrastylis* e *Passiflora*, que apresentam a seguinte distribuição geográfica: *Dilkea*, no Amazonas e Pará; *Tetrastylis*, na Bahia, Minas Gerais e Rio de Janeiro; *Mitostemma*, Mato Grosso, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul e *Passiflora*, em todo o país, sendo o gênero mais freqüente registrado em Santa Catarina (REITZ, 1980).

Os maracujás pertencem ao gênero *Passiflora* L. Segundo Cervi (2005), o gênero comporta cerca de 520 espécies, porém novas espécies têm sido descobertas (CERVI, 2006; NUNES, QUEIROZ, 2007). As espécies de *Passiflora* estão distribuídas na flora das regiões tropicais das Américas, do Sul dos EUA até o Brasil. São plantas herbáceas ou lenhosas, às vezes trepadeiras, importantes por seus frutos comestíveis e por suas propriedades terapêuticas (BARBOSA, 2006). Sabe-se que o Brasil possui uma condição privilegiada quanto aos recursos

genéticos de *Passiflora* L., uma vez que o maior centro de dispersão geográfica dessas frutíferas localiza-se no Centro-Norte do país (SOUSA, MELETTI, 1997).

Apesar do nome popular aplicado a todas as espécies de *Passiflora*, apenas duas são cultivadas comercialmente para a produção dos frutos: *Passiflora alata* Dryander (maracujá-doce) e *Passiflora edulis* Sims (maracujá-azedo). O nome Maracujá é de origem indígena, das tribos Tupi e Guarani, e deriva de “murukuia”, significando “alimento em forma de cuia”. O homem utiliza o maracujazeiro de maneiras diversificadas. As espécies são cultivadas por suas características alimentícias, ornamentais e medicinais. O uso principal do maracujá está na alimentação humana, em forma de sucos, doces, sorvetes e licores. O valor ornamental é conferido pelas belas flores e por suas folhagens, e o valor medicinal, também muito disseminado, é devido às propriedades calmantes da passiflorina, um sedativo natural encontrado nos frutos e nas folhas. É também rico em vitamina C, cálcio e fósforo (MELETTI, 1995; SOUSA, MELETTI, 1997).

Em três décadas, *Passiflora* saltou de um produto comercializado essencialmente *in natura* (década de 70) para uma alternativa agrícola. Hoje, as perspectivas para sua utilização foram ampliadas; a beleza e a estética de suas flores e folhas agregam valor ornamental à planta, que adicionado ao apelo comercial e associado ao significado da flor da paixão, embutem às passifloras a forte possibilidade de se transformarem numa próspera linha de desenvolvimento do agronegócio (PEIXOTO, 2005).

*Passiflora capsularis* e *Passiflora rubra* pertencem ao subgênero *Plectostemma* Mast. e à secção *Xerogona* (Raf.) Killip. São taxonomicamente muito próximas, pois são morfologicamente similares. As folhas de *P. rubra* e *P. capsularis* são tão similares que, na ausência de flores ou frutos, é quase impossível distingui-las. As principais diferenças entre as duas espécies residem no ovário e no fruto. O ovário de *P. rubra* é densamente coberto com pêlos longos que podem ser brancos ou, mas raramente, marrons, os quais geralmente persistem sobre os frutos. Em *P. capsularis*, o ovário é meramente puberulento e os curtos pêlos frequentemente desaparecem no fruto maduro. Os frutos de *P. capsularis* são verdes e sempre mais alongados, enquanto que em *P. rubra* os frutos são rubros e demonstram maior variação em relação ao comprimento e largura, sendo mais obovóides (SOUSA, MELETTI, 1997).

Um instrumento auxiliar que atua na identificação taxonômica é a citogenética. A maioria dos estudos cariológicos apresentam capacidade de reunir espécies em um número menor de táxons, permitindo a avaliação do grau de parentesco pela similaridade entre os indivíduos, análises de híbridos e variabilidade dentro de uma espécie ou táxon (GUERRA, 1988), proporcionando uma análise diversificada ao nível infra-específico (nível que reúne todos os indivíduos capazes de reformular as bases genômicas comum ao grupo) (HANSEN et al., 2006).

O estudo citológico em espécies silvestres é de fundamental importância para o conhecimento da evolução cromossômica do gênero *Passiflora* e da família Passifloraceae, e tais informações podem servir de subsídios para o desenvolvimento de híbridos e para programas de melhoramento genético vegetal. Algumas espécies desse gênero tiveram seu número de cromossomos descritos, e para poucas o cariótipo já foi determinado (MELO et al., 2001; SOUZA et al., 2003). A maioria dos trabalhos com citogenética de *Passifloraceae*, anteriores à década de 90, restringem-se à contagem do número cromossômico. Como ocorre com muitas outras passifloráceas, há a necessidade da realização de maiores estudos para delimitação entre *Passiflora capsularis* e *Passiflora rubra*, utilizando-se metodologias que gerem conhecimentos morfológicos e do genoma.

Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos, em geral fenótipos de fácil identificação visual. Entretanto as características morfológicas e agronômicas têm a desvantagem de serem influenciadas pelos fatores do ambiente e podem não representar a real similaridade ou diferença entre os indivíduos (FERREIRA, GRATTAPAGLIA, 1998). Por outro lado, marcadores genéticos representam estritamente a variação genética, não sofrendo influência ambiental (WEISING et al., 1995).

No momento atual, diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para detecção de variabilidade genética em nível de sequências de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismo genético, permitindo a obtenção de um número ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética, tais como para a análise de divergência genética (CATTANEO, 2001; BARBOSA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004; LABORDA et al., 2005),



melhoramento visando resistência a doenças (SANTOS, 2000), quanto na identificação e mapeamento de QTL (BENTO, 2006), dentre outros usos.

O presente trabalho foi realizado tendo por objetivo caracterizar as espécies *P. capsularis* e *P. rubra* utilizando metodologias citogenéticas, moleculares e morfológicas juntamente com análises reprodutivas intra e interespecíficas, e gerar com esses estudos um melhor entendimento taxonômico entre as espécies para que possam ser utilizadas em programas de melhoramento que envolva hibridação interespecífica na produção de plantas ornamentais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Família Passifloraceae

A família Passifloraceae Juss. está incluída na ordem Malpighiales (MILWARD-DE-AZEVEDO, BAUMGRATZ, 2004), sendo dividida em duas tribos, *Paropsieae* e *Passiflorieae*. Essa última está representada no continente latino-americano por quatro gêneros: *Ancistrothyrus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. (CERVI, 2005). Para todo o mundo são descritos, atualmente, 19 gêneros (BERNACCI, 2003). Diferentes autores têm descrito números divergentes de espécies na família Passifloraceae, a exemplo de Barroso (1978), que apontou 600 espécies pertencentes a esta família. Já Watson e Dallwitz (1992) relatou 530 enquanto Vanderplank (2000) citou 630 espécies. Atualmente são descritas 700 espécies nesta família (FEUILLET, 2004). Apesar desta divergência no número de espécies, tem-se observado que a cada levantamento, o número de espécies incluídas na família Passifloraceae vem aumentando devido à descoberta de novas espécies (CERVI, 2006; NUNES, QUEIROZ, 2007).

A distribuição preferencial das passifloráceas ocorre nos trópicos, mas também habitam em regiões subtropicais, como no norte da Argentina, África do Sul, Austrália, Nova Zelândia, América do Norte e Ásia (VANDERPLANK, 2000; ULMER, MACDOUGAL, 2004). A maioria dos gêneros da tribo *Passifloreae* D.C. tem distribuição preferencial no hemisfério ocidental e os gêneros da tribo *Paropsieae* D.C. têm distribuição preferencial no hemisfério oriental. No entanto, o gênero

*Passiflora* apresenta uma distribuição diferenciada dos outros gêneros da tribo *Passifloreae*, já que, apesar de ser predominantemente americano, apresenta muitas espécies registradas também em áreas do Sul da Ásia, África e Oceania (VANDERPLANK, 2000).

Ocorrem no Brasil quatro gêneros, *Ancistrothysus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Passiflora* L. (NUNES, QUEIROZ, 2006), aproximadamente 140 espécies pertencem ao gênero *Passiflora* (CERVI, 2006). Somente após o ano de 1950, foram publicadas 25 descrições de espécies e sinonimizações. No Estado da Bahia já foram descritas por Nunes e Queiroz (2001, 2007), 14 espécies enquanto que para o Estado do Rio Grande do Sul, são reconhecidas 15 espécies (Mondin 2001), 26 para Santa Catarina (SACCO, 1980), Bernacci e Vitta (1999) descreveram 38 espécies para o Estado de São Paulo, Cervi (1986). Indicou nove para o Estado de Goiás, Farinazzo e Salimena (2007) identificaram 6 espécies de passifloras para o Estado de Minas Gerais.

Os primeiros estudos com a família Passifloraceae iniciaram em 1753 com o pesquisador Linneo (ULMER, MACDOUGAL, 2004). Contudo, a literatura essencial se configuraria mediante a relevante contribuição de pesquisadores brasileiros e estrangeiros, nos séculos XIX e XX, entre os quais faz-se justiça reconhecer o mérito de Velloso (1827, 1831), De Candolle (1828), Masters (1871, 1872), Barbosa Rodrigues (1891), Harms (1893, 1922, 1925, 1929), Usteri (1911), Killip (1924, 1938, 1960) e Uribe-Uribe (1955). Mais recentemente, nos últimos 55 anos, pesquisadores brasileiros têm publicado importantes levantamentos sobre a família Passifloraceae, a exemplo de Bernacci et al. (2003), Bernacci e Vitta (1999), Cervi (1997, 2000, 2004), Milward-de-Azevedo e Baumgratz (2004), Nunes e Queiroz (2001), Pessoa (1994) e Sacco (1980).

De acordo com as descrições de Killip (1938), Joly (1998) e Judd et al. (1999), a família Passifloraceae apresenta plantas herbáceas ou lenhosas, em geral trepadeiras, com gavinhas e nectários extraflorais. Suas folhas são sempre alternas, freqüentemente simples e lobadas, com venação palmada e nectários presentes no pecíolo, às vezes com formas inusitadas, com estípulas. Flores muito vistosas, com ampla gama de cores, e são geralmente bissexuais, de simetria radial, grandes, hermafroditas, cíclicas, diclamídeas, e com um androginóforo bem desenvolvido (*Passiflora*). Sépalas e pétalas em número de cinco, estas muitas vezes

unguiculadas. Corona petalóide fimbriada bem desenvolvida e muito vistosa na flor, sendo usualmente colorida, o que atrai polinizadores. Estames simples, no alto de um androginóforo. Ovário súpero, no ápice do androginóforo, tricarpelar, unilocular, com muitos óvulos de placentação parietal. Estiletos e estigmas em número de três. Fruto, tipo cápsula ou baga, baciforme, indeiscente, com arilos carnosos e coloridos ao redor das sementes, geralmente são dispersos por pássaros. De acordo com Barroso et al. (1999), as sementes são comprimidas lateralmente, com testa reticulada ou mais ou menos verrucosa, arilo funicular, saciforme, composto de células polposas.

## **2.2. Gênero *Passiflora***

O gênero *Passiflora* é o maior da família Passifloraceae, constituído por um grande número de espécies que aumenta em cada ano. Segundo Cervi (2005), o gênero comporta cerca de 520 espécies, porém novas espécies têm sido descobertas (CERVI, 2006; NUNES, QUEIROZ, 2007). A primeira espécie descrita foi *Passiflora incarnata* L., em cujas flores os missionários espanhóis que vieram à América identificaram semelhanças com símbolos da crucificação de Cristo. Essa é a origem da denominação popular “flor-da-paixão”, e científica *Passiflora* (KILLIP, 1938; CERVI, 1997). A planta, de beleza extraordinária pela conformação de suas rubras flores, foi enviada como presente ao Papa Paulo V (1605–1621), que mandou cultivá-la em Roma, divulgando que ela representava uma revelação divina. Diversos escritores da época relacionavam as características físicas de suas flores à “Paixão de Cristo”. Assim, surgiu o nome do seu gênero botânico, *Passiflora*, sendo “passio” equivalente à paixão e “flosoris” o equivalente a flor (SALOMÃO et al., 1987).

As flores de *Passiflora* atraem um grande número de polinizadores como abelhas e vespas, borboletas e mariposas, morcegos e pássaros. Os variados componentes florais estão presentes nos diversos subgêneros, tendo surgido, portanto, mais de uma vez no grupo (MUSCHNER, 2005). As folhas servem de alimento a larvas de borboleta (JUDD et al., 1999). As plantas da família Passifloraceae e, especialmente, do gênero *Passiflora*, são as únicas hospedeiras das larvas das borboletas do gênero *Heliconius* (Lepidoptera: Nymphalidae), sendo muitos destes relacionamentos espécie-específicos (BENSON et al., 1975). Em

função disso, este grupo compõe um sistema modelo de co-evolução entre borboletas e plantas.

Na ampla gama de espécies, existem poucos estudos econômicos que revelem sua importância, seja pela qualidade dos seus frutos, pelo aspecto ornamental ou pelas suas qualidades farmacológicas. Como produtoras de frutos comestíveis, citam-se *P. edulis f. flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo), *P. alata* Curtis (maracujá doce), *P. macrocarpa* (maracujá melão), *P. quadrangularis* L. (maracujá açú), *P. ligularis* Juss (granadilla), *P. laurifolia* L. (maracujá laranja), *P. maliformis* L. (maracujá maçã) e *P. caerulea* L. (maracujá azul) (SALOMÃO et al,1987). Com propriedades medicinais, tem-se *P. foetida* L. (maracujá de cheiro), cujas raízes são anti-espasmódicas e *P. quadrangularis* L. (maracujá açú), que possui raízes com efeito anti-helmínticos. As sementes de algumas espécies, como *P. laurifolia* L., *P. alata* Curtis, *P. edulis* Sims (maracujá roxo), *P. quadrangularis* L., *P. mucronata* Lam. (maracujá pintado) e *P. incarnata* L., quando trituradas também apresentam propriedades anti-helmínticas. Além disso, com propriedades sedativas pode-se citar *P. caerulea* L. e a *P. incarnata* L. (FREITAS, 1987; SALOMÃO et al., 1987).

O gênero também é pouco estudado citologicamente e os trabalhos têm se limitado à contagem do número de cromossomos (MELO et al., 2001), e essa contagem cromossômica ampla foi realizada por Bowden (1945), Beal (1969,1973), Storey (1950), Guerra (1986) e Snow e MacDougal (1993). Muitas espécies silvestres não foram ainda estudadas citologicamente, sendo necessária à realização de estudos cromossômicos para que se possa entender melhor como se desenvolveram as relações filogenéticas e evolutivas entre elas (RAVEN, 1975).

Melo et al. (2001) através da contagem cromossômica divide as espécies de *Passiflora* em quatro grupos: a)  $2n = 12, 24, 36$ ; b)  $2n = 24$ ; c)  $2n = 18, 72$ ; e d)  $2n = 20$ . Porém, ainda há contestação quanto ao número cromossômico básico do gênero, uma vez que Melo et al. (2001) sugeriram  $x = 6$  como número cromossômico básico, com  $x = 9$ ,  $x = 10$  e  $x = 12$  sendo considerados números básicos secundários e Hansen et al. (2006) sugeriram  $x = 12$ , uma vez que  $n = 6$  é encontrado somente no subgênero *Decaloba*, levando a crer que o mesmo originou-se uma única vez, no ancestral direto deste subgênero, descartando a hipótese de  $x = 6$  ser o número cromossômico básico do gênero. Em outros gêneros da família Passifloraceae tem sido registradas contagens cromossômicas de  $n = 11$  e  $n = 12$ , também suportando

a hipótese de  $x = 12$  ser o número básico. Contudo, o número e a localização de sítios 5S e 45S do DNA nuclear ribossomal são consistentes com a hipótese de  $x = 6$  seja o número básico do gênero (MELO, GUERRA, 2003).

### 2.3. Subgênero *Decaloba*

Em 1938, Killip publicou uma complexa proposição de classificação infragenérica para *Passiflora*, dividindo o grupo em 22 subgêneros, compostos por várias seções e séries. Escobar (1989) adicionou mais um subgênero a esta classificação. Em 1994 MacDougal reconheceu a prioridade nomenclatural e o subgênero *Plectostemma* passou a ser conhecido como *Decaloba*.

Como alternativa para estes 23 subgêneros (KILLIP, 1938; ESCOBAR, 1989), Feuillet e MacDougal (2003) sugeriram o agrupamento das espécies de *Passiflora* em apenas quatro subgêneros: *Astrophea* (DC.) Mast., *Deidamioides* (Harms) Killip, *Decaloba* (DC.) Rchb. e *Passiflora*. Estas proposições são baseadas, exclusivamente, em caracteres morfológicos e ecológicos. Trabalhos recentes de sistemática filogenética, utilizando marcadores moleculares, corroboraram total ou parcialmente a nova classificação infragenérica de *Passiflora* (MUSCHNER et al., 2003; YOCKTENG, NADOT 2004; MUSCHNER, 2005; HANSEN et al., 2006). Yockteng e Nadot (2004) reconheceram os quatro subgêneros propostos e sugeriram a manutenção dos subgêneros *Polyanthea*, *Dysosmia* e *Tetrapathea* de Killip (1938). Três dos subgêneros propostos por Feuillet e MacDougal (2003) são fortemente sustentados nas diversas análises realizadas por Muschner et al. (2003) e por Muschner (2005): *Passiflora*, *Decaloba* e *Astrophea*.

Outra evidência significativa da validade dos subgêneros propostos por Feuillet e MacDougal (2003) diz respeito à herança organelar. Muschner et al (2006) investigaram a herança organelar no gênero *Passiflora* através da análise de quatro marcadores plastidiais, um mitocondrial e um nuclear em cinco híbridos interespecíficos (quatro com parentais do subgênero *Passiflora* e um do subgênero *Decaloba*). Todos os genomas mitocondriais apresentaram herança materna. Já a herança do cloroplasto variou de acordo com os subgêneros: nos híbridos derivados de espécies pertencentes ao subgênero *Passiflora*, a herança plastidial é paterna, enquanto no híbrido de espécies do subgênero *Decaloba* as evidências indicam transmissão materna.

*Passiflora* subg. *Decaloba* (DC.) Rchb. é composto por 214 espécies distribuídas nas Américas do Sul e do Norte, no sudeste do continente asiático e na Austrália, elas ocorrem desde o nível do mar até 300 metros de altitude, tem distribuição tropical e subtropical nas Américas, possuindo cerca de 130 espécies arranjadas em oito seções, das quais apenas a seção típica encontra-se dividida em oito séries (FEUILLET, MACDOUGAL, 2003) É caracterizado por inflorescências paucifloras, flores freqüentemente pequenas, brancas ou amareladas, frutos pequenos, hipanto pateliforme ou campanulado, dividido em 10 lobos, corona com uma ou duas séries de filamentos e opérculo plicado (ULMER, MACDOUGAL, 2004). No Brasil, encontramos aproximadamente 20 espécies, distribuídas em quatro seções. As passifloras em estudos estão classificadas na seção *Xerogona* (Raf.) Killip.

A ausência de trabalhos atualizados de revisão abordando todos os táxons desse subgênero tem dificultado um melhor conhecimento da taxonomia do grupo, em virtude do elevado número de espécies, incluindo os numerosos sinônimos.

Milward-de-Azevedo e Baumgratz (2004), a fim de trazer uma contribuição à taxonomia das passifloras no Brasil, realizou um estudo atualizando o conhecimento taxonômico de *Passiflora* subg. *Decaloba* na Região Sudeste, reconhecendo as espécies que o compõe, revisando dados nomenclaturais, apresentando análise morfológica, dados palinológicos, ilustrações e mapas de distribuição geográfica, reavaliando os limites específicos e seccionais e elaborando uma chave para identificação, além de fornecer subsídios para futuras análises filogenéticas.

#### **2.4. As espécies *Passiflora capsularis* e *Passiflora rubra***

*P. capsularis* e *P. rubra* pertencem ao subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. e à seção *Xerogona* (Raf.) Killip.

De acordo com as descrições de Deginani (2001), Milward-de-Azevedo e Valente (2004), *Passiflora capsularis* L possui caule anguloso, pubescente, folhas com pecíolos, sem glândulas, são membranáceas, bilobadas, raramente trilobadas, ápice agudo, apiculado, base cordada; presença de estípulas, e ausência de brácteas. As flores são alvas ou cremes, axilares, solitárias ou aos pares. Os frutos são capsulares-loculicidas, elipsoidais ou fusiformes, violáceos, ovário elipsóide com leve pilosidade branca, sementes elípticas, testa sulcada transversalmente. Têm sua

distribuição geográfica pela América Central, Colômbia, Equador, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil, encontramos *P. capsularis* nos estados do Pará, Mato Grosso, Goiás, Piauí, Ceará e nas regiões Sudeste e Sul. Nome popular é Maracujá-branco-miúdo, maracujá branco, maracujá-mirim, maracujazinho, maracujá. Quanto à fenologia do florescimento, foram encontradas com flores nos meses de janeiro a maio, e outubro a dezembro, e com fruto em janeiro, março a maio, novembro e dezembro.

De acordo com as descrições de Killip (1838), Snow & MacDougal (1993) e Melo et al. (2001) *Passiflora rubra* L possui caule anguloso, estreito, pubescente, raramente glabrescente; folhas pecioladas 2 a 8 cm, membranosas, suavemente pilosa; solitárias, muito raramente em pares, articule próximo ápice, sem brácteas; flores de até 5 cm, sépalas esverdeadas, pétalas mais largas que as sépalas de coloração branca, ou cremes, filamentos da corona em 1 ou 2 série, ovário subgloboso, densamente piloso, com pelos de coloração branco ou castanho. Frutos ovóides ou obovóides, ápice arredondado ou abruptamente agudo, se afinando ao final, com coloração avermelhada; sementes oviformes, pretas, sulcada transversalmente. Está distribuída geograficamente pela América do Sul (Bolívia, Colômbia, Venezuela, Equador e Peru), Bahamas, Haiti, República Dominicana, Jamaica, em locais com altitudes entre 1500 e 2000m. No Brasil encontramos *P. rubra* nos estados de Pernambuco, Ceará, Rio de Janeiro (KILLIP, 1838).

As duas espécies são taxonomicamente muito próximas, morfologicamente similares. As folhas de *P. capsularis* e *P. rubra* são muito similares, e na ausência de flores ou frutos, é quase impossível distinguí-las. As principais diferenças entre as duas espécies residem no ovário e no fruto. O ovário de *P. rubra* é densamente coberto com pêlos longos que podem ser brancos ou, mas raramente, marrons, os quais geralmente persistem sobre os frutos. Em *P. capsularis*, o ovário é meramente puberulento e os curtos pêlos frequentemente desaparecem no fruto maduro. Os frutos de *P. capsularis* são verdes e sempre mais alongados, enquanto que em *P. rubra* os frutos são rubros e demonstram maior variação em relação ao comprimento e largura, sendo mais obovóides (SOUSA, MELETTI, 1997).

## **2.5. Passifloras ornamentais**



Além de despertam o fascínio nas pessoas, pela extrema beleza de suas flores, as passifloras são consideradas complexas, de coloração forte ou suave, principalmente devido à presença da corona, principal característica da família Passifloraceae (SOUZA, PEREIRA, 2003). Igualmente fascinante é a ampla variedade de formatos das folhas dentro do gênero, tendo muitas espécies valor comercial ornamental somente em função das folhas. Por esse motivo a diversidades de características, as inserem na lista de plantas ornamentais, como flores de característica excêntrica, coloridas, vistosas e exóticas, com coloração que se exprime desde o branco ou verde suave, a espetaculares amarelos, azul, violeta, rosa, laranja e vermelho Possuindo um perfume encantador e um número abundante de flores. Estas plantas, que florescem em abundância por um período prolongado, habitualmente permanecem abertas por um período do dia, excetuando-se algumas espécies como *P. bahiensis* Klotzsch e *P. eichleriana* Mast., cujas flores conservam-se abertas por mais de 24 horas e *P. aurantia* G. Forst., *P. cinnabarina* Lindl. e *P. herbertiana* Ker. Gawl. que mantém suas flores abertas por até três dias consecutivos (ABREU et al., 2008).

Aplicando aos atributos estéticos de suas exóticas flores e folhas, e de sua ampla variabilidade inter e intraespecífica (MELETTI et al., 2000), as passifloras vêm sendo utilizadas na ornamentação de casas de vegetação e jardins europeus (ULMER, MACDOUGAL, 2004; PEIXOTO, 2005). Abreu et al. (2008) cita a utilização de passifloras de modo decorativo e com efeito harmonioso ocorrendo entre vaso e planta, além do uso em cercas, muros, pérgulas e estufas. Nos Estados Unidos e em muitos países da Europa, as passifloras já são atualmente utilizadas na ornamentação (VANDERPLANK, 2000), enquanto que em países de clima tropical, como Brasil e Austrália, o potencial ornamental destas espécies ainda é pouco explorado (PEIXOTO, 2005).

As passifloras já são apreciadas no mundo inteiro por seu valor ornamental. Suas sementes são comercializadas na América do Norte e Continente Europeu ([www.Raintreenursery.com/ catalog](http://www.Raintreenursery.com/catalog)). Seu uso como planta ornamental na Europa é citado desde o século XIX e hoje tem se destacado em muitos países no mercado de mudas híbridas (VANDERPLANK, 2000), as quais são divulgadas mundialmente pela revista especializada PASSIFLORA (KING, 2000). Há no Brasil mais 120 espécies nativas, algumas inclusive endêmicas (SOUZA, PEREIRA, 2003;

PEIXOTO, 2005), porém passifloras híbridas têm maior valor de mercado. O cruzamento entre *P. alata*, *P. amethystina*, *P. caerulea*, entre outras, vem sendo utilizado em outros países para a criação de numerosos híbridos de valor comercial, como *P. "Star of Bristol"*, *P. "Star of Kingston"* e *P. "Sunburst"* (VANDERPLANK, 2000).

No início dos anos 2000, as flores passaram a entrar no cenário agrícola nacional. O Brasil vem, a cada ano, aumentando sua produtividade de flores ornamentais, e as exportações vêm obtendo marcas recordes (PEIXOTO, 2005). Nosso clima e solos ricos em variações, em ecossistemas e a crescente busca de profissionalização, confirmam a tendência brasileira no mercado de floricultura (MOSCA et al., 2004). O Brasil, por apresentar condições climáticas favoráveis, vem proporcionando a produção de flores tropicais e ornamentais de alta qualidade e com tonalidades mais vivas, formas exóticas e maior durabilidade, isso devido à existência de muitas espécies nativas (ABREU et al., 2008). Nesse contexto, as flores tropicais se mostram como uma excelente oportunidade para o Brasil expandir suas fronteiras agrícolas, comerciais e aumentar a capacidade geradora de emprego e renda no campo (MOSCA et al., 2004).

Apesar de o Brasil ser o principal centro de diversidade de *Passiflora*, esse potencial tem sido pouco explorado no mercado de plantas ornamentais, por não existirem programas de hibridação específicos para essa finalidade, não aproveitando o germoplasma nativo para o mercado de plantas e flores ornamentais (ABREU et al., 2008).

## **2.6. Estudos citogenéticos em passifloras**

A citogenética é uma área de estudo que proporciona conhecimento com relação à organização genômica, utilizando como base a contagem do número cromossômico, a observação da morfologia de cromossomos mitóticos e meióticos, o estabelecimento de padrões cariotípicos, e a análise do comportamento meiótico de híbridos intra e interespecíficos (BERTÃO, 1993; SHI et al., 1996). É uma ciência que surgiu com a associação da citologia com a genética (GIANNONI et al., 1988; GUERRA, 1988), e propõe análises do genoma que fornecem informações sobre as peculiaridades das espécies.

O cariótipo é representado pelo conjunto de cromossomos metafásicos de um indivíduo ou organismo, que por sua vez se organiza conforme o seu comprimento e a posição do centrômero de cada cromossomo (HARTL, JONES, 1998). Os cromossomos também são considerados marcadores citológicos, utilizando-se sua localização centrômerica, bandas de heterocromátina e regiões organizadoras de nucléolo.

Segundo Sharma e Sem (2002), algumas diferenças na morfologia cromossômica entre diferentes genótipos, normalmente, indicam diferenças no conteúdo genético dos indivíduos. Conforme os mesmos autores, algumas das grandes variações que podem ser observadas nos cromossomos são as alterações estruturais que modificam a cariomorfologia, principalmente entre espécies relacionadas. Tais alterações ou rearranjos podem influenciar a segregação dos cromossomos e a própria recombinação. Os rearranjos podem resultar em modificação nos comprimentos absoluto e relativo, que podem ocorrer por qualquer diferença no conteúdo dos produtos gênicos, ou por duplicações de genes, podendo influenciar a síntese de proteínas e interações entre estes. Já alterações numéricas, incluindo aneuploidias, podem conduzir à diferença no conteúdo gênico. Por fim, variações nas propriedades químicas dos cromossomos, representada pela variação na coloração destes, influenciam seu tempo de condensação ou replicação.

A literatura nos mostra duas classificações, devido à relativa complexidade taxonômica do gênero *Passiflora*, a de Killip (1938) e a de MacDougal e Feuillet (2004). Citologicamente dentre as 450 espécies descritas, o gênero tem sido pouco estudado, existindo estudos cromossômicos de apenas 30%, limitando-os apenas à contagem do número cromossômico em sua grande maioria (SOARES-SCOTT, 2005).

Atualmente, a classificação taxonômica proposta por MacDougal e Feuillet (2004) tem sido bem aceita. Os autores delimitaram quatro subgêneros que apresentam os seguintes números básicos de cromossomos: *Decaloba*  $x = 6$ , *Deidamioides*  $x = 12$ , *Astrophea*  $x = 12$  e *Passiflora*  $x = 9$ . O menor número haplóide descrito é  $n = 6$ , sugerindo o acontecimento de poliploidia durante a evolução do gênero, levando ao surgimento das espécies com número de cromossomos diferentes de  $2n = 18$  (por ex., *Passiflora caerulea*,  $2n = 24$ ; *P. suberosa*,  $2n = 36$ ; *P. lutea*,  $2n = 84$ ).

Há alguns estudos citogenéticos realizados em *P. rubra* e *P. capsularis*. O número cromossômico  $2n = 12$  foi estabelecido para *P. capsularis* por Bowden (1945), Beal (1969), Snow e MacDougal (1993), Vieira et al. (2004) e Melo et al. (2001), e para *P. rubra* por Snow e MacDougal (1993) e Melo et al. (2001). Estudos cariotípicos mais detalhados não estão disponíveis para essas espécies. Apenas para *P. capsularis*, o comprimento do lote haplóide foi de 8,03  $\mu\text{m}$  e TF% foi de 39.55 (VIEIRA et al., 2004). De acordo com Melo et al. (2001), a morfologia dos cromossomos de *P. capsularis* e *P. rubra* variou entre metacêntricos e submetacêntricos, mas os valores em  $\mu\text{m}$  não foram apresentados. Os estudos de bandeamento CMA/DAPI revelaram um único bloco CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> na heterocromatina do maior par de cromossomos em ambas as espécies, embora os blocos CMA<sup>+</sup> tenham corado fracamente em *P. rubra*. Os estudos de Snow & MacDougal (1993) revelaram que a espécie apresenta um par de constrições secundárias acompanhadas de satélites, enquanto Vieira et al. (2004) observou dois pares de constrições secundárias, mas apenas um par acompanhado de satélites. Estudos de FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) realizados nessas espécies revelaram para ambas dois sites de rDNA 5S subterminais e dois sites de rDNA 45S também subterminais (MELO, GUERRA, 2003).

O número gamético  $n = 6$  foi estabelecido para as duas espécies por Souza (2002). De acordo com a autora, o comportamento cromossômico observado nas duas espécies foi bastante similar. O percentual de configurações de pareamento cromossômico encontrados na diacinese em *P. capsularis* foi de 87,6 % de 6 II, enquanto 11,2 % das células analisadas apresentaram 5 II + 2 I, 0,6 % apresentaram 4 II + 1 IV e 0,6% apresentaram 3 IV. *P. rubra* apresentou 91,4 % de células com 6 II; 6,2 % com 5 II + 2 I; 1,6 % com 4 II + 1 IV e 0,8 % com 2 II + 2 IV.

Segundo Souza (2002), em relação ao número total de quiasmas observado por célula, *P. capsularis* apresentou, em média, 5,7 quiasmas, sendo 5,3 deles intersticiais e apenas 0,4 terminais, enquanto *P. rubra* apresentou, em média, 6,6 quiasmas, sendo 4,8 deles intersticiais e apenas 1,8 terminais. O índice de recombinação foi de 11,70 e 12,60, respectivamente. Tanto *P. capsularis* quanto *P. rubra* apresentaram irregularidades meióticas, como cromossomos retardatários na meiose I e II, pontes cromossômicas, principalmente na anáfase I, ausência de sincronismo na meiose II e formação irregular das fibras do fuso acromático na

meiose II. Com base em estudos dos produtos pós-meióticos, o índice meiótico (%) estabelecido para *P. capsularis* e *P. rubra* foi de 95,2 e 92,8. Tanto os estudos mitóticos quanto meióticos não revelaram diferenças significativas entre as duas espécies. A viabilidade polínica foi estudada por Souza et al. (2004) e refletem o alto índice meiótico encontrado anteriormente.

## **2.7. Estudos moleculares em passifloras**

A biologia molecular tem fornecido ferramentas valiosas para uma rápida e detalhada análise genética de organismos superiores. Certamente a mais relevante dessas ferramentas seja a utilização de marcadores baseados em DNA, que detectam diferenças simples na informação genética presente em dois ou mais indivíduos, e são empregadas para diversos propósitos, como: testes de paternidade, identificação de genes responsáveis por doenças genéticas, estudos de evolução e construção de mapas genéticos, bem como em estudos de caracterização de variabilidade e estrutura populacional (GUILFORD et al., 1997; RUSSELL et al., 1997; COLETTA FILHO et al., 1998, 2000; FAJARDO et al., 1998; STRUSS, PLIESKE, 1998; PESTSOVA et al., 2000).

Experimentos do início dos anos 80 evidenciam que os genomas eucariotos apresentam diferentes classes de seqüências repetidas, umas mais complexas (minissatélites) e outras mais simples, denominadas de Simple Sequence Repeats (SSR) ou microsatélites (TAUTZ, RENZ, 1984).

Microsatélites ou seqüências microsatélites são seqüências de DNA moderadamente repetitivas que estão presentes e igualmente distribuídas na eucromatina do genoma de vertebrados, insetos e plantas (CHARLESWORTH et al., 1994). Estas seqüências apresentam herança mendeliana codominante, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados. Compõe de pequenas seqüências com um a quatro nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* e localizadas entre os genes ou dentro de íntrons; apresentam polimorfismo derivado da variação do número de repetições das subunidades e da taxa de mutação.

Este polimorfismo é acessado por Reação em cadeia da DNA Polimerase (do inglês, Polymerase Chain Reaction - PCR) e é de fácil interpretação, o que tem permitido seu emprego com as mais diferentes finalidades, como para caracterizar

linhagens endocruzadas, mapear genes, investigar a ligação com diversos marcadores citogenéticos, estudos forenses, genética médica, estudos que comparam o seu polimorfismo com o de locos protéicos, e estudos populacionais (FERREIRA, GRATTAPAGLIA, 1998; LIMA-ROSA, 1998).

Além disso, o que distingue este marcador dos demais é a sua natureza multi-alélica numa população, onde potencialmente todos os alelos de um determinado loco podem ser detectados e discriminados. Possuem alta reproducibilidade, com grande abundância e ampla distribuição no genoma. O alto grau de polimorfismo se deve ao número de vezes que estas seqüências se repetem, gerando polimorfismo pelo tamanho dos fragmentos amplificados por *primers* específicos para as regiões que flanqueiam estas repetições (SERAFIM et al., 2002). No entanto, para sua utilização é necessário o desenvolvimento prévio das seqüências (*primers*) específicas para a espécie a ser trabalhada (FERREIRA, GRATTAPAGLIA, 1998). Mesmo diante desta limitação da tecnologia dos microssatélites, as suas vantagens são bastante atrativas, tornando este marcador freqüentemente requisitado para os trabalhos de biologia molecular.

Os marcadores moleculares são ferramentas potenciais em programas de melhoramento genético vegetal, melhorando a eficiência e proporcionando maiores ganhos genéticos na cultura em estudo. Atualmente, há inúmeros tipos e combinações de marcadores fazendo parte na rotina dos programas de melhoramento, sendo a utilizados um ou outro marcador em função do tempo para obtenção de resultados, custo e facilidade de uso.

Em *Passiflora* alguns autores (PÁDUA, 2004; PÁDUA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005; PENHA et al., 2007) relatam a utilização de marcadores microssatélites no desenvolvimento e caracterização de primers SSR para algumas espécies, visando estudos relacionados à diversidade genética.

Pádua (2004) desenvolveu biblioteca enriquecida de marcadores SSR para as espécies *P. alata* e *P. pohlii*, com 14 e 5 *primers* em cada espécie respectivamente. Oliveira (2005) desenhou 107 pares de *primers* para os marcadores microssatélites de *P. edulis* f. *flavicarpa*. Penha et al. (2007), também desenvolveu e caracterizou marcadores SSR para a espécie de *P. alata* (maracujá-doce). Os mesmos autores citados a cima testaram o nível de polimorfismo através

de estudos obtidos de transferibilidade destes pares de *primers* para as respectivas espécies para a qual foram desenhados os seus *primers*.

Justifica-se a ausência de trabalhos envolvendo SSR em passifloras ao tempo e aos gastos para gerações destes marcadores. Uma vez que primeiramente é necessário desenhar os primers a partir do seqüenciamento de fragmentos de DNA, obtidos de bibliotecas genômicas, onde os microssatélites foram previamente localizados. Estes procedimentos são laboriosos e de alto custo, de modo que o uso de SSRs é ainda limitado. Uma estratégia para atenuar os gastos relacionados ao uso destes marcadores é a utilização de *primers*, já anteriormente descritos para algumas espécies do gênero, que possa vir apresentar amplificação cruzada em/entre as espécies de interesse.

Cerqueira-Silva et al. (2008a), avaliou a amplificação cruzada em 13 espécies de passifloras (*P. cincinata*, *P. coccinea*, *P. kermesina*, *P. gardineri*, *P. rubra*, *P. capsulares*, *P. misera*, *P. suberosa*, *P. nitida*, *P. watsoniana*, *P. bahienses*, *P. eichleriana* e *P. setacea*), transferindo 25 *primers* de SSR, desenvolvidos para '*Pe*' (*P. edulis* f. *flavicarpa*), obtendo um percentual de amplificação cruzada entre 32 e 76%, sendo que 9 das 13 espécies apresentaram amplificação superior a 52%. Esses resultados mostraram que os *primers* desenvolvidos para identificar locos de SSR em '*Pe*' apresentam porcentagem considerável de amplificação cruzada com as espécies avaliadas. Penha et al. (2007) testou a transferibilidade de 97 *primers* desenvolvidos para *P. edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. para *P. alata*. Obtendo uma taxa de 32% de transferibilidade entre estas espécies, demonstrando haver homologia nas seqüências flangeadoras dos locos de SSR. Já a amplificação cruzada utilizando *primers* SSR desenhados para *P. alata* em *P. gardineri*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. watsoniana* e *P. bahiensis*, detectou-se uma taxa percentual diferenciada de amplificação cruzada entre as espécies na ordem de 86%, 86%, 57% e 29%, respectivamente, resultados que permitem afirmar que os *primers* SSR desenvolvidos para *P. alata* por Pádua et al. (2005) são capazes de acessar locos SSR, via amplificação cruzada, nas espécies avaliadas (CERQUEIRA-SILVA et al., 2008b).

Portanto, os *primers* SSR possuem grande potencial para estudos genéticos no gênero Passiflora, tais como estudos de variabilidade intra e interespecíficos, filogenia e mapeamento genético moleculares, etc.

## **2.8. Importância da biologia da reprodução em passifloras**

A estrutura genética de uma população está intimamente relacionada com o seu sistema de reprodução, o qual, por sua vez, depende do genótipo e das condições ambientais em que a população se encontra (MELLO, 1989). Estudar mecanismos reprodutivos das espécies vegetais é de extrema importância para o fitomelhoramento (RICHARDS, 1997; ALLARD, 1999), pois os métodos de melhoria gênica diferenciam-se para espécies autógamas e alógamas (IUCHI, 1994). Além do mais, o conhecimento do sistema de reprodução das plantas pode ajudar a determinar a variabilidade genética das espécies (HAMRICK, 1987).

Valls (2007) nos mostra que a caracterização reprodutiva, ou seja, o conhecimento do modo de reprodução das espécies é fundamental, devendo ser umas das etapas da caracterização e avaliação preliminar. Levam-se em consideração que as sementes poderão ser resultados de cruzamentos entre acessos distintos e que, quando germinadas, os novos indivíduos não expressarão as características anotadas da planta-mãe. O entendimento do sistema reprodutivo também é fundamental para a compreensão da biologia da reprodução das espécies, e base para desenvolvimento de programas de melhoramento genético (ZEN, ACRA, 2005).

Tanto no processo evolutivo das espécies vegetais, quanto na estruturação genética de populações, o sistema reprodutivo tem um papel essencial (RICHARDS, 1997), incluindo a influência na propagação vegetativa e sua consequência na estruturação de populações (YAMAMOTO, KADANO, 1990; SILVA, BARROSO, 1995). Uma vez tendo conhecimento da procedência do pólen, cujos gametas fertilizam o óvulo, é possível dimensionar desde o grau de restrição do fluxo gênico numa população (HANDEL, 1983; WYATT, 1983), até a diferenciação microgeográfica e a subestruturação genética de populações (KEARNS, INOUE, 1993).

Na maioria das passifloras, sua reprodução se dá através de polinização cruzada devido à morfologia da flor, onde as anteras são localizadas abaixo do estigma; aos tipos de grãos de pólen, que geralmente são pesadas e pegajosas e, principalmente, devido à auto-incompatibilidade, em que o pólen de uma planta é incapaz de fertilizar as flores da mesma planta, e diferentes plantas podem ou não



ser compatíveis entre si (BRUCKNER et al., 2002; SOUZA et al., 2004). Em testes preliminares, várias espécies de *Passiflora* mostraram-se auto-incompatíveis (BRUCKER, 1995; SOUZA, et al., 2005). Embora torne necessária a polinização cruzada, a auto-incompatibilidade é um mecanismo importante que determina a alogamia, o que leva à heterozigose, e, conseqüentemente, à geração de variabilidade genética.

A reprodução sexuada das espécies deste gênero pode envolver tanto sistemas auto-compatíveis, como auto-incompatíveis, A auto-incompatibilidade é compreendida como um mecanismo de aumento da variabilidade genética (KOSCHNITZKE, SAZIMA, 1997) e uma vez que há a necessidade de transferência de pólen entre as flores para a produção de sementes, a elucidação dos serviços de polinização torna-se fundamental para a biologia deste grupo (VARASSIN, SILVA, 1999).

Muitos trabalhos demonstram que plantas alógamas produzem uma taxa de pólen maior que a das autógamas (VRIES, 1974; GIBBS et al., 1975; CRUDEN, 2000). Em contraste com outras características, o número de óvulos por ovário não tem se modificado, sendo possível analisar a mudança de alogamia para autogamia pela diminuição na relação pólen-óvulo (CRUDEN, 1977). O desenvolvimento da alogamia para autogamia tem sido acompanhado pela diminuição do tamanho da flor, modificações na sua morfologia e redução do custo energético para a planta (ORNDUFF, 1969; KOPTUR, 1984; CHARLESWORTH, 2006). A aplicação do método de relação pólen-óvulo como ferramenta para estimar os mecanismos reprodutivos das plantas é relativamente rápido, ágil e de baixo custo, se comparado aos métodos com marcadores moleculares e técnicas de cruzamento, mostrando ser um dos métodos precisos para se determinar o sucesso reprodutivo vegetal (SHIVANNA, JOHRI, 1985; CRUDEN, 2000).

Alguns estudos do sistema reprodutivo têm sido feitos em espécies silvestres de *Passiflora* (AMELA GARCIA, HOC, 1997, 1998a, 1998b, 2001, 2002; KAY, 2001; STORTI, 2002, BELO et al., 2006; VIANA et al., 2006), estudos voltados para determinação do modo de reprodução de cada espécie e também para otimização dos procedimentos de polinização, para inferir sobre a taxa de receptividade do estigma (SOUZA et al., 2003a, VIANA et al., 2006) e polinização in vivo (FONSÊCA et al., 2005, 2006; SANTOS et al., 2007), viabilidade polínica (SOUZA et al., 2003b;

BELO et al., 2005, VIANA et al., 2005), germinação in vitro (Cruz et al., 2005; ROZA et al., 2006; BELO et al., 2007) ao longo do tempo de abertura da flor, a auto-incompatibilidade e a razão pólen-óvulo (Souza et al., 2005a; AMORIM et al., 2007).

## 2.9. Caracterização Morfológica

Caracteres como a estrutura da planta, flores, frutos e folhas são utilizados para descrever e caracterizar espécies. A caracterização morfológica consiste na adoção de descritores botânicos herdáveis, facilmente visíveis e mensuráveis, que, a princípio, são expressos em todos os ambientes (WEILER, 2006) Esse tipo de análise é simples e de menor custo, embora apresente limitações relacionadas aos caracteres que apresentam herança aditiva, os quais são altamente influenciados pelo ambiente, e às cultivares com grande semelhança fenotípica Mesmo assim essa técnica é utilizada internacionalmente, conseguindo, em certos casos, discriminar até mesmo materiais vegetais, que não são possíveis de discriminação através de marcadores bioquímicos ou moleculares. (OLIVEIRA et al., 2000).

Os estudos taxonômicos em *Passiflora* estruturam-se na caracterização morfológica e agrônômica da planta, resultando numa classificação nítida até o táxon espécie. No entanto, o gênero *Passiflora* apresenta mais de 530 espécies que englobam mais de 20 subgêneros, muitas seções e séries, e tem sido objeto também de estudos moleculares (MUSCHNER et al., 2003). Dentro das espécies as dissimilaridades existentes apresentam maiores dificuldades para serem observadas e caracterizadas.

Os estudos de Feuillet e MacDougal (2004) propõe uma reorganização taxonômica do gênero *Passiflora*, utilizando apenas quatro subgêneros : *Astrophea*, *Deidamioides*, *Decaloba* e *Passiflora*. Geralmente, em *Passiflora edulis*, a caracterização está relacionada ao fruto e a algumas características pomológicas, assim como produção/safra, peso do fruto, tamanho do fruto, rendimento do suco, brix e acidez do suco, porém estes caracteres quantitativos não são precisos sob o plano taxonômico. Para Martin e Nakasone (1970), além da coloração do fruto, sabor e resistência às doenças, *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa* não mostram diferenças divergentes entre si.

Algumas características externas das sementes podem ser utilizadas na identificação da família, do gênero e, possivelmente, em nível de espécie, mas

freqüentemente, elas são apenas um elemento a mais na cadeia de caracteres que servem para identificar uma planta, isso devido suas características morfológicas externas não variarem com as condições ambientais, possuindo em suas estruturas uma relativa constância nos grupos afins, permitindo o uso dessas características das sementes, na identificação das plantas (BARROSO, 1978).

No entanto, na Botânica Sistemática, somente as características de plantas adultas tem uma utilização frequente, enquanto as características das plântulas são pouco utilizadas, talvez por limitação de dados e, ou falta de tradição (DONADIO, DEMATTÊ, 2000).

Contudo, dentro das espécies existem características dissimilares que apresentam grandes dificuldades para serem observadas e caracterizadas (CROCHEMORE et al., 2003). Mas a divergência entre acessos, avaliada por estatística multivariada, proporcionam uma descrição sintética da afinidade fenética e genética entre acessos e populações (DIAS et al., 1997). Assim, a quantificação dos dados de dissimilaridade genética é um importante parâmetro estimado por melhoristas de plantas, principalmente quando pretende-se obter populações segregantes e de ampla variabilidade genética (BENIN et al., 2003).

Já a análise univariada pode identificar a existência de variabilidade entre indivíduos e os diferentes graus de discriminação dos mesmos, mas considerando os descritores isoladamente. E para se fazer esse tipo de análise com os descritores, é preciso analisar a contribuição dos mesmos de forma conjunta. Isso é possível com o uso de análises multivariadas (CRUZ et al., 2004).

Quantificando as características genéticas divergentes entre indivíduos, torna-se necessário a utilização da técnica de aglomeração, que é baseada na distância Euclidiana média ou na distância generalizada e a técnica de agrupamento (CRUZ, CARNEIRO, 2003).

Diante da revisão apresentada a respeito do gênero *Passiflorae* observa-se a necessidade de estudos referentes à sistemática de Passifloraceae que não está ainda bem resolvida, pois além das numerosas espécies estarem agrupadas em subgêneros, seções e, ou séries geralmente com frágeis limites de circunscrição (FEUILLET, MACDOUGAL, 1999), a última revisão abrangente para o grupo data de 1938, realizada por Killip.

Considerando que das 530 espécies descritas para o gênero *Passiflora*, nota-se, que o potencial das passifloras para plantas ornamentais é praticamente inexplorado embora sejam plantas de clima essencialmente tropical. Para a implementação de projetos visando à efetividade utilização de espécies de *Passifloras* e seus híbridos como plantas ornamentais, entre outras características, são tão importantes quanto à avaliação de processos de multiplicação dessas plantas que permitam a sua comercialização. Assim, torna-se necessário colocar em prática ações de pesquisa que valorizem as espécies brasileiras, preservem a biodiversidade desses germoplasmas e nos permitam o seu uso sustentável.

### 3. CAPÍTULO 1

#### **Estudo citogenético, molecular e morfológico como estratégia para delimitação entre *Passiflora capsularis* LINN e *Passiflora rubra***

##### **Resumo**

A família Passifloraceae compreende cerca de 700 espécies tropicais e subtropicais, sendo o gênero *Passiflora* composto por 520 espécies. *Passiflora capsularis* Linn. e *Passiflora rubra* Linn. são plantas de pequeno porte, com flores brancas que se abrem durante toda a manhã, propícias a ornamentação de interiores. Essas espécies são morfológicamente muito similares, diferenciando-se apenas pela cor do fruto e pilosidade do ovário. Como ocorre com muitas outras passifloráceas, há a necessidade de realização de estudos para delimitação específica entre *P. rubra* e *P. capsularis*, utilizando-se metodologias que gerem conhecimentos morfológicos e do genoma. Assim, foram realizados estudos citogenéticos, moleculares (SSR) e morfológicos. Os resultados das análises citogenéticas mostraram que os cariótipos de ambas as espécies são semelhantes, com  $2n = 12$ , sendo 8 cromossomos metacêntricos e 4 submetacêntricos. Em ambas as espécies, observou-se satélite no braço longo do segundo par cromossômico. O resultado da análise de agrupamento, segundo a distância de Mahalanobs pelo método de UPGMA e Ward, utilizando-se descritores morfológicos e polínicos não apresentou nítida separação entre os genótipos de *P. capsularis* e *P. rubra*, mesmo com um alto índice de correlação cofenética (0,96). Utilizando marcadores microssatélites, não foi

observado polimorfismo com os primers testados. Os dados citogenéticos, palinológicos e morfológicos possibilitaram afirmar que, embora *P. capsularis* e *P. rubra* possuam características fenotípicas diferentes em relação ao fruto e pilosidade do ovário, ambas podem se tratar de uma mesma espécie, sendo essa diferença categorizada em variedade dentro da espécie, revertendo-se em duas formas botânicas. Assim, inferimos que *P. capsulares* e *P. rubra* não foram caracterizadas como espécies diferentes com base nas características analisadas.

Palavras-chave: Passifloráceas, delimitação entre espécies, plantas ornamentais.

# Estudo citogenético, molecular e morfológico como estratégia para delimitação entre *Passiflora capsularis* LINN e *Passiflora rubra* LINN

Artigo a ser submetido na Revista Plant Systematics and Evolution

---

## Abstract

The family Passifloraceae includes about 700 tropical and subtropical species, the genus *Passiflora* is composed of 520 species. *Passiflora capsularis* Linn. and *Passiflora rubra* Linn. plants are small, with white flowers that open throughout the morning, leading to the interior decoration. These species are morphologically very similar, differing only by the color of the fruit and pubescence of the ovary. As with many other Passifloráceas, there is a need for studies to specific delimitation between *P. rubra* and *P. capsularis*, using methods that generate morphological and genome knowledge. Thus, were performed studies of cytogenetic, molecular (SSR), morphology. The results of cytogenetic analysis showed that the karyotypes of both species are similar, with  $2n = 12$  with 8 metacentric and 4 submetacentric chromosomes. In both species was observed satellite on the long arm of the second chromosome pair. The result of the analysis of grouping according to distance Mahalanobis by the method of UPGMA and Ward, using morphological and pollen descriptors showed no clear separation between the genotypes of *P. capsularis* and *P. rubra*, even with a high cophenetic correlation (0.96). Using the tool of molecular genetic, polymorphism was not observed with the primers tested. Data studies of Cytogenetic, palynology, morphology and reproduction allowed to state that, although *P. capsularis* and *P. rubra* have different phenotypic characteristics in relation to fruit and pubescence of the ovary, may be both the same species, and the difference being categorized in variety within species, reversing itself in two botanical forms. Well infer that the *P. capsularis* and *P. rubra* were not characterized as different species based on the analyzed characteristics.

Keywords: Passifloraceae, delimitation between species, ornamental plants.

---

## Introdução

No Brasil, as espécies do gênero *Passiflora* são conhecidas como maracujazeiros. Mesmo aplicando-se o mesmo nome popular a todas, somente duas são cultivadas comercialmente para a produção dos frutos, *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora edulis* Sims. Além da importância de seus frutos, suas flores despertam a curiosidade e atenção na maioria das espécies. Os desenhos dos componentes florais, principalmente dos órgãos masculinos (estames) e femininos (carpelos) em forma de cruz, fizeram com que fossem denominados de "flor-da-paixão" (Cervi 1997). A beleza de suas flores não está somente na forma de seus componentes florais, mas principalmente na multitude de cores. A maioria possui hábito trepador e folhagem perene (Sousa e Meletti 1997).

Tendo em vista o grande número de espécies de *Passiflora*, cerca de 520 (Cervi 2005), aliado aos diferentes habitats em que ocorrem, é notória a expressiva variabilidade genética interespecífica, além da enorme variabilidade intra-específica que ocorre naturalmente. A ampla variabilidade genética existente no gênero *Passiflora* já foi descrita por vários autores, entre eles Ferreira e Oliveira (1991), Ferreira (1998), Viana et al. (2003), Castellen et al. (2005), Faleiro et al. (2005) e Bellon et al. (2007). Grande parte dessa variabilidade está dispersa no território brasileiro, o que coloca nosso país entre um dos principais centros de diversidade genética desse gênero (Sousa e Meletti 1997).

Os estudos cromossômicos têm sido utilizados na determinação das relações filogenéticas e evolutivas entre grupos de plantas (Guerra 1990; Pitrez 2006). A análise citogenética comumente utilizada na citotaxonomia vegetal inclui basicamente a contagem do número e a morfologia dos cromossomos mitóticos, o aspecto do núcleo interfásico, além do comportamento de cromossomos meióticos (Guerra 1988). Segundo Ruas (1989), as análises dos cariótipos envolvem a avaliação de dados como tamanho de cromossomos, relação entre os braços, presença de constrição secundária e satélite, propriedades de coloração, e podem trazer informações valiosas, principalmente quando se quer comparar espécies diferentes ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie.

Melo et al. (2001), ao analisarem 31 espécies de *Passiflora* através de contagem cromossômica, conseguiram dividir essas espécies em quatro grupos: a)  $2n = 12, 24, 36$ ; b)  $2n = 24$ ; c)  $2n = 18, 72$ ; e d)  $2n = 20$ . No entanto, ainda há contestação quanto ao número cromossômico básico do gênero. Melo et al. (2001) propuseram  $x = 6$  como número cromossômico básico, com  $x = 9$ ,  $x = 10$  e  $x = 12$  sendo considerados números básicos



secundários. Já Hansen et al. (2006) sugeriram  $x = 12$ , uma vez que  $n = 6$  é encontrado somente no subgênero *Decaloba*, levando a crer que o mesmo originou-se uma única vez, no ancestral direto deste subgênero, rejeitando, de acordo com os autores, a hipótese de  $x = 6$  ser o número cromossômico básico do gênero. A determinação do número cromossômico disponíveis para outros gêneros da família Passifloraceae,  $n = 11$  e  $n = 12$ , também sustentariam a hipótese de  $x = 12$ . Por outro lado, o número e a localização de sítios 5S e 45S do DNA nuclear ribossomal são consistentes com a hipótese de  $x = 6$  como ancestral no gênero (Melo e Guerra, 2003).

Alguns estudos de caracterização e avaliação vêm sendo conduzidos para espécies silvestres cultivadas, populações, linhagens e híbridos. Meletti et al. (1992) avaliaram algumas características de espécies de passifloras como período e horário de florescimento morfologia das flores, além de características do pólen, fruto e semente. Os autores conseguiram avaliar o isolamento reprodutivo entre e dentro de espécies, índices de viabilidade de pólen, bem como as qualidades físico-químicas. Crochemore et al. (2003) utilizaram descritores morfológicos envolvendo características quantitativas e qualitativas de folhas e gavinhas, flores e frutos, que foram úteis na avaliação da ampla diversidade entre as espécies avaliadas, da variabilidade dentro de espécies e da divergência entre os acessos. Santos (2008) caracterizou genótipos de *P. palmeri* e *P. foetida*, encontrando variabilidade genotípica e fenotípica.

A variabilidade genética do gênero *Passiflora* vem sendo caracterizada por meio de estudos fenotípicos e moleculares. Contudo, os dados disponíveis de caracterização molecular nessas espécies podem ser considerados ainda incipientes, levando em conta o grande número de espécies ainda não estudadas. O potencial dos marcadores moleculares é ainda pouco explorado em passifloras, a exemplo de microssatélites (SSR), que vêm sendo aplicados em pouquíssimas espécies para construção de mapas de ligação e mapeamento de genes em muitas espécies, por sua abundância nos genomas, codominância, alto polimorfismo e fácil análise (Oliveira 2006). Outra utilização destes marcadores é a identificação de regiões similares ou homólogas nos genomas de espécies taxonomicamente próximas para caracterizar espécies e híbridos, além do seu uso em testes de paternidade (Buso et al. 2003).

Trabalhos envolvendo marcadores microssatélites em passifloras foram desenvolvidos por Pádua (2004), Oliveira et al. (2005), Penha et al. (2007), onde os autores desenvolveram e caracterizaram marcadores microssatélites para *Passiflora alata* e *Passiflora pohlii*, para maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*), e maracujazeiro-doce (*P. alata*),

respectivamente. Os microssatélites são regiões do genoma compostas por repetições de nucleotídeos *in tandem*, altamente polimórficas, multialélicas e apresentam padrão de herança mendeliano (Borém e Caixeta 2006).

Os primeiros autores a descreverem as espécies *Passiflora capsularis* e *P. rubra* as incluíram no subgênero *Plectostemma* Mast. e na secção *Xerogona*, de acordo com Killip (1938) (Ulmer e MacDougal, 2004; Milward-de-Azevedo e Baumgratz, 2004). São taxonomicamente muito próximas, pois são morfologicamente similares. As folhas de *P. rubra* e *P. capsularis* são tão similares que, na ausência de flores ou frutos, é quase impossível distingui-las. As principais diferenças entre as duas espécies residem no ovário e no fruto. O ovário de *P. rubra* é densamente coberto com pêlos longos, que podem ser brancos ou, mas raramente, marrons, os quais geralmente persistem sobre os frutos. Em *P. capsularis*, o ovário é meramente puberulento e os curtos pêlos frequentemente desaparecem no fruto maduro. Os frutos de *P. capsularis* são verdes e sempre mais alongados, enquanto que em *P. rubra* os frutos são rubros e demonstram maior variação em relação ao comprimento e largura, sendo mais obovóides (Sousa e Meletti 1997).

Considerando a diversidade genética do gênero *Passiflora* e o potencial agrônômico para algumas espécies silvestres, e a fim de produzir conhecimentos para melhor compreender a circunscrição dessas espécies morfologicamente semelhantes e de difícil identificação, objetivou-se caracterizar as espécies *P. capsularis* e *P. rubra* utilizando ferramentas citogenéticas, moleculares e descritores morfológicos e palinológicos para melhor delimitação taxonômica entre essas espécies e, assim, utilizá-las em programas de melhoramento que envolva hibridação interespecífica para produção de plantas ornamentais.

## **Material e Métodos**

### **Espécies de estudo e condições de cultivo**

O material vegetal foi composto de quatro exemplares de *P. capsularis* e quatro exemplares de *P. rubra*.

*P. capsularis* – coletada na mata Atlântica da região sul do estado da Bahia, no morro da Viúva localizado na RPPN Serra Bonita (Camacan-BA), entre as coordenadas 25° 03 min 72,1' Norte – 121° 38 min 41,6' Leste entre as altitudes de 789 à 813m, e também de sementes provenientes de doação da Embrapa Cerrados, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

*P. rubra* – coletada na mata Atlântica da região sul do estado da Bahia, no morro da Viúva localizado no Distrito de Serra Bonita (Camacan-BA), entre as coordenadas 25° 03 min 72,1' Norte – 121° 38 min 41,6' Leste entre as altitudes de 789 à 813m, e também de sementes provenientes de doação da Universidade Estadual Paulista (UNESP) *campus* Jaboticabal - SP, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Sementes foram colocadas para germinar em bandejas de isopor de 128 células. Ao surgimento das primeiras folhas verdadeiras, as mudas foram transplantadas para saquinhos de polietileno com volume de 1 L, contendo solo argiloso. Após atingirem 0,40 cm de altura, as plantas foram transplantadas para vasos pretos de 43 L, contendo solo argiloso e substrato nas proporções de 3:1, respectivamente. As plantas foram mantidas em cultivo protegido no *campus* da UESC (Banco Ativo de Germoplasma - BAG-Passifloras), aplicando-se podas mensais, quando necessário, e adubação com a formulação NPK (4-14-8) a cada 60 dias. A irrigação foi realizada pelo sistema de gotejamento. O controle de pragas foi feito com defensivos agrícolas DECIS e VERTIMEC. Os fungos foram controlados com pulverização de produtos a base de cobre. As pragas e doenças foram controladas com medidas profiláticas simples, não afetando o ciclo reprodutivo das plantas.

### **Estudos Citogenéticos – Cariotipagem**

Os ápices jovens de raízes foram coletados de estacas mantidas em sacos de plástico preenchidos com areia lavada. Após sua retirada, as pontas de raízes foram lavadas em água destilada, pré-tratadas em 8-Hidroxiquinolona a 0,002 M, por uma hora em temperatura

ambiente e por  $3 \text{ h} \pm 6 \text{ }^\circ\text{C}$ . Após o pré-tratamento, o material foi lavado em água destilada duas vezes por 5 min e fixado em etanol-ácido acético glacial na proporção de 3:1 (fixador Carnoy 1; Johansen, 1940), por 3 h em temperatura ambiente e mantido a  $-20^\circ \text{C}$  até o momento do preparo da lâmina. Para o preparo da lâmina, as raízes foram lavadas em água destilada, secas em papel de filtro e amaciadas em solução enzimática Pectinex<sup>®</sup> por 55 min a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  em estufa, em seguida transferidas para uma lâmina com uma gota de ácido acético 45 % e preparadas por maceração. Após verificar a qualidade da preparação em microscópio de contraste de fase, as lâminas foram transformadas em permanente, utilizando-se a técnica de imersão no vapor de nitrogênio líquido por 5 min e retirada da lamínula imediatamente com auxílio de gilete ou similar. As lâminas foram secas com auxílio de bomba de ar, e coradas com Giemsa a 4% por 30 minutos. Para transformar as lâminas em permanentes após coradas, utilizou-se uma gota de meio de montagem Permount<sup>®</sup> entre lâmina e lamínula.

As metáfases foram observadas em microscópio de luz em campo claro e registradas com máquina digital Olympus E-330 adaptada ao microscópio Olympus CX-41. Os cromossomos foram mensurados no programa Adobe Photoshop CS 8.0, projetando-se uma imagem da metáfase, juntamente com uma imagem contendo uma escala com  $10 \text{ } \mu\text{m}$ , cuja medida em milímetro (mm) serviu como parâmetro para a conversão das medidas cromossômicas em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ).

Para construção do kariograma e do ideograma, foram utilizados os valores dos comprimentos absolutos dos cromossomos e respectivos braços. Foram calculados a relação entre braços ( $r = \text{braço longo}/\text{braço curto}$ ), comprimento do lote haplóide (CLH = somatório dos comprimentos absolutos dos cromossomos metafásicos), comprimento médio dos cromossomos, comprimento relativo dos cromossomos, índice centromérico (Levan et al. 1964) e índice de assimetria (TF % = somatório dos braços curtos do lote haplóide em relação ao comprimento do mesmo (Huziuwara 1962). Os homólogos foram determinados com base na posição do centrômero, tamanho absoluto de cada cromossomo e relação de braços. Os kariótipos foram arranjados de acordo com o comprimento dos cromossomos, em ordem decrescente, e com a posição do centrômero (Guerra 1986). Os satélites classificados segundo Battaglia (1955).

Os kariogramas foram confeccionados com base em fotos e os ideogramas confeccionados com base em medições cromossômicas realizadas em cinco metáfases de cada indivíduo. Na mensuração dos cromossomos com satélites, os comprimentos destes não foram adicionados ao braço cromossômico correspondente, mas sim ao comprimento do

cromossomo. A ANOVA e teste de médias (Tukey 5%) foram realizados com auxílio do programa computacional Genes (Cruz 2006).

### **Estudos morfológicos**

Para avaliação das características de folha, semente, fruto e grão de pólen, foram coletadas ao acaso dez amostras de cada uma das quatro repetições, por espécie.

Folhas – foram coletadas folhas adultas e saudáveis. Com auxílio de paquímetro foram feitas as medições do comprimento foliar, largura foliar (no ponto mais largo da lâmina foliar); a área foliar foi obtida em medidor automático LI-3100 (Li-Cor, Nebraska, USA).

Sementes – foram mensuradas e caracterizadas quanto às suas dimensões: comprimento, largura, largura da aba (quando existente), largura das estrias, comprimento do hilo, distância entre as ornamentações, razão entre o comprimento e a largura da semente, média do peso individual da semente, peso total das sementes de um fruto, número de sementes por frutos, e a espessura. O peso das sementes e dos frutos foram aferidos em balança analítica.

Frutos – O comprimento do fruto foi obtido medindo-se a distância compreendida entre a base (inserção do pedúnculo) e o ápice. O diâmetro do fruto foi tomado perpendicular à altura, na região de maior dimensão do fruto. Ambas as medições foram feitas com paquímetro digital. Foram caracterizados diâmetro equatorial do fruto, e diâmetro longitudinal do fruto em mm, área foliar em cm<sup>2</sup>.

Grãos de Pólen – Para a análise dos grãos de pólen, 10 flores abertas de cada espécie foram coletadas fixadas em FAA e mantidas sob refrigeração. As amostras de grãos de pólen foram transferidas para outro recipiente contendo álcool 70% para desidratar e em seguida depositados em stubs com fita dupla face e fita de carbono e/ou prata e mantidos em dessecador. Após a desidratação, o material foi metalizado com ouro e observado em microscópio eletrônico de varredura MEV 1430 VP, e para os registros fotográficos utilizou-se o Software LEO 32 V.03.02.11 de captação de imagens. As análises utilizando MEV foram realizadas no LABIO (Laboratório de Biologia) da Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia (UEFS).

Cada espécie foi caracterizada morfopolinicamente tomando-se ao acaso 20 medidas do eixo polar, eixo equatorial, largura do colpo, mesocolpo, vista polar, apocolpo, índice da área polar, razão entre os eixos polares e equatoriais, muro, lúmen e malha dos grãos de pólen. Os parâmetros polínicos foram avaliados qualitativa e quantitativamente, e documentados através de fotomicrografias. Os resultados quantitativos foram tratados

estatisticamente. Os dados foram submetidos à análise descritiva, incluindo desvio padrão e, aplicado o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro para comparar as diferenças entre e dentro das espécies.

Os descritores, códigos e as unidades utilizadas na caracterização morfológica encontram-se na Tabela 1.

### **Marcadores moleculares**

O DNA genômico de cada material foi extraído utilizando o método CTAB (Doyle e Doyle, 1990) com algumas modificações de acordo com Viana (2006). Após a extração, as amostras de todos os DNA genômico total foram separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% visando estimar a concentração, a integridade e a pureza do DNA extraído. Após a quantificação, as amostras de DNA de boa qualidade foram diluídas para a concentração de 10ng/μL. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 μL, contendo Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 200 mM de cada um dos desoxinucleotídeos, 0,2 mM de cada um dos primers (Forward e reverse), uma unidade da enzima Taq DNA polimerase e, aproximadamente, 30 ng de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador (Gene AMP PCR System 9700 – PERKIN ELMER), de acordo com o seguinte programa: 94°C por 5 min + 40 ciclos de 94°C a 30 seg, 50°C por 40 seg, 72°C por 1 min + 72°C por 7 min e redução a 15°C. Os *primers* foram previamente selecionados levando em consideração trabalhos posteriores de transferências para as espécies em estudo (Cerqueira-Silva et al., 2008a, b). Os *primers* utilizados foram desenvolvidos por trabalhos anteriores de Pádua (2004) e Oliveira et al. (2005), e na Tabela 2 foram listados os 12 *primers* utilizados, as seqüências e a temperatura de anelamento de cada *primer*. Objetivando visualizar os padrões de amplificação, uma alíquota de 10 μL de cada amostra foi aplicada em gel de agarose (3%), corados em brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta e fotodocumentados com *software* Kodak Digital Science 1D v.3.0.1.

**TABELA 1-** Lista de descritores usados para a caracterização morfológica das espécies *Passiflora capsularis* e *P. rubra*

<b>Código</b>	<b>Descritor</b>	<b>Unidade</b>
CFo	Comprimento da folha	mm
LFo	Largura da folha	mm
AFo	Área foliar	cm <sup>2</sup>
DEFr	Diâmetro equatorial do fruto	mm
DLFr	Diâmetro longitudinal do fruto	mm
IFr	Índice de razão entre EFr/LFr	mm
PFr	Peso do fruto	mg
CS	Comprimento da semente	mm
LCS	Largura central da semente	mm
CS/LC	Razão entre o comprimento e a largura central da semente	mm
LP	Largura próxima ao hilo	mm
LD	Largura distal – mais longe do hilo	mm
LA	Largura da aba da semente	mm
LE	Largura da estria mais espessa	mm
CH	Comprimento do hilo	mm
Orn	Distância entre as ornamentações	mm
PI	Média do peso individual da semente	mg
PT	Peso total das sementes de um fruto	mg
NS	Número de sementes por frutos	unidades
ESP	Espessura da semente	mm
EE	Eixo equatorial do grão de pólen	µm
EP	Eixo polar	µm
LC	Largura do colpo	µm
M	Mesocolpo	µm
VP	Vista polar	µm
AP	Apocolpo	µm
I.A.P	Índice área polar	µm
P/E	Razão entre eixo polar e eixo equatorial	µm
Mu	Muro	µm
Lu	Lúmen	µm
Ma	Malha	µm

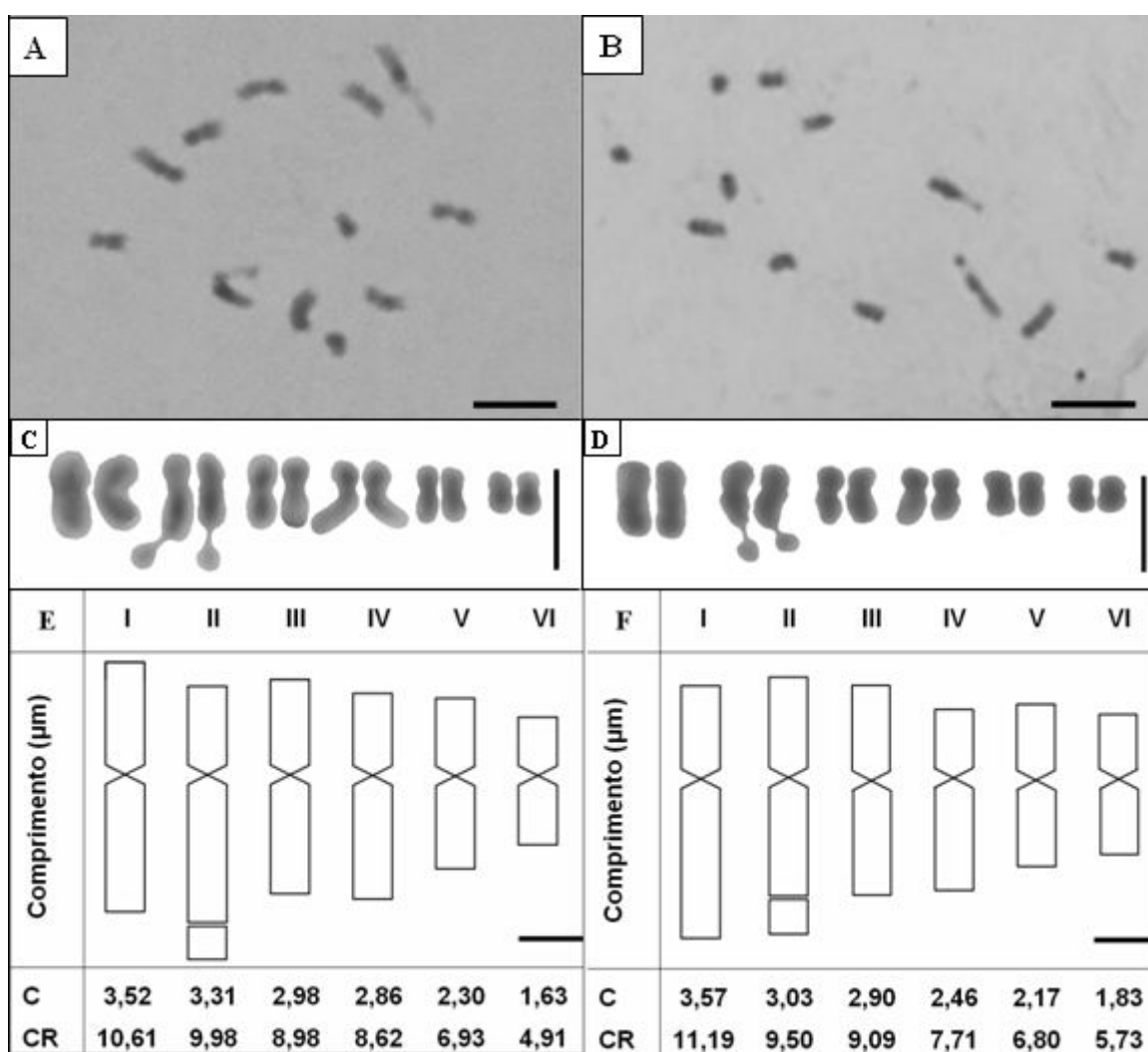
**Tabela 2-** Lista de *Primers* utilizados nas reações de PCR. PA, *primers* desenhados para *P. alata* (Pádua, 2004); PE, *primers* desenhados para *P. edulis* (Oliveira, 2006); T.A., temperatura de anelamento.

<b>Seqüências dos Primers</b>			
<b>Código</b>	<b>T. A.</b>	<b>Primer forward</b>	<b>Primer reverse</b>
PA04	58 °C	GGGCGGAAGAAAAGAGAAG	GAAACACACGATGCGAAAA
PA05	58 °C	GGAAGTGAAGGAGAAGAAGA	CCCTCTGGTTGTCTACCTAC
PA06	58 °C	TAACCGACTTCGCCACA	GAGCAGGGGAAGAAAAGGA
PA07	58 °C	CACATTTGCCGTCCTGG	CGGCATACGATAAATCTCCTG
PE04	60 °C	ATGCTTTTGAAATCCGTTT	TGCTCATGCAAAGTCACTGG
PE07	60 °C	TGCTCATTGATGGTGCTTG	TCGTCTCTTCTCCTCCTTCA
PE09	60 °C	GGGCCTTTATCCATGTTTGA	GGAAATCCGAAAACCTGGTTG
PE19	52 °C	GCATAAGTTGTCGGTCTTGG	CCTCGAACCTCTATCATCCA
PE37	60 °C	CAAAGGATAGGCCTGATGTC	TGCTTGGTCATCCACTGAAG
PE54	60 °C	TGGTGTGTGTGGGTGATTAG	CATTCTCCTGCCACCTGAGT
PE66	60 °C	CCATAGTCCCAACAAGCATC	GCTGTGGACCCTAACTCAGTC
PE75	60 °C	CACAATCGGTGGGAAAGATA	GTAGTTTTGGGCAGTTTGC

## Resultados

### Estudos citogenéticos

*Passiflora capsularis* e *P. rubra* apresentaram  $2n = 12$  (Fig. 1 A-B). Os cariótipos de ambas as espécies apresentaram 8 cromossomos metacêntricos, 4 submetacêntricos, com satélites no braço longo do segundo par cromossômico (Fig. 1 C-F). Os pares portadores de satélites divergiram na classificação, pois em *P. capsularis* o segundo par cromossômico foi classificado como submetacêntrico e em *P. rubra* classificado como metacêntrico.



**Figura 1** – Análises em cromossomos mitóticos de espécies de *Passiflora*. **A, C, E**) *P. capsularis*. **B, D, F**) *P. rubra*. **A-B**) Metáfases demonstrando  $2n = 12$  (Barra = 5 µm). **C-D**) Cariogramas (Barra = 5 µm). **E-F**) Ideogramas evidenciando os valores médios do comprimento total (C) e do comprimento relativo (CR) de cada cromossomo (Barra = 1 µm).

Os valores médios dos comprimentos cromossômicos, razão entre braços e classificação em metacêntrico e submetacêntrico são apresentados na Tabela 3. A variação



do comprimento cromossômico entre o primeiro e o último par de cromossomos foi de 46,3% em *P. capsularis* e 51,2% em *P. rubra*. As análises de variância entre os pares cromossômicos dentro de cada espécie (Tabela 5) mostraram não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Já a ANOVA para o comprimento cromossômico dentro e entre as espécies (Tabela 4) demonstrou haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a característica. As fórmulas cariotípicas, comprimento médio dos cromossomos ( $\chi$ ), posição dos microssatélites (tipo e localização), comprimento do lote haplóide (CLH) e índice de assimetria cromossômica (TF%) são apresentados na Tabela 6. Os valores de TF% foram muito próximos, impossibilitando inferências sobre as derivações das espécies.

**Tabela 3** – Morfometria cromossômica ds espécies *P. capsularis* e *P. rubra*, evidenciando o comprimento médio do braço longo (BL), braço curto (BC), satélite (SAT), comprimento absoluto (CT), comprimento relativo (CR) e razão entre os braços (r) e classificação (CLASS) dos cromossomos segundo o posicionamento do centrômero, em metacêntrico (m) e submetacêntrico (sm).

Espécies		Média ± Desvio Padrão					
		1	2	3	4	5	6
<i>P. capsularis</i>	BC	<b>1,57</b> ±0,14	<b>1,20</b> ±0,09	<b>1,31</b> ±0,03	<b>1,11</b> ±0,02	<b>1,04</b> ±0,08	<b>0,73</b> ±0,08
	BL	<b>1,96</b> ±0,09	<b>2,11</b> ±0,22	<b>1,67</b> ±0,04	<b>1,75</b> ±0,08	<b>1,26</b> ±0,03	<b>0,90</b> ±0,03
	SAT	-	<b>0,51</b> ±0,01	-	-	-	-
	CA	<b>3,52</b> ±0,05	<b>3,31</b> ±0,13	<b>2,98</b> ±0,07	<b>2,86</b> ±0,10	<b>2,30</b> ±0,04	<b>1,63</b> ±0,04
	CR	10,61%	9,98%	8,98%	8,62%	6,93%	4,91%
	r	1,25	1,76	1,27	1,58	1,21	1,23
	CLASS	m	sm	m	sm	m	m
<i>P. rubra</i>	BC	<b>1,27</b> ±0,01	<b>1,38</b> ±0,03	<b>1,30</b> ±0,04	<b>0,90</b> ±0,04	<b>1,00</b> ±0,09	<b>0,84</b> ±0,84
	BL	<b>2,30</b> ±0,06	<b>1,66</b> ±0,07	<b>1,60</b> ±0,09	<b>1,57</b> ±0,13	<b>1,17</b> ±0,04	<b>1,00</b> ±0,09
	SAT	-	<b>0,52</b> ±0,03	-	-	-	-
	CA	<b>3,57</b> ±0,04	<b>3,03</b> ±0,04	<b>2,90</b> ±0,04	<b>2,46</b> ±0,08	<b>2,17</b> ±0,04	<b>1,83</b> ±0,04
	CR	11,19%	9,50%	9,09%	7,71%	6,80%	5,73%
	r	1,81	1,20	1,23	1,74	1,17	1,19
	CLASS	sm	m	m	sm	m	m

**Tabela 4** – Resumo da ANOVA para a característica de comprimento dos cromossomos dentro das espécies *P. capsularis* e *P. rubra* e CLH entre *P. capsularis* e *P. rubra* ( $2n = 12$ ).

FV	GL		QM		CV%
	Tratamento	Erro	Tratamento	Erro	
<i>P. capsularis</i>	4	6	0,475*	0,007	4,57
<i>P. rubra</i>	4	6	0,204*	0,011	7,19
Entre as espécies	1	22	0,944*	0,159	23,77

FV, Fonte de variação; GL, graus de liberdade; QM, quadrados médios. \*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

**Tabela 5** – Resumo da ANOVA para o comprimento de cada par cromossômico dentro das espécies *P. capsularis* e *P. rubra*.

FV	GL	QM					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6
<i>P. capsularis</i>	4	0,0009 <sup>NS</sup>	0,0025 <sup>NS</sup>	0,0023 <sup>NS</sup>	0,0023 <sup>NS</sup>	0,0007 <sup>NS</sup>	0,0007 <sup>NS</sup>
Erro	5	0,0046	0,0187	0,0063	0,0117	0,0054	0,0056
CV		1,92	4,13	2,67	3,78	3,21	4,58
<i>P. rubra</i>	4	0,0059 <sup>NS</sup>	0,0003 <sup>NS</sup>	0,0009 <sup>NS</sup>	0,0011 <sup>NS</sup>	0,0032 <sup>NS</sup>	0,0028 <sup>NS</sup>
Erro	5	0,0049	0,0024	0,0048	0,0089	0,0054	0,0023
CV		1,98	1,61	2,40	3,83	3,39	2,56

FV, Fonte de variação; GL, graus de liberdade; QM, quadrados médios. <sup>NS</sup> não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

**Tabela 6** – Fórmulas cariotípicas, comprimento médio dos cromossomos ( $\chi$ ), posição dos microssatélites (SAT, localização no braço, par cromossômico e tipo de satélite), comprimento do lote haplóide (CLH) e índice de assimetria cromossômica (TF%) em *P. capsularis* e *P. rubra*

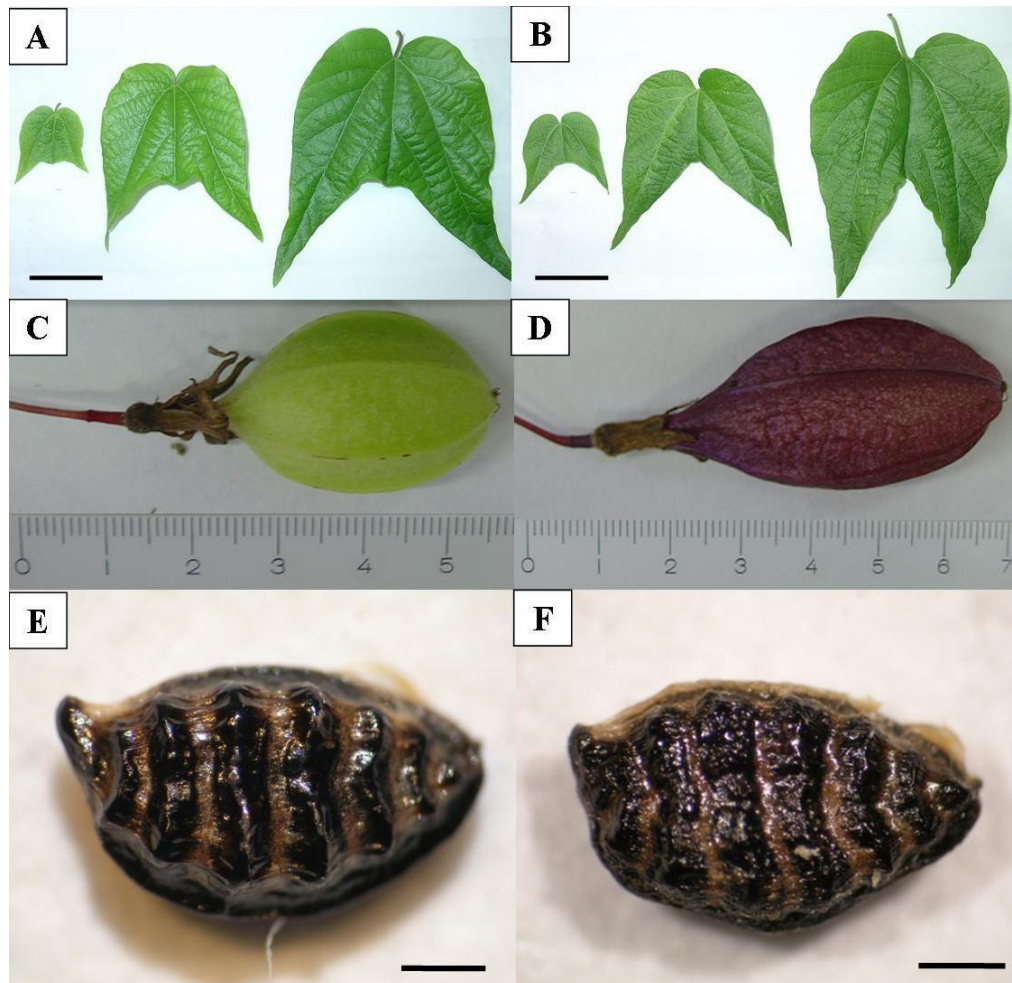
Espécies ( $2n = 12$ )	Fórmula cariotípica	$\chi$ ( $\mu\text{m}$ )	SAT	CLH	TF%
<i>P. capsularis</i>	8m + 4sm	2,77	BL/2/Micro	33,15	41,87%
<i>P. rubra</i>	8m + 4sm	2,66	BL/2/Micro	31,98	41,83%

\* m: metacêntrico; sm: submetacêntrico; BL: braço longo; Micro: microssatélites, de acordo com a classificação de Battaglia (1955)

## Estudos morfológicos

As formas das folhas, frutos e sementes de *Passiflora capsularis* e *P. rubra* são demonstradas na Fig. 2. Os valores médios obtidos para cada característica analisada são apresentados nas Tabelas 6 e 7. *P. capsularis* apresentou médias superiores para quase todos os descritores usados, exceto para as variáveis índice

foliar, lúmen, peso total das sementes, número de sementes e espessura das sementes (Figs. 4 e 5). As variáveis que mais se diferenciaram entre as espécies foram PFr (11,012 e 4,362 g), AFo (69,1 e 23,15), DEFr (26,47 e 20,01), PT (0,2602 e 0,5781), NS (62 e 159), Ma (4,46 e 4,06), LC (7,10 e 6,23), CFo (78,21 e 70,90), considerando-se *P. capsularis* e *P. rubra*, respectivamente.



**Figura 2** – Folhas, frutos e sementes de espécies de *Passiflora*. **A, C, E)** *P. capsularis*. **B, D, F)** *P. rubra*. **A-B)** Folhas em diferentes estádios de maturação (Barra = 3 cm). **C-D)** Frutos maduros. **E-F)** Sementes (Barra = 1 mm).

**Tabela 6.** Valores médios para caracteres morfológicos de folhas, sementes, frutos e de grãos de pólen em *P. capsularis*, considerando-se quatro repetições. DM: descritores morfológicos.

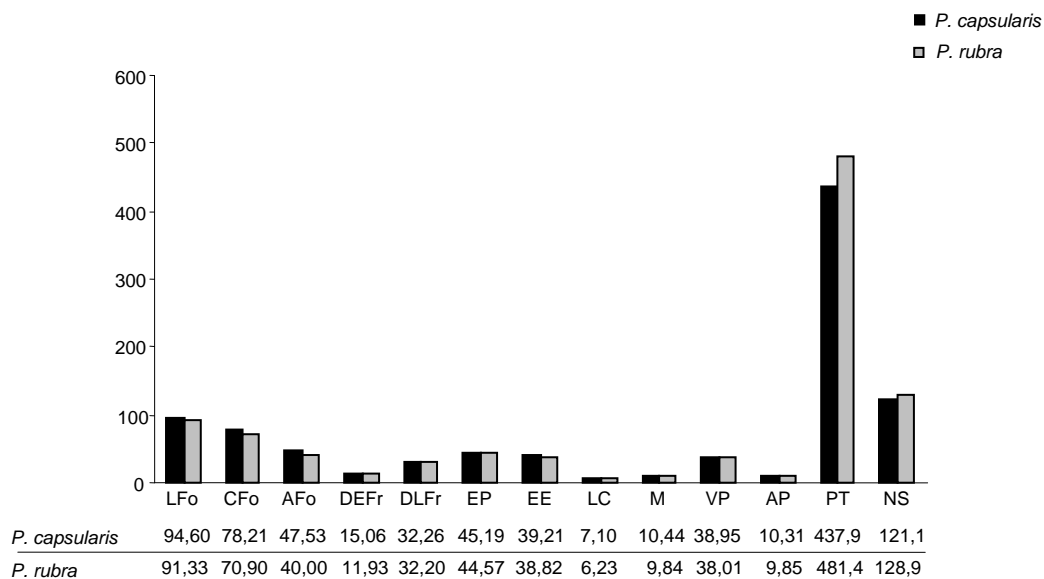
Análises em:	Média ± Desvio Padrão								
	DM*	1		2		3		4	
Folhas	<b>CFo</b>	78,37	±6,94	71,64	±4,29	84,60	±5,19	78,20	±6,01
	<b>LFo</b>	89,23	±6,00	83,47	±5,66	107,29	±6,78	98,40	±4,92
	<b>AFo</b>	46,19	±6,85	35,78	±3,76	61,92	±5,59	46,21	±5,64
Frutos	<b>DEFr</b>	24,37	±0,62	21,59	±1,39	24,85	±1,40	22,01	±2,53
	<b>DLFr</b>	52,91	±2,27	46,93	±8,39	51,00	±0,12	47,52	±6,68
	<b>IFr</b>	2,17	±0,14	2,16	±0,25	2,05	±0,10	2,15	±0,11
	<b>PFr</b>	9,85	±0,96	7,66	±1,37	8,98	±1,53	8,13	±1,53
Sementes	<b>CS</b>	3,25	± 0,05	3,11	± 0,12	3,14	± 0,04	3,01	± 0,06
	<b>LCS</b>	1,80	± 0,02	1,82	± 0,05	1,72	± 0,03	1,72	± 0,03
	<b>CS/LC</b>	1,80	± 0,02	1,74	± 0,05	1,72	± 0,03	1,74	± 0,04
	<b>LP</b>	1,05	± 0,08	1,17	± 0,05	1,20	± 0,06	1,10	± 0,12
	<b>LD</b>	1,21	± 0,04	1,24	± 0,05	1,24	± 0,04	1,21	± 0,05
	<b>LA</b>	0,14	± 0,03	0,15	± 0,02	0,16	± 0,01	0,16	± 0,01
	<b>LE</b>	0,40	± 0,02	0,39	± 0,05	0,36	± 0,01	0,40	± 0,02
	<b>CH</b>	0,38	± 0,03	0,36	± 0,03	0,34	± 0,01	0,32	± 0,01
	<b>Orn</b>	0,16	± 0,01	0,14	± 0,01	0,16	± 0,02	0,15	± 0,01
	<b>PI</b>	0,003	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
	<b>PT</b>	0,47	± 0,12	0,42	± 0,12	0,42	± 0,04	0,41	± 0,10
	<b>NS</b>	132,2	± 40,67	120,6	± 21,17	110	±31,02	121,6	±13,29
	<b>ESP</b>	1,20	± 0,09	1,19	± 0,03	1,17	± 0,11	1,15	± 0,06
Grãos de pólen	<b>EE</b>	36,36	± 2,18	40,12	± 1,21	39,48	± 3,40	40,88	± 2,96
	<b>EP</b>	42,71	± 0,99	44,64	± 2,96	45,80	± 4,71	47,58	± 2,13
	<b>LC</b>	6,49	± 0,99	7,09	± 1,61	7,68	± 0,82	7,15	± 1,27
	<b>M</b>	11,19	± 1,69	10,08	± 0,91	10,51	± 1,66	9,95	± 1,55
	<b>VP</b>	39,41	± 2,80	38,65	± 2,31	39,59	± 2,23	38,12	± 1,92
	<b>AP</b>	10,37	± 0,87	10,38	± 1,06	9,93	± 1,17	10,53	± 0,55
	<b>I.A.P</b>	0,26	± 0,02	0,26	± 0,02	0,25	± 0,03	0,27	± 0,01
	<b>P/E</b>	1,17	± 0,04	1,11	± 0,06	1,16	± 0,14	1,16	± 0,05
	<b>Mu</b>	0,75	± 0,10	0,84	± 0,05	0,64	± 0,12	0,82	± 0,05
	<b>Lu</b>	3,18	± 0,37	3,52	± 0,46	3,31	± 0,45	3,39	± 0,57
	<b>Ma</b>	3,91	± 0,64	4,42	± 0,65	3,91	± 0,63	4,00	± 0,52

\*Siglas listadas na Tabela 1.

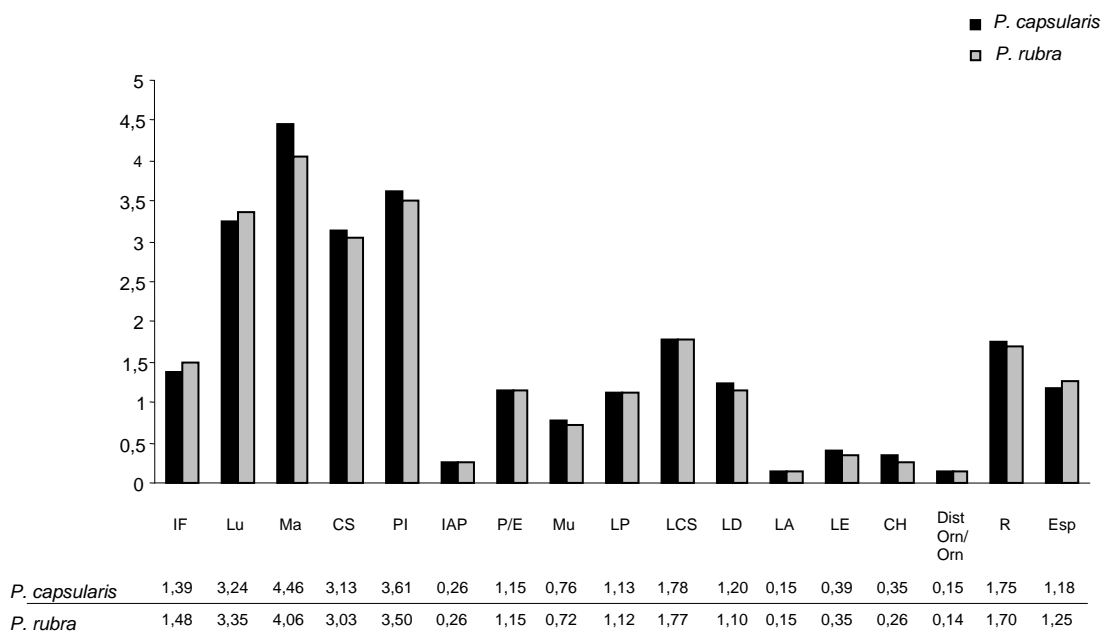
**Tabela 7.** Valores médios para caracteres morfológicos de folhas, sementes, frutos e de grãos de pólen em *P. rubra*, considerando-se quatro repetições. DM: descritores morfológicos.

Análises em:	Média ± Desvio Padrão								
	DM*	1		2		3		4	
Folhas	<b>CFo</b>	74,64	±5,11	66,23	±7,19	69,21	±2,90	73,51	±2,81
	<b>LFo</b>	95,75	±4,75	81,42	±4,82	86,09	±4,02	102,0	±4,47
	<b>AFo</b>	45,95	±3,73	33,87	±6,61	39,63	±4,52	40,55	±3,26
Frutos	<b>DEFr</b>	22,09	±1,47	20,38	±0,29	22,20	±0,77	21,33	±1,86
	<b>DLFr</b>	58,19	±1,39	59,35	±0,31	58,75	±0,83	58,24	±0,91
	<b>IFr</b>	2,63	±0,11	2,91	±0,05	2,65	±0,13	2,73	±0,19
	<b>PFr</b>	6,98	±1,02	6,19	±1,63	7,03	±1,21	6,64	±0,49
Sementes	<b>CS</b>	2,99	± 0,07	3,04	± 0,11	3,03	± 0,05	3,08	± 0,11
	<b>LCS</b>	1,78	± 0,04	1,78	± 0,07	1,79	± 0,02	1,74	± 0,08
	<b>CS/LC</b>	1,67	± 0,01	1,70	± 0,06	1,69	± 0,02	1,78	± 0,02
	<b>LP</b>	1,07	± 0,07	1,16	± 0,10	1,14	± 0,07	1,12	± 0,18
	<b>LD</b>	1,14	± 0,04	1,16	± 0,06	1,19	± 0,05	1,10	± 0,07
	<b>LA</b>	0,14	± 0,02	0,15	± 0,01	0,17	± 0,02	0,15	± 0,02
	<b>LE</b>	0,34	± 0,03	0,39	± 0,03	0,36	± 0,01	0,34	± 0,02
	<b>CH</b>	0,27	± 0,01	0,27	± 0,04	0,26	± 0,02	0,26	± 0,02
	<b>Orn</b>	0,14	± 0,02	0,15	± 0,01	0,13	± 0,01	0,13	± 0,01
	<b>PI</b>	0,003	± 0,00	0,00	± 0,00	0,001	± 0,00	0,003	± 0,00
	<b>PT</b>	0,51	± 0,06	0,45	± 0,05	0,50	± 0,02	0,47	± 0,08
	<b>NS</b>	148,6	± 9,91	134,4	± 13,16	122,8	± 18,98	110	± 20,95
	<b>ESP</b>	1,31	± 0,05	1,19	± 0,08	1,29	± 0,07	1,23	± 0,13
Grãos de pólen	<b>EE</b>	39,21	± 1,23	40,71	± 2,12	37,95	± 2,08	37,39	± 1,10
	<b>EP</b>	42,18	± 1,41	45,52	± 1,99	43,16	± 2,20	47,42	± 1,34
	<b>LC</b>	6,05	± 1,08	6,86	± 0,42	5,91	± 1,32	6,11	± 0,86
	<b>M</b>	10,38	± 0,88	10,15	± 1,32	9,59	± 0,71	9,24	± 0,82
	<b>VP</b>	37,55	± 0,60	37,52	± 1,82	37,86	± 1,39	39,10	± 2,36
	<b>AP</b>	9,20	± 0,73	9,74	± 1,58	10,16	± 1,44	10,32	± 0,65
	<b>I.A.P</b>	0,24	± 0,01	0,25	± 0,03	0,27	± 0,04	0,26	± 0,02
	<b>P/E</b>	1,07	± 0,06	1,11	± 0,04	1,14	± 0,05	1,26	± 0,02
	<b>Mu</b>	0,74	± 0,14	0,74	± 0,11	0,73	± 0,11	0,67	± 0,11
	<b>Lu</b>	3,28	± 0,49	3,35	± 0,30	3,10	± 0,37	3,24	± 0,52
	<b>Ma</b>	4,63	± 0,60	4,82	± 0,32	4,02	± 0,32	4,38	± 0,49

\*Siglas listadas na Tabela 1.



**Figura 3** – Gráfico com representando os valores médios para características de morfologia de folha, fruto, grãos de pólen e sementes em *Passiflora capsularis* e *P. rubra*.

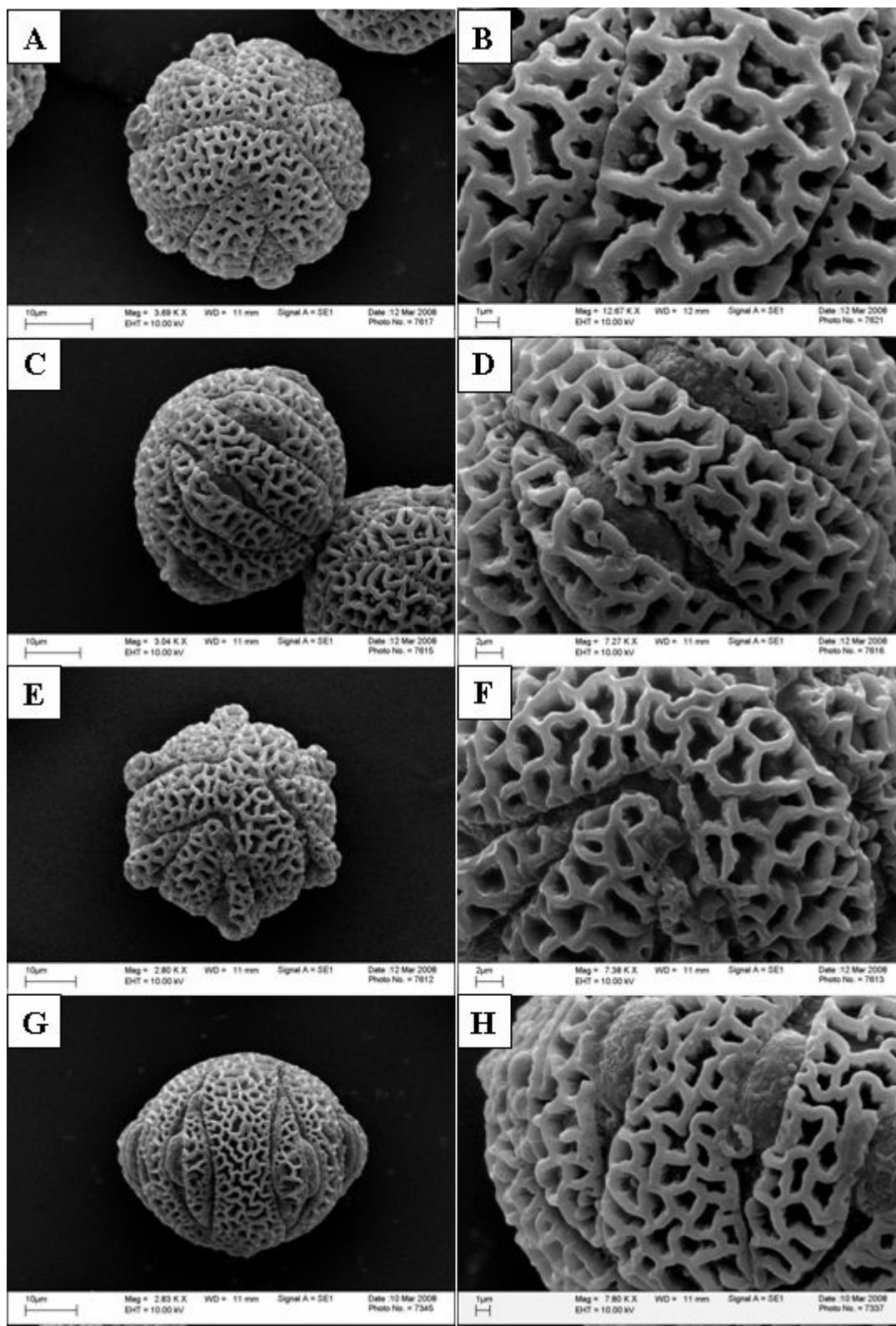


**Figura 4** – Gráfico com representando os valores médios para características de morfologia dos grãos de pólen e semente em *Passiflora capsularis* e *P. rubra*.

*Passiflora capsularis* e de *P. rubra* apresentaram grãos de pólen isopolares, prolato-esferoidais, âmbito circular, área polar muito pequena, 12-colporados, colpos muito longos a longos, endoaberturas alongadas e exina heteroreticulada (Fig. 3).

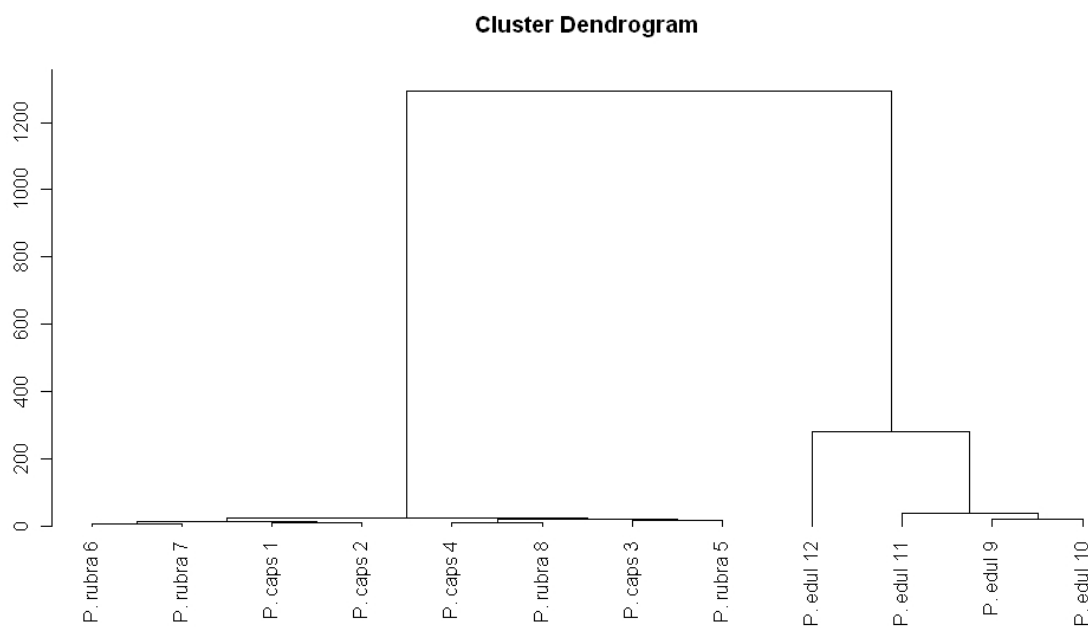
Os valores médios obtidos para cada variável analisada nos grãos de pólen são apresentados nas Tabelas 6 e 7 e podemos observar que o comprimento do EP e EE apresentaram uma pequena variação, sendo considerada não significativa entre as espécies. Os valores médios encontrados para EP e EE variaram de 39,21 a 38,82  $\mu\text{m}$  em *P. capsularis* e de 45,19 a 44,57  $\mu\text{m}$  em *P. rubra*. A LC variou de 6,23  $\mu\text{m}$  em *P. rubra* a 7,10  $\mu\text{m}$  em *P. capsularis*, sendo considerados estreitos para ambas as espécies. Os valores encontrados para o M e AP foram de 10,44 e 10,31  $\mu\text{m}$  em *P. capsularis* e 9,84 e 9,58  $\mu\text{m}$  em *P. rubra*, apresentando pouca diferença. Já parâmetros de VP, IAP e P/E, apresentaram os mesmos valores entre as espécies estudadas. O retículo não apresentou diferenças nas dimensões de Mu e Lu, somente Ma apresentou valores diferenciados entre as espécies com 4,46  $\mu\text{m}$  em *P. capsularis* e 4,06  $\mu\text{m}$  em *P. rubra*. Os muros são sinuosos, altos (ca. 0,7  $\mu\text{m}$ ) e estreitos em ambas as espécies formando lúmens maiores, e apenas em *P. capsularis* foi observado a presença de báculos no interior do lúmen, sendo visualizado na Fig. 5 B.



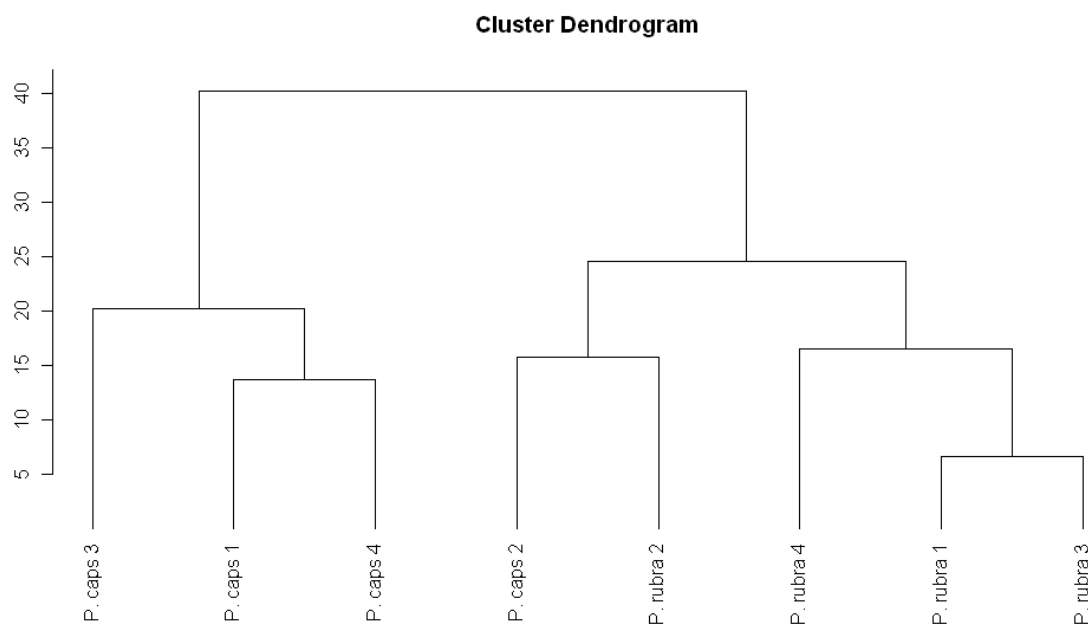


**Figura 5** – Grãos de pólen de espécies de *Passiflora*. **A - D)** *P. capsularis*. **A)** Vista polar (Barra = 10  $\mu$ m). **B)** Detalhe da ornamentação da parede (Barra = 1  $\mu$ m). **C)** Vista equatorial (Barra = 10  $\mu$ m). **D)** Detalhe das aberturas do pólen colporado (Barra = 2  $\mu$ m). **E - H)** *P. rubra*. **E)** Vista polar (Barra = 10  $\mu$ m). **F)** Detalhe da ornamentação (Barra = 2  $\mu$ m). **G)** Vista equatorial (Barra = 10  $\mu$ m). **H)** Detalhe das aberturas do pólen colporado (Barra = 1  $\mu$ m).

A análise de agrupamento baseou-se nos descritores morfológicos de folhas, sementes, frutos e pólen, e foi classificado segundo a distância de Mahalanobs pelo método de UPGMA (Fig. 6) e Ward. Utilizou-se um grupo externo (*P.edulis* Sims) como parâmetro. Não foi observada nítida separação entre os genótipos de *P. capsularis* e *P. rubra*, mesmo com um alto índice de correlação cofenética (0,96), que confirmou a eficiência destes descritores para a classificação das espécies. Foi, então, realizada outra análise de agrupamento, agora utilizando apenas as características divergentes entre ambas as espécies (Fig. 7), mas novamente não foi possível observar uma separação de ambos os táxons, com índice de correlação cofenética mais baixo, 0,66.



**Figura 6** - Dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA, com descritores morfológicos da folha, sementes, fruto e grãos de pólen das espécies *P. capsularis*, *P. rubra* e *P. edulis* (grupo externo). Índice de Correlação Cofenética (CCC) de 0,96.



**Figura 7** - Dendrograma utilizando o método de agrupamento UPGMA, com as variáveis morfológicas divergentes (PFr, AFo, DEFr, PT, NS, Ma, e CFo) entre as espécies *P. capsularis* e *P. rubra*. Índice de Correlação Cofenética (CCC) de 0,66.

### Estudos moleculares

Para as análises moleculares utilizando os marcadores microssatélite, foram utilizados 12 pares *primers* (Tabela 02), porém apenas 10 geraram produto de amplificação. Destes, apenas um (*Pa 06*) amplificou somente para *P. capsularis* e dois deles (*Pa 05* e *Pe 19*) amplificaram apenas para *P. rubra*. Sete *primers* (*Pa04*, *Pa07*, *Pe04*, *Pe07*, *Pe 37*, *Pe 54* e *Pe 66*) amplificaram para ambas as espécies. Resultado dos 7 *primers* que geraram produtos de amplificação, Dos *primers* amplificados, a maioria das bandas apresentou caracter monomórfico (Fig. 8), o que corrobora com os dados citogenéticos e morfológicos demonstrando que as duas espécies apresentam alta similaridade taxonômica.



**Figura 8-**Gel de agarose de alta resolução (3%), mostrando os produtos de PCR amplificados com o *Primer Pe66* utilizando os DNAs de *P. capsularis* e *P. rubra*, respectivamente. M, marcador de 50pb na raia 1, 14 e 27; nas raia de 2 a 13 (C1-C12), amostras de *P. capsularis*; e de 15 a 26 (R1-R12), amostras de *P. rubra*.

## Discussão

### Estudos citogenéticos

Os estudos mais simples em citogenética envolvem número cromossômico e esses, por sua vez, vêm auxiliando na identificação do grau de relação entre as espécies (Levin 2002). De acordo com Soares-Scott et al. (2005), o conhecimento do número cromossômico ainda é muito restrito em espécies de *Passiflora*.

Algumas características do cariótipo, como a razão entre os braços ( $r$ ), comprimento do lote haplóide (CLH), comprimento médio dos cromossomos ( $\chi$ ) e índice de simetria cariotípica (TF%), assim como a presença de satélites (SAT), revelam características comuns ao gênero *Passiflora*, como cariótipo padrão de cromossomos com centrômeros medianos e submedianos, e variação intra e interespecífica quanto à presença e posicionamento de satélites (Soares-Scott 1998; Melo e Guerra 2001; Souza et al. 2003; Vieira et al. 2004; Cuco et al. 2005; Soares-Scott et al. 2005; Souza et al. 2008). Segundo Vieira et al. (2004), os cariótipos dentro de um mesmo subgênero ou secção são similares, como pôde ser observado no subgênero *Granadilla*.

Alguns estudos citogenéticos foram realizados em *P. rubra* e *P. capsularis*. O número cromossômico  $2n = 12$  foi estabelecido para *P. capsularis* por Bowden (1945), Beal (1971), Snow e MacDougal (1993), Vieira et al. (2004) e Melo et al. (2001), e para *P. rubra* por Snow e MacDougal (1993) e Melo et al. (2001). Estudos cariotípicos mais detalhados não estão disponíveis para essas espécies. Apenas para *P. capsularis*, observou-se o comprimento do lote haplóide (CLH) de 8,03  $\mu\text{m}$  e TF% de 39,55 (Vieira et al. 2004). Tais resultados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, já que o CLH em *P. capsularis* foi de 8,3 e o TF% foi de 41,87. Melo et al. (2001) realizaram estudos cromossômicos em *P. capsularis* e *P. rubra*, onde os cromossomos foram classificados como metacêntricos e submetacêntricos, mas os valores em  $\mu\text{m}$  não foram apresentados pelos autores.

Passos (2007) realizou análises para delimitação entre as espécies *P. galbana* Mast. e *P. mucronata* Lam., utilizando marcadores moleculares, dados morfométricos e citogenéticos. Os resultados cariomorfológicos apresentados pela autora mostraram diferenças significativas entre as espécies, como menor número de satélites apresentado em *P. galbana*, localização em pares e em braços cromossômicos diferentes. Enquanto o cariótipo de *P. mucronata* é constituído por cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, o de *P. galbana* apresenta cromossomos exclusivamente

metacêntricos, porém com maior índice de assimetria. Passos (2007) também observou diferença na quantidade de bandas CMA/DAPI, onde uma vez que em *P. mucronata* os cromossomos apresentaram bandas DAPI<sup>-</sup>, CMA<sup>+</sup> (5 bandas) e CMA<sup>-</sup>, enquanto que em *P. galbana* observou-se apenas bandas CMA<sup>+</sup> (4 bandas).

Neste estudo, os cariótipos de *P. capsularis* e de *P. rubra* não apresentaram diferenças significativas, mas apenas os pares cromossômicos portadores de satélites apresentaram posições centroméricas diferentes, sendo submetacêntricos em *P. capsularis* e metacêntricos em *P. rubra*. Tal fato pode ter ocorrido ao longo da evolução devido a rearranjos estruturais, que podem ser detectados por meio destas diferenças no tamanho relativo, posição do centrômero, número, tamanho e posição de satélites (Passos 2007). Segundo Souza (2002), as análises meióticas em *Passiflora* tem demonstrado a presença de associações multivalentes e pontes cromossômicas, que podem refletir em mudanças estruturais, como inversões, translocações, deleções e duplicações, possivelmente representando importante fonte de variabilidade nessas espécies.

Análises cariotípicas em passifloras silvestres têm indicado polimorfismo intra e interespecíficas em relação à variação na posição do centrômero, levando a cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e cariótipos simétricos variáveis (Melo et al. 2001; Souza et al. 2003). Além de apresentar variação no número e comprimento dos cromossomos, outras variações são observadas em passifloras, quanto ao número e posição de satélites, e presença de constrição secundária (Snow e MacDougal 1993; Souza et al. 2003).

Snow e MacDougal (1993) observaram que a espécie *P. capsularis* e *P. rubra* apresentaram um par de constrições secundárias acompanhadas de satélites, enquanto Vieira et al. (2004) observaram dois pares de constrições secundárias, mas apenas um par acompanhado de satélites. Tais polimorfismos podem tratar-se de uma variação genética entre as populações, gerando variação cariotípica intra-específica em consequência de rearranjos estruturais, e que podem significar a resposta desses genomas aos diferentes ambientes, como observado em espécies de *Crotalaria* (Palomino e Vazquez, 1991).

De acordo com Vieira et al. (2004), estudos cariomorfológicos permitem comparações entre categorias taxonômicas relacionadas, com mesmo número cromossômico, e assim detectar possíveis variações existentes, principalmente no comprimento dos cromossomos, na posição do centrômero, na presença de satélites e

construções secundárias; permitem ainda inferir sobre o conteúdo de DNA comparando-se o tamanho absoluto dos cromossomos. Os autores relatam ainda que, além disso, a análise do cariótipo permite observar a existência ou não de rearranjos estruturais dos cromossomos, uma vez que variações morfológicas podem admitir diferentes alterações ao nível de cromossomos.

Similaridades foram observadas para as duas espécies utilizando-se técnicas de bandamento e citogenética molecular. Técnicas de bandamento CMA/DAPI revelaram um único bloco CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> na heterocromatina do maior par de cromossomos em ambas as espécies, embora os blocos CMA<sup>+</sup> tenham corado fracamente em *P. rubra* (Melo et al., 2001). Estudos de FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) realizados nessas espécies revelaram para ambas dois sites de rDNA 5S subterminais e dois sites de rDNA 45S também subterminais (Melo e Guerra 2003).

O número gamético  $n = 6$  foi estabelecido para as duas espécies por Souza (2002). Estudos meióticos comparativos entre as duas espécies também foram realizados por Souza (2002), que demonstraram haver grande similaridade no comportamento meiótico de *P. capsularis* e *P. rubra*. O percentual de configurações de pareamento cromossômico encontrados na diacinese em *P. capsularis* foi de 87,6 % de 6 II, enquanto *P. rubra* apresentou 91,4 % de células com 6 II. Em relação ao número total de quiasmas observados por célula, *P. capsularis* apresentou, em média, 5,7 quiasmas, sendo 5,3 deles intersticiais e apenas 0,4 terminais, enquanto *P. rubra* apresentou, em média, 6,6 quiasmas, sendo 4,8 deles intersticiais e apenas 1,8 terminais. Os índices de recombinação foram de 11,70 em *P. capsularis* e de 12,60 em *P. rubra*. Segundo Souza (2002), tanto *P. capsularis* quanto *P. rubra* apresentaram irregularidades meióticas, como cromossomos retardatários na meiose I e II, pontes cromossômicas, principalmente na anáfase I, ausência de sincronismo na meiose II e formação irregular das fibras do fuso acromático na meiose II. Com base em estudos dos produtos pós-meioticos, o índice meiótico (%) estabelecido para *P. capsularis* e *P. rubra* foi de 95,2 e 92,8, respectivamente. Os estudos mitóticos e meióticos não revelaram diferenças significativas entre as duas espécies.

A viabilidade polínica foi estudada em *P. capsularis* e em *P. rubra* por Souza et al. (2004), utilizando-se solução de Alexander. Os resultados refletiram e ~~reflete~~ o alto índice meiótico encontrado. Em *P. capsularis*, 97,74% dos grãos de pólen analisados foram considerados viáveis, enquanto em *P. rubra*, 92,1% foram considerados viáveis. Em relação aos grãos de pólen inviáveis, dois tipos foram

observados: T1, grãos de pólen inviáveis vazios, associados a distúrbios ocorridos durante a microsporogênese, e T2, com citoplasma contraído, associados à distúrbio ocorridos durante a microgametogênese. As diferenças entre ambas as espécies não foram significativas.

### **Estudos morfológicos**

A taxonomia de *Passiflora* está baseada em diversos caracteres florais e vegetativos, levando a uma complexa subdivisão taxonômica em subgêneros, seções e séries. De acordo com Killip (1938), o gênero poderia ser subdividido em 22 subgêneros e dez seções, mas Escobar (1989) sugeriu mudanças nessa classificação, descrevendo um novo subgênero. Ambas as classificações foram baseadas somente em características morfológicas, especialmente de estrutura floral. Mais recentemente, as espécies de *Passiflora* foram classificadas por Feuillet e MacDougal (2003) em quatro categorias principais ou subgêneros: *Astrophea*, *Decaloba*, *Deidamioides* e *Passiflora*.

Estudos vêm sendo realizados em espécies de passiflora utilizando ferramentas da biologia molecular, tanto para fins de delimitação taxonômica (Muschner et al. 2003), quanto de processos de especiação (Lorenz-Lemke et al. 2005). Muschner et al. (2003), baseados na análise de duas seqüências de DNA não codificadoras (ITS do rDNA nuclear e espaçador intergênico *trnL-trnF* do cloroplasto) e uma codificadora (*rps4* do cloroplasto), sugeriram a redistribuição dos 12 subgêneros estudados (segundo a classificação de Killip 1938) para apenas três, devido à formação de três clados com altos valores de suporte estatístico (*bootstraps* > 99). Foram evidenciados diferentes tamanhos de ramos entre os três clados. O tempo de geração de cada espécie pode estar envolvido na diferença encontrada entre dois dos clados (*Passiflora* e *Decaloba*). Apesar da pouca informação sobre fatores ecológicos que possam estar envolvidos nesse processo, Benson et al. (1975) foram os primeiros a afirmar que espécies do subgênero *Decaloba* de Killip (1938), pertencente ao clado *Decaloba* de Muschner et al. (2003), apresentam tempo de geração mais curto que espécies do subgênero *Passiflora*, componente do clado *Passiflora* de Muschner et al. (2003). É possível que este fator possa estar acelerando a taxa evolutiva nas espécies do subgênero *Decaloba*. Os resultados de Muschner et al. (2003) corroboraram perfeitamente com a nova classificação proposta por Feuillet e MacDougal (2003), podendo os clados observados serem nomeados como subgêneros.



Relacionando todos os descritores morfológicos quantitativos analisados em estudos de caracterização, observa-se a necessidade de uma seleção de descritores, considerando-se apenas as características de maior contribuição relativa para a divergência das análises (Singh 1981).

Araújo (2007), analisando a variabilidade entre os acessos de *P. cincinnata*, observou, por meio de análises estatísticas, diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre as médias dos acessos para todos os caracteres avaliados, evidenciando alta variabilidade entre os acessos de *P. cincinnata*, bem como o seu potencial para uso em programas de melhoramento visando à ampliação da base genética do maracujazeiro amarelo. O coeficiente de variação oscilou entre 4,1% e 12,9%, demonstrando existir boa precisão nos estudos. O mesmo autor utilizou as distâncias generalizadas de Mahalanobis, para medir o grau de dissimilaridade entre pares de acessos, e foi possível verificar que a maior distância foi observada entre os acessos 12-C0703 e 18-D0542 ( $D_2 = 598,57$ ) e a menor, entre os acessos 25-F2331 e 26-F2333 ( $D_2 = 17,87$ ) de *P. cincinnata*, o que significa que os acessos 12-C0703 e 18-D0542 são geneticamente os mais divergentes, e 25-F2331 e 26-F2333, os mais similares. Neste trabalho, utilizando-se o mesmo método de agrupamento para verificar as distâncias, não foi possível observar variabilidade entre os genótipos ou entre os acessos.

Outros descritores de importante valor taxonômico são àqueles referentes à morfologia polínica, que auxiliam a sistemática do gênero do gênero *Passiflora*. Presting (1965) descreveu os grãos de pólen de 153 espécies pertencentes a 13 gêneros de *Passiflora*, dentre elas *P. capsularis* e *P. rubra*. O autor apresentou um estudo aprofundado do sistema apertural e propôs uma filogenia para a família, baseado em características polínicas. Spirlet (1965) associou a taxonomia do gênero *Passiflora* com a morfologia dos grãos de pólen, mostrando que essa classificação segue as propostas evolutivas que têm sido apresentadas sobre as Passifloraceae.

Milward-de-Azevedo et al. (2004), descreveram os grãos de pólen de espécies de *Passiflora* como sendo 6-colporados (*P. misera*, *P. morifolia*, *P. organensis* e *P. suberosa*) ou 12-colporados (*P. capsularis* e *P. pohlii*), com os colpos livres, tendendo ao concrecimento aos pares ou de quatro em quatro em *P. capsularis*. Os resultados obtidos no presente estudo foram semelhantes aos encontrados por Presting (1965) e Milward-de-Azevedo et al. (2004) no que se refere ao formato do retículo, às características do lúmen e da exina. O número e tipo de abertura de *P. capsularis* também foram semelhantes. Neste estudo, os grãos de pólen de *P. capsularis* e *P. rubra*

apresentaram as mesmas características já descritas, excetuando-se as aberturas, que se apresentaram colporadas em ambas as espécies.

Huynh (1972) estudou o arranjo dos grãos de pólen de *Passiflora* ainda na fase de tétrade, procurando relacionar a organização dos colpos e mesocolpos em grãos de pólen livres com aqueles das tétrades pós-meióticas. O autor analisou cinco espécies, dentre elas *P. capsularis*. Esse autor considerou que *P. capsularis* possuía 12 colporos estreitos, com endoaberturas muito estreitas. Segundo o autor, o mesmo grão de pólen podia apresentar diferentes tamanhos de mesocolpo e esse fato estaria relacionado com a fase de tétrade, quando os micrósporos de cada par de micrósporos-irmãos estariam posicionados diametralmente opostos a um mesocolpo mais largo.

Em *P. capsularis* e *P. rubra* não foram encontradas diferenças significativas para separar essas espécies com base nos descritores polínicos, apenas duas variáveis foram divergentes, Ma e LC. De acordo com Milward-de-Azevedo et al. (2004), com base na morfologia polínica, as seções *Xerogona*, *Pseudodysosmia* e *Decaloba* podem ser diferenciadas pelas características da exina (retículos e lúmen) e pelo tipo de abertura. Estas seções diferem da seção *Cieca* por um conjunto de particularidades mais específicas, referentes à forma do pólen, ao diâmetro do lúmen e à composição dos retículos. E segundo os autores, as espécies da seção *Decaloba*, que compreende o maior número das espécies estudadas, também podem ser reunidas, a priori, com base em caracteres polínicos, nas mesmas séries que compõem atualmente a subdivisão sistemática do gênero como presença ou ausência de báculos livres no interior dos lúmens, comprimento do colpo e diâmetro do lúmen e do retículo.

### **Estudos moleculares**

Com resultados da caracterização de *P. capsularis* e *P. rubra* utilizando marcadores SSR, foi possível verificar que dos 12 *primers* testados, sete deles mostraram um padrão similar de amplificação, caracterizando ambas as espécies com bandas monomórficas. Já no trabalho de Anjos e Silva (2008), com apenas 3 pares de *primers* de SSR, foi possível observar o padrão polimórfico das oito cultivares de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*), revelando a eficiência da técnica de microssatélite na caracterização de genótipos, gerando ainda resultados que indicam essa técnica para uso em programas de melhoramento e identificação de cultivares.

De acordo com Salla et al. (2002), a caracterização entre espécies de acerola (*Malpighia emarginata*) demonstrou, em 24 genótipos, similaridade identificada por

marcadores gerados com primers SSR, sugerindo maior correlação com associações de caracteres morfológicos. Em alguns casos, a variação observada foi de difícil interpretação, devido à ausência de uma caracterização morfológica detalhada de muitos dos acessos incluídos em tal estudo.

Locos microssatélites são uma das melhores classes de marcadores moleculares para estudos de processos genéticos em populações naturais (Fernandez 2000). Estudos têm mostrado a possibilidade da utilização de *primers* de uma espécie para espécies distintas dentro do mesmo gênero (Pádua 2004) ou mesmo de gêneros diferentes de uma mesma família (Roa et al. 2000). Esta característica dos microssatélites é denominada como transferibilidade ou amplificação heteróloga. A transferibilidade entre espécies aparentadas é possível graças à natureza homóloga da sequência de nucleotídeos das regiões flanqueadoras (Pádua 2004).

Os *primers* microssatélites utilizados neste trabalho auxiliaram na delimitação entre as espécies, porém foram desenhados para as espécies *P. alata* e *P. edulis*, ambas as espécies não pertencem ao subgênero *Decaloba* e sim ao subgênero *Passiflora*, e mesmo assim a taxa de transferibilidade foi de 83,3%. A literatura tem descrito altas taxas de transferibilidade de locos SSR entre espécies arbóreas aparentadas: *Fabaceae* (Dayanadan et al. 1997), *Meliaceae* (White e Powell 1997), espécies do gênero *Eucalyptus* (Brondani et al. 1998) e *Caryocar* (Collevati et al. 1999). Tem sido detectado que quanto maior a distância genética entre as espécies, menor é o nível de transferibilidade e vice-versa (Steinkellner et al. 1997; Roa et al. 2000).

Cerqueira-Silva et al. (2008a) avaliaram a transferibilidade de 25 *primers* de SSR, desenvolvidos em '*Pe*' (*P. edulis* f. *flavicarpa*) para 13 espécies de passifloras (*P. cincinnata*, *P. coccinea*, *P. kermesina*, *P. gardineri*, *P. rubra*, *P. capsulares*, *P. misera*, *P. suberosa*, *P. nitida*, *P. watsoniana*, *P. bahienses*, *P. eichleriana* e *P. setacea*) e observaram um percentual de amplificação cruzada entre 32 e 76%, sendo que nove das 13 espécies apresentaram amplificação superior a 52%. Esses resultados mostraram que os *primers* desenvolvidos para identificar locos de SSR em *P. edulis* apresentam porcentagem considerável de amplificação cruzada com as espécies avaliadas. Já a amplificação cruzada utilizando *primers* SSR desenhados para *P. alata*, quando utilizados em *P. gardineri*, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. watsoniana* e *P. bahiensis*, resultaram em uma taxa percentual diferenciada de amplificação cruzada entre as espécies, na ordem de 86%, 86%, 57% e 29%, respectivamente. Esses resultados permitiram afirmar que os *primers* SSR desenvolvidos para *P. alata* por Pádua et al.

(2005) foram capazes de acessar locos SSR nas espécies avaliadas, via amplificação cruzada (Cerqueira-Silva et al. 2008b). Tal fato implica em confiabilidade nos estudos realizados em *P. capsularis* e *P. rubra*.

Em *P. capsularis* e *P. rubra* não foram encontradas diferenças significativas para diferenciar essas espécies com base em seqüências microssatélites, embora se saiba que as seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, o que permite a seleção de *primers* específicos que amplificam, via PCR, fragmentos contendo o DNA repetitivo em todos os genótipos (Bórem e Caixeta 2006). E quando os microssatélites são individualmente amplificados, usando o par de *primers* complementar às seqüências únicas que os flanqueiam, mostram invariavelmente extensivo polimorfismo para tamanho, mas esta variação no tamanho dos produtos de PCR é conseqüência da ocorrência de diferentes números de unidades repetidas dentro da estrutura do microssatélite (Bórem e Caixeta 2006).

Desse modo, vários alelos podem ser detectados para uma determinada população. Indivíduos homozigóticos possuem o mesmo número de repetições nos cromossomos homólogos, enquanto indivíduos heterozigóticos possuem número de repetições diferentes nos dois homólogos. Portanto, o loco é definido pelo par de *primers* e os vários alelos, pelo tamanho das bandas amplificadas (Ashkenazi et al. 2001).

## **Conclusão**

Os dados citogenéticos, morfológicos, e moleculares possibilitaram melhor caracterização taxonômica para as espécies em estudo. Embora *P. capsularis* e *P. rubra* possuam características fenotípicas diferentes, ambas podem se tratar de uma mesma espécie, sendo essas diferenças categorizadas em variedade dentro da espécie, podendo ser duas formas botânicas, à exemplo de *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*. Dessa maneira, concluímos que as espécies não puderam ser diferenciadas taxonomicamente pelas características analisadas.

## **Agradecimentos**

A autora agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e apoio financeiro, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pelo apoio financeiro à pesquisa, e ao pesquisador Dr. Vitor Osmar Becker, pela permissão de coleta na reserva RPPN Serra Bonita, Camacã – BA.

## Referências

- Anjos e Silva SD, Antunes, LEC, Anthonisen DG, Lemões JS, Gonçalves ED (2008) Caracterização de Genótipos de Mirtilo utilizando marcadores moleculares. Rev. Bras Frutic, v 30, n 1, p 180-184
- Araújo FP, Silva N, Queiróz MA, Melo NF (2006) Estabelecimento de acessos de *Passiflora cincinnata* Mast. por organogênese direta in vivo de segmentos radiculares In: Encontro de Genética do Nordeste, 17, 2006, Recife Conhecimentos para o novo milênio: [resumos] Recife : SBG, 2006 1 CD-ROM
- Ashkenazi V, Chani E, Lavi U, Levy D, Hillel J, Veilleux E (2001) Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses Genome, Ottawa, v 44, p 50-62
- Battaglia E (1955) Chromosome morphology and terminology. Caryologia, v 8, p 179-187
- Beal PR (1973) Cytology of native Australian and several exotic *Passiflora* species. 2. Chromosome morphology. Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences, v 30, n 1, p 17-18
- Bellon G, Faleiro FG, Junqueira KP, Junqueira NTV, Santos EC, Braga MF, Guimarães CT (2007) Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de *Passiflora edulis* Sims. com base em marcadores RAPD Revista Brasileira de Fruticultura, v 29, n 1, p 124-127
- Benson WW, Brown KS, Gilbert LE (1975) Coevolution of plant and herbivores: passion flower butterflies Evolution, v 29, p 659-680
- Borém A, Caixeta E (2006) Marcadores Moleculares Viçosa UFV 2006, 374.
- Bowden MW (1945) A list of chromosome numbers in higher plants II *Menispermaceae* to *Verbenaceae* American Journal of Botany v 32, p 191-201
- Buso GSC, Ciampi AY, Moretzsohn MC, Souza ZP (2003) Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. Circular técnica 20 Embrapa Cenargen, Brasília DF 11p
- Cerqueira-Silva CBM, Conceição LDHCS, Cardoso-Silva CB, Oliveira AC, Souza MM, Corrêa RX (2008) Amplificação cruzada de marcadores microssatélites (SSR) entre espécies de Maracujazeiro (*Passifloraceae Passiflora*) In: 54° Congresso Brasileiro de Genética, Resumos
- Cerqueira-Silva CBM, Conceição LDHCS, Cardoso-Silva CB, Branco SJ, Oliveira AC, Souza MM, Corrêa RX (2008) Amplificação cruzada de marcadores microssatélites (SSR) em espécies do gênero passiflora In: 20° Congresso Brasileiro de Fruticultura, 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, Resumos
- Cervi AC (2005) Espécies de *Passiflora* L. (*Passifloraceae*) publicadas e descritas nos últimos 55 anos (1950 –2005) na América do Sul e principais publicações brasileiras Estudos de Biologia, v 27, n 61, p 19-24
- Cervi AC (1997) *Passifloraceae* do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora* Fontqueria, v 45, p 1-92

Collevatti RG, Brondani RV, Grattapaglia D (1999) Development and characterisation of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense* Heredity, London, v 83, p 748-756

Crochemore ML, Molinari HB, Stenzel NMC (2003) Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.) Revista Brasileira de Fruticultura, v 25, p 5-10

Cruz CD (2006) Programa Genes – estatística experimental e matrizes, Editora UFV, Viçosa

Cuco SM, Vieira MLC, Mondin M, Aguiar-Perecin MLR (2005) Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids Caryologia, v 58, p 220-228

Dayanadan S, Bawa KS, Kesseli R (1997) Conservation of microsatellites among tropical trees (leguminosae) American Journal of Botany 84(12): 1658–1663

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue Focus, v12, p 13-15

Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (2005) Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – Desafios da pesquisa In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (Eds.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p 187-210

Fernández FJ, Sork LV, Gallego G, López J, Bohorques A and Tohme J (2000) *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 397–397

Ferreira FR, Oliveira JC (1991) Germoplasma de *Passiflora* no Brasil In: São José AR (Ed.) A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP, p 187-200

Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM p 220

Guerra M (1990) A situação da citotaxonomia de angiospermas nos trópicos e, em particular, no Brasil Acta Botanica Brasilica São Paulo, v 4, p 75-86

Guerra M (1988) Introdução à Citogenética geral, Rio de Janeiro: Guanabara 140

Guerra MS (1986) Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco Revista Brasileira de Genética, v 9, p 21-40

Hansen AK, Gilbert LE, Simpson BB, Downie SR, Cervi AC, Jansen RK (2006) Phylogenetic Relationships and Chromosome Number Evolution in *Passiflora* Systematic Botany, v 31, n 1, p 138-150

Huynh KL (1972) Étude de l'arrangement du pollen dans la tétrade chez les Angiospermes sur la base de dones cytologiques – IV Le genre *Passiflora* *Pollen et Spores*, 14(1): 51-60

Huziwara Y (1962) Karyotype analysis in some genera of compositae. VIII. Further studies on the chromosome of Aster, American Journal of Botany, 49: 116-119

Johansen DA (1940) Plant Microtechnique Led., McGraw-Hill Book Company, New York p 523

- Killip EP (1938) The American species of Passifloraceae Publ. /Field Mus. Nat. Hist., Bot. ser, p 613
- Levan A, Fredg K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes Hereditas, v 52, p 201-220
- Levin DA (2002) The Role of Chromosomal Change in Plant Evolution Oxford, UK: Oxford University Press, p 230
- Meletti LMM, Soares-Scott MD, Bernacci LC, Martins FP (1992) Caracterização de germoplasma de maracujazeiro (*Passiflora* sp) Revista Brasileira de Fruticultura, Cruz das Almas, v 14, n 2, p 157-162
- Melo NF, Cervi AC, Guerra M (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae) Plant Systematics and Evolution, v 226, p 69-8
- Melo NF, Guerra M (2003) Variability of the 5S and rDNA sites in *Passiflora* L. with species with distinct base chromosome numbers Annals of Botany, v 92, p 309-316
- Melo NF, Cervi AC, Guerra M (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae) Plant Systematics and Evolution, v 226, p 69-84
- Milward de Azevedo MA, Goncalves EV, Baumgratz JFA (2004) Palinotaxonomia das especies de *Passiflora* L. subg. *Decaloba* (DC.) Rchb. (*Passifloraceae*) no sudeste do Brasil Rev Brasil Bot 27, p 655-665
- Milward-de-Azevedo MA, Baumgratz JFA (2004) *Passiflora* L. subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na região sudeste do Brasil Rodriguésia, v 55, n 85, p 17-54
- Munsell (1977) Color charts for plant tissues, 2 ed Baltimore: Munsell Color, 1v
- Muschner VC, Lorenz AP, Cervi AC, Bonatto SL, Souza-Chiez TT, Salzano F M, Freitas LB (2003) A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae) American Journal of Botany, v 90, n 8, p 1229-1238
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Camargo LEA, Fungaro MHP, Vieira MLC (2005) Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) Molecular Ecology Notes, Oxford, v 5, p 331-333
- Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites Genetics and Molecular Biology, Ribeirão Preto, v 29, *In press*
- Pádua JG (2004) Análises genéticas de espécies do gênero *Passiflora* L. com base em abordagens filogenéticas, morfométricas e em marcadores microssatélites Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade de São Paulo (USP), São Paulo – SP
- Palomino G and Vázquez R (1991) Cytogenetic studies in mexican populations of species of *Crotalaria* (Leguminosae – Papilionoideae) Cytologia 56: 343-351
- Passos VM (2007) Delimitação específica de *Passiflora galbana* Mast. e *Passiflora mucronata* Lam. através de marcadores moleculares e dados morfométricos Tese (Doutorado em Botânica) Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana – BA



Penha HA, Zucchi MI, Fungaro, MHP, Paula FM, Munhoz CF, Oliveira EJ, Hanai LR, Consoli L, Vieira MLC (2007) Desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com microsatélites (SSR) em *Passiflora alata* e análise de transferibilidade de marcadores SSR entre *Passiflora f. edulis flavicarpa* e *Passiflora alata* In: 53º Congresso Brasileiro de Genética, Resumos 108

Presting D (1965) Zur morphologie der pollenkörner der Passifloraceen Pollen et Spores, 7: 193-247

Roa AC, Chavarriaga-Aguirre P, Duque MC, Maya MM, Bonierbale MW, Iglesias C, Tohme J (2000) Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship American Journal of Botany, v 87, n11, p1647-1655

Ruas CF (1989) Evolução cariotípica no gênero *Mikania* Willd (Compositae) Piracicaba, SP Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, p 137

Salla MFS, Ruas C de F, Ruas PM, Pípolo VC (2002) Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C) Rev Bras Frutic, v 24, n 1, p 015- 022

Santos EA (2008) Melhoramento de passifloras para ornamentação utilizando *Passiflora palmeri* var. *sublanceolata*, *Passiflora foetida* var. *foetida* e híbridos F<sub>1</sub> ornamentais: confirmação via RAPD, parâmetros genéticos e efeitos do sombreamento Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal UESC. 113 p

Singh D (1981) The relative importance of characters affecting genetic divergence The Indian Journal of Genetic and Plant Breeding, New Delhi, v 41, p 237-245

Snow N, MacDougal JP (1993) New Chromosomes Reports in *Passiflora* (Passifloraceae) Systematic Botany, v 18, n 2, p 261-273

Soares-Scott MD (1998) Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* Campinas, SP, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas Área de Biologia Celular), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, p 89

Soares-Scott MD, Meletti LM, Bernacci LC, Passos IRS (2005) Citogenética clássica e molecular em passifloras In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (Eds.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p 213-240

Sousa JSI, Meletti LMM (1997) Maracujá: espécies, variedades, cultivo Piracicaba, FEALQ

Souza MM, Pereira TNS, Viana AP, Pereira MG, Amaral Jr, AT e Madureira, HC (2004) As características da receptividade da flor e da fruta associadas à época da polinização no *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* do Passiflora amarelo da fruta de paixão Degener (Passifloraceae) Scientia Horticulturae, v 101, p 373–385

Souza MM (2002) Estudos genômico e reprodutivo em espécies de *Passiflora* Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes - RJ

Souza MM, Pereira TNS, Silva LC, Reis DSS, Sudré CP(2003) Karyotype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro Cytologia, v 68, p 165-171

Souza MM, Pereira TNS, Vieira MLC (2008) Cytogenetic Studies in Some Species of *Passiflora* L (Passifloraceae): A Review Emphasizing Brazilian Species. Brazilian Archives of Biology and Technology, v 51, p 247-258

Spirlet ML (1965) Utilisation taxonomique des grains de pollen de Passifloracées I Pollen et Spores, 7(2) : 249-301

Ulmer T, Macdougall JM (2004) *Passiflora* - Passionflowers of the world. Portland: Timber Press, Portland

Viana AJC, Araújo IS, Souza MM, Ahnert D, Corrêa RX (2006) Otimização da extração de DNA de espécies de *Passiflora* L. visando obtenção de marcadores RAPD In: Workshop de recursos genéticos vegetais no estado da bahia, 2, Ilhéus. Resumos Cruz das Almas: Magistra, v 18, p 88

Viana AP, Pereira TNS, Pereira MG, Souza MM, Maldonado JFM, Amaral Jr AT (2003) Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among *Passiflora* species using RAPD Revista Brasileira de Fruticultura, v 25, n 3, p 489-493

Vieira MLC, Barbosa LV, and Mayeda LY (2004) Citogenética dos maracujazeiros (*Passiflora* spp) In: Lima AA, Cunha MAP (Eds.) Produção e qualidade na Passicultura Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, p 45–65

White G, Powell W (1997) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. Molecular Ecology, v 6, n 9, p 851-860

## 4. CAPÍTULO 2

### **Caracterização do sistema reprodutivo de *Passiflora capsularis* LINN e *Passiflora rubra* LINN**

#### **Resumo**

O Brasil é um dos países de maior representatividade e centro de origem de cerca de 200 espécies de *Passiflora*, o que lhe confere uma condição privilegiada quanto aos recursos genéticos desse gênero. Na maioria das espécies, os genótipos de *Passiflora* apresentam auto-incompatibilidade, que exige polinização cruzada. Dessa forma, a maioria das passifloras é considerada essencialmente alógama. O presente trabalho objetivou caracterizar a biologia da reprodução de *P. capsularis* e *P. rubra* para que, com esses estudos, as duas espécies possam ser melhores caracterizadas taxonomicamente e que possam ser utilizadas de maneira mais eficiente em programas de melhoramento que envolvam hibridações interespecíficas para produção de plantas ornamentais. Para tanto, foram utilizadas as metodologias de polinização controladas in vivo, germinação in vitro e razão pólen:óvulo (P:O). Nas autopolinizações, *P. capsularis* apresentou uma média de 62,50% de fertilizações, enquanto *P. rubra* apresentou a média de 67,18%, mostrando-

se autocompatíveis, autógamas. Nas polinizações intra-específicas, *P. capsularis* apresentou a taxa de fertilização de 68,75%, enquanto em *P. rubra* observou-se 62,50%. Nas hibridações interespecíficas, utilizando-se pólenes de *P. rubra*, a taxa de fertilização foi de 48,43%, já nos cruzamentos tendo *P. capsularis* como doadora de grãos de pólen (GP), observou-se taxa de 46,87% de fertilização. Na germinação in vitro, 52,17% do GP de *P. capsularis* germinaram, enquanto em *P. rubra* o percentual foi maior, de 64,20%. Na razão P:O fez-se a contagem de óvulos por ovário e grãos de pólen por antera, obtendo a razão P:O de 27,42 para *P. capsularis* e de 22,51 para *P. rubra*, que as inclui na categoria de autógamas obrigatórias. Dessa maneira, concluímos que as características da biologia da reprodução de ambas as espécies analisadas permitem a prática tanto de autopolinizações, quanto de hibridações intra e interespecíficas, permitindo, assim, a utilização de maiores opções de métodos de melhoramento para utilização dessas espécies em programas para produção de plantas ornamentais de *Passiflora*.

Palavras-chaves: Passiflora, maracujazeiros silvestres, polinização, germinação, plantas ornamentais.

# Caracterização do sistema reprodutivo de *Passiflora capsularis* LINN e *Passiflora rubra* LINN

Artigo a ser submetido na Revista Flora (Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants)

---

## Abstract

Brazil is one of the most representative countries of origin and center of about 200 species of *Passiflora*, which gives it a privileged condition as genetic resources of this genus. In most species, the genotypes of *Passiflora* have self-incompatible, requiring cross-pollination. Thus, most of passiflora is considered essentially allogamy. This study aimed to characterize the biology of reproduction of *P. capsularis* and *P. rubra*, that with these studies, the two species can be best characterized taxonomically and can be used more efficiently in breeding programs involving interspecific hybridizations for the production of ornamental plants. Thus, the methodologies used for controlled pollination in vivo, in vitro germination rate and pollen: ovule (P: O). In the self, *P. capsularis* showed an average of 62.50% of fertilizações, while *P. rubra* had an average of 67.18% and is autocompatíveis, autogamic. In intra-specific pollinations, *P. capsularis* showed a fertilization rate of 68.75%, while in *P. rubra* there was 62.50%. In interspecific hybridizations, using pollen of *P. rubra*, the fertilization rate was 48.43%, already in the crosses with *P. capsularis* as donor of pollen grains (PG) was observed rate of 46.87% of fertilization. Germination in vitro, 52.17% of the GP of *P. capsularis* germinated, while in *P. rubra* was higher the percentage of 64.20%. The ratio P:O has become the count of eggs per ovary and pollen grains per anther, getting the right P:O of 27.42 for *P. capsularis* and 22.51 for *P. rubra*, which includes the category of autogamic mandatory. Thus, we conclude that the characteristics of the biology of reproduction of both species examined to both the practice of self, as the intra-and interspecific hybridizations, thus allowing the use of more options for improvement of methods for use in programs for these species production of ornamental plants of *Passiflora*.

**Key words:** Passiflora, wild passionfruit, pollination, germination, ornamental plants.

---

## Introdução

A família Passifloraceae é composta por 19 gêneros (Bernacci, 2003) e cerca de 700 espécies (Feuillet, 2004). São plantas escandentes, herbáceas ou lenhosas e possuem gavinhas, as quais se modificam, podendo ainda ser detectada a presença de nectários extraflorais (Barroso, 1978). A característica morfológica mais marcante da família é a presença de uma corona de filamentos nas flores, o que sustenta a monofilia do grupo (Judd et al., 1999).

O gênero *Passiflora* está distribuído principalmente em regiões tropicais e subtropicais, mas se desenvolvem melhor no clima das Américas e África (Cronquist, 1981; Judd et al., 1999). Segundo Cervi (2005), o gênero comporta cerca de 520 espécies, porém novas espécies têm sido descobertas (Cervi, 2006; Nunes e Queiroz, 2007). O Brasil possui uma condição privilegiada quanto aos recursos genéticos de *Passiflora*, que apresenta ampla variabilidade genética disponível para ser utilizada em programas de melhoramento (Meletti et al., 2000). Entre os estados brasileiros, a Bahia se destaca apresentando expressiva ocorrência de espécies do gênero *Passiflora*, onde, no início da atual década, 45 espécies foram relatadas por Nunes e Queiroz (2001).

Muitas espécies de *Passiflora* são auto-incompatíveis, o que exige polinização cruzada (Bruckner, 1997). As flores das passifloras atraem uma grande gama de polinizadores, mas sua polinização é realizada preferencialmente por insetos, como as mamangavas do gênero *Xylocopa*, abelhas do gênero *Ptiglissa*, além de vespas e mariposas (Koschnitze, 1997).

Um mecanismo capaz de aumentar a variabilidade genética é a reprodução sexuada, que permite aos indivíduos uma melhor resposta a ambientes em transformação (Li et al., 2002). As plantas, de modo geral, mostram uma diversidade de sistemas reprodutivos, variando da autopolinização obrigatória associada à autocompatibilidade, até à polinização cruzada obrigatória associada à auto-incompatibilidade, possibilitando variações na transição entre a autogamia e a alogamia (Iuchi, 1994).

Décadas atrás, as espécies de *Passiflora* eram consideradas essencialmente alógamas, condicionado pelo fenômeno da auto-incompatibilidade (Semir e Brown,

1975). Hoje, há relatos de autocompatibilidade em espécies silvestres (Souza et al., 2005; Viana et al., 2005), e até mesmo em genótipos de híbridos na espécie cultivada, *P. edulis* (Menzel et al., 1988). Porém, muitas vezes o processo da autofecundação não é desejável por levar à perda de variabilidade alélica nos locos de incompatibilidade, o que dificulta a obtenção de linhagens (Allard, 1999).

A hibridação é uma técnica muito importante para o melhoramento genético de plantas, uma vez que possibilita a recombinação de alelos permitindo a obtenção de novos materiais geneticamente superiores (Bruckner, 1997). As hibridações interespecíficas em passifloras no Brasil têm sido voltadas basicamente para a transferência de caracteres favoráveis de outras espécies para *P. edulis*, especialmente genes de resistência (Viana et al., 2003) e poucos trabalhos fazem uso desta técnica para desenvolver híbridos ornamentais (Abreu et al., 2008).

Em passifloras, a hibridação sexuada pode ser realizada com sucesso, tanto entre plantas dentro da mesma espécie, quanto entre espécies afins, devido às barreiras de incompatibilidade serem frágeis (Meletti et al., 2005). Entretanto, alguns cruzamentos se tornam inviáveis, o que pode ser contornado com o uso de técnicas biotecnológicas (Bruckner e Otoni, 1999).

*Passiflora capsularis* Linn. e *Passiflora rubra* Linn. são espécies silvestres encontradas no Brasil, apresentadas como boas genitoras para programa de melhoramento visando à obtenção de híbridos ornamentais por possuírem flores pequenas e abundantes, além de folhagens e frutos favoráveis à ornamentação. As duas espécies são taxonomicamente muito próximas, morfologicamente similares. As folhas de *P. capsularis* e *P. rubra* são semelhantes, e na ausência de flores ou frutos, é quase impossível distingui-las. As principais diferenças entre as duas espécies residem apenas no ovário e no fruto. O ovário de *P. rubra* é densamente coberto com pêlos longos que podem ser brancos ou, mas raramente, marrons, os quais geralmente persistem sobre os frutos. Em *P. capsularis*, o ovário é meramente puberulento e os curtos pêlos frequentemente desaparecem no fruto maduro. Os frutos de *P. capsularis* são verdes e sempre mais alongados, enquanto que em *P. rubra* os frutos são rubros e demonstram maior variação em relação ao comprimento e largura, sendo mais obovóides (Sousa e Meletti, 1997).

Desse modo, o presente trabalho objetivou caracterizar a taxa de cruzabilidade, o sistema reprodutivo e a fertilidade do grão de pólen em espécies de *P. capsularis* e *P. rubra*, para que os conhecimentos gerados sobre sua biologia da reprodução possam

subsidiar programas de melhoramento envolvendo essas espécies para produção de plantas ornamentais.

## **Material e métodos**

### **Espécies de estudo e condições de cultivo**

O material vegetal foi composto de quatro exemplares de *P. capsularis* e quatro exemplares de *P. rubra*.

*P. capsularis* – coletada na mata Atlântica da região sul do estado da Bahia, no morro da Viúva localizado na RPPN Serra Bonita (Camacan-BA), entre as coordenadas 25° 03 min 72,1' Norte – 121° 38 min 41,6' Leste entre as altitudes de 789 à 813m, e também de sementes provenientes de doação da Embrapa Cerrados, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

*P. rubra* – coletada na mata Atlântica da região sul do estado da Bahia, no morro da Viúva localizado no Distrito de Serra Bonita (Camacan-BA), entre as coordenadas 25° 03 min 72,1' Norte – 121° 38 min 41,6' Leste entre as altitudes de 789 à 813m, e também de sementes provenientes de doação da Universidade Estadual Paulista (UNESP) *campus* Jaboticabal - SP, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Sementes foram colocadas para germinar em bandejas de isopor de 128 células. Ao surgimento das primeiras folhas verdadeiras, as mudas foram transplantadas para saquinhos de polietileno com volume de 1 L, contendo solo argiloso. Após atingirem 0,40 cm de altura, as plantas foram transplantadas para vasos pretos de 43 L, contendo solo argiloso e substrato nas proporções de 3:1, respectivamente. As plantas foram mantidas em cultivo protegido no *campus* da UESC (Banco Ativo de Germoplasma - BAG-Passifloras), aplicando-se podas mensais, quando necessário, e adubação com a formulação NPK (4-14-8) a cada 60 dias. A irrigação foi realizada pelo sistema de gotejamento. O controle de pragas foi feito com defensivos agrícolas DECIS e VERTIMEC. Os fungos foram controlados com pulverização de produtos a base de cobre. As pragas e doenças foram controladas com medidas profiláticas simples, não afetando o ciclo reprodutivo das plantas.

### **Polinização in vivo**



Para realização das polinizações controladas, flores foram etiquetadas e ensacadas um dia antes da abertura. Todas as polinizações foram realizadas no mesmo intervalo de tempo, entre 8 h e 9 h da manhã:

a) autopolinização – 4 flores de cada acesso foram autopolinizadas com pólen da mesma planta, com auxílio de pinça e protegidas por 24 h após a polinização; b) polinização cruzada intra-específica – 4 flores de cada acesso foram emasculadas com auxílio da pinça e tesourinha, e os estigmas foram polinizados com pólen de plantas diferentes e protegidas por 24 h; c) polinização cruzada interespecífica – 4 flores de cada acesso, por espécie, foram emasculadas antes do momento da abertura da flor com auxílio da pinça e tesourinha. Os grãos de pólen de cada espécie foram coletados em *bulk*, das quatro plantas, para serem utilizados na outra espécie (*P. capsularis* x *P. rubra*). Os estigmas foram polinizados e protegidos por 24h.

Cinco dias após a polinização, foi verificada a taxa de pegamento, considerando-se fertilizada a flor que tinha iniciado o desenvolvimento do fruto. Posteriormente, os frutos foram cobertos com uma rede de náilon para proteção contra queda no amadurecimento (Bruckner e Otoni, 1999). Após o período de cinco semanas, foram obtidos dados quantitativos e qualitativos dos frutos já amadurecidos.

Foram realizadas contagem, pesagem, e mensuração do comprimento e largura dos frutos; contagem e pesagem de sementes secas por unidade e por fruto. As medições foram realizadas com auxílio de paquímetro digital. A coloração da região superficial externa e das bordas do fruto foi observada utilizando-se a Carta de Cores para Tecido Vegetal de Munsell. Os dados obtidos foram submetidos à análise descritiva, incluindo desvio padrão e análise de variância utilizando-se o Programa computacional GENES (Cruz, 2006).

### **Germinação in vitro**

O teste de germinação foi realizado conforme descrito para *P. edulis* f. *flavicarpa* (Bruckner et al., 2000): 0,10 g/L de ácido bórico ( $H_3BO_4$ ); 50 g/L de sacarose; 0,3 g/L de nitrato de cálcio tetraidratado ( $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ); 0,2 g/L de sulfato de magnésio heptaidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ); e 0,1 g/L de nitrato de potássio ( $KNO_3$ ). Foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso (DIC) constando de quatro plantas (tratamentos) mantidas em cultivo protegido, cujas repetições, em número de cinco, foram representadas por cada flor, totalizando 20 flores analisadas por espécie. Dessas foram coletadas uma antera por flor, no intervalo entre 8 h e 9 h da manhã, e os grãos de

pólen (GP) foram colocados entre lâmina e lamínula com uma gota do meio de germinação previamente autoclavado a 121 °C por 15 minutos. O material foi mantido em estufa com temperatura de  $28 \pm 1$  °C por 24 h de incubação. Considerou-se como GP germinado aquele cujo tubo polínico apresentou comprimento mínimo duas vezes maior que o diâmetro médio do GP. Os dados obtidos foram submetidos à análise descritiva, incluindo desvio padrão e análise de variância utilizando-se o Programa computacional GENES (Cruz, 2006).

### **Razão Pólen-Óvulo (P:O)**

A relação P:O foi utilizada como um indicador do modo de reprodução preferencial da planta. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso (DIC), constando de quatro plantas (tratamentos) mantidas em cultivo protegido, cujas repetições, em número de cinco, foram representadas por cada flor, totalizando 20 flores analisadas por espécie. Os óvulos e grãos de pólen foram contados de acordo com a metodologia proposta por Dafni (1992). A estimativa da razão P:O foi realizada de acordo com a classificação de Cruden (1977): Cleistogamia (<5,4); autogamia obrigatória (5,5-39); autogamia facultativa (39,1-396,9); alogamia facultativa (397-2.588) e alogamia obrigatória (>2.588). Os dados obtidos foram submetidos à análise descritiva, incluindo desvio padrão e análise de variância utilizando-se o Programa computacional GENES (Cruz, 2006).

## Resultados

Os experimentos de determinação do sistema reprodutivo de *P. capsularis* e *P. rubra* foram realizados em três etapas: i) Polinização in vivo; ii) Germinação in vitro; e iii) Razão Pólen:óvulo.

### i) Polinização in vivo

A antese em *P. capsularis* ocorreu entre 05:00 h e 06:00 h da manhã e em *P. rubra* entre 05:30 h e 07:30 h. As flores permaneceram abertas por um período que variou entre 10 a 16 horas.

Os dados de polinização in vivo são apresentados na Tabela 1. A taxa média de pegamento das autopolinizações em *P. capsularis* foi de 62,5% e em *P. rubra* foi de 67,18%. Nas hibridações intra-específicas, a taxa foi de 68,77% e 62,5%, e nas hibridações interespecíficas foi de 48,43% e 46,87%, respectivamente. As análises de variância entre e dentro das espécies (Tabelas 2 e 3) mostrou não haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos diferentes tipos de polinizações.

**Tabela 1.** Dados médios de taxa de pegamento para autopolinizações (Auto), hibridações intra-específicas (Intra) e interespecíficas (Inter), considerando-se quatro repetições, em *P. capsularis* e *P. rubra*.

Espécies		Média ± Desvio Padrão							
		Planta 1		Planta 2		Planta 3		Planta 4	
<i>P. capsularis</i>	<b>Auto</b>	2,75	±0,95	3,00	±0,81	2,25	±0,95	2,00	±1,41
	<b>Intra</b>	2,50	±1,00	2,75	±0,50	2,75	±1,50	3,00	±0,81
	<b>Inter</b>	1,50	±0,57	2,00	±1,15	2,25	±0,50	2,00	±0,81
<i>P. rubra</i>	<b>Auto</b>	2,25	±1,25	2,75	±0,50	2,50	±1,29	3,25	±0,95
	<b>Intra</b>	1,75	±0,95	3,25	±0,50	2,50	±1,00	2,50	±1,29
	<b>Inter</b>	2,00	±0,81	2,25	±0,50	1,75	±0,50	1,50	±1,00

**Tabela 2.** Resumo da ANOVA para as taxas de pegamento de autopolinizações e hibridações realizadas espécies *P. capsularis* e *P. rubra*.

FV	GL	QM	
		Autopolinização	Hibridações Intra-específicas
<i>P. capsularis</i>	3	0,83 <sup>NS</sup>	0,16 <sup>NS</sup>
Erro	12	1,12	1,04
CV%		42,42	37,11
<i>P. rubra</i>	3	0,72 <sup>NS</sup>	1,5 <sup>NS</sup>
Erro	12	1,10	0,95
CV%		36,09	39,15
Entre as espécies	1	0,28 <sup>NS</sup>	0,5 <sup>NS</sup>
Erro	30	1,04	0,96
CV%		39,46	37,45

FV, Fonte de variação; GL, graus de liberdade; QM, quadrados médios. <sup>NS</sup> Não Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

**Tabela 3.** Resumo da ANOVA para taxa de pegamento de hibridações interespecíficas entre as espécies *P. capsularis* ♀ (receptora do grãos de pólen de *P. rubra*) e *P. rubra* ♀ (receptora do grãos de pólen de *P. capsularis*).

FV	GL	QM
		Hibridações Interespecíficas
<i>P. capsularis</i> ♀	3	0,93 <sup>NS</sup>
Erro	12	0,64
CV%		41,47
<i>P. rubra</i> ♀	3	0,41 <sup>NS</sup>
Erro	12	0,54
CV%		39,25
Entre os diferentes tipos* de cruzamentos	1	0,31 <sup>NS</sup>
Erro	30	0,55
CV%		39,12

FV, Fonte de variação; GL, graus de liberdade; QM, quadrados médios. \* Tipos de cruzamentos referem-se àqueles com diferentes doadores de pólen. <sup>NS</sup> Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

### Germinação in vitro

Os dados de germinação in vitro apresentados na Tabela 4 (Fig. 1A-B). Os valores médios para a germinação in vitro foram de 52,17% e 64,20% em *P. capsularis* e *P. rubra*, respectivamente. As análises de variância (Tabela 5) indicaram haver

diferença significativa ( $p < 0,05$ ) dentro da espécie *P. capsularis* e também entre as duas espécies para a taxa de germinabilidade dos grãos de pólen.

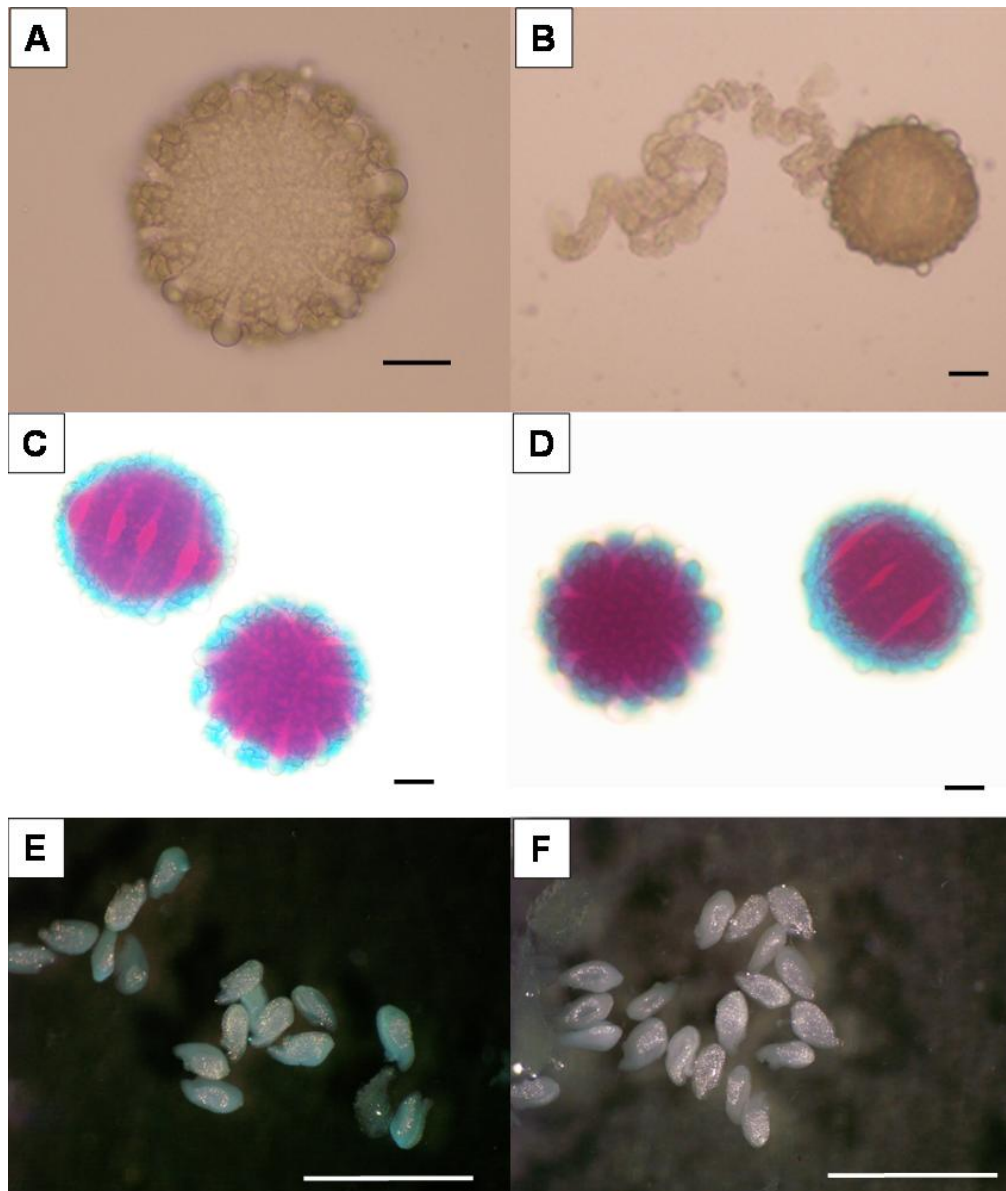
**Tabela 4.** Dados médios referentes ao número de grãos de pólen (GP) germinados *in vitro* em *P. capsularis* e *P. rubra*, considerando-se quatro repetições (PL)

Espécies		Média ± Desvio Padrão					
		GP Total		GP Germinados		GP Não Germinados	
<i>P. capsularis</i>	PL 1	3651,7	±860,7	1929,5	±64,8	1722,2	±870,0
	PL 2	3895,0	±110,2	1997,2	±74,4	1897,7	±115,8
	PL 3	3775,7	±527,2	1939,0	±110,3	1836,7	±503,7
	PL 4	3300,0	±310,8	1762,7	±166,9	1537,2	±293,1
<i>P. rubra</i>	PL 1	2300,7	±296,3	1538,5	±139,2	762,2	±267,1
	PL 2	2448,0	±351,2	1703,5	±141,8	744,5	±457,6
	PL 3	2615,7	±257,0	1671,5	±149,8	944,2	±217,2
	PL 4	2549,5	±67,1	1454,5	±118,5	1097,0	±154,1

**Tabela 5.** Resumo da ANOVA para análise de Germinação *in vitro* dentro das espécies de *P. capsularis* e *P. rubra* e entre as espécies .

FV	GL	QM
		GP germinados
<i>P. capsularis</i>	3	40644,41*
Erro	12	12444,54
CV%		5,84
<i>P. rubra</i>	3	54765,33 <sup>NS</sup>
Erro	12	18999,33
CV%		8,66
Entre as espécies	1	796953,12*
Erro	30	2118,52
CV%		8,50

FV, Fonte de variação; GL, graus de liberdade; QM, quadrados médios. \*Significativo e <sup>NS</sup> não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.



**Fig. 1** –Grãos de pólen (GP) e óvulos em espécies de *Passiflora*. A) GP em meio de cultura, não germinados após 24 h; B) Grão de pólen em meio de cultura após 24 h, emitindo tubo polínico; C e D) Grãos de pólen de *P. capsularis* e *P. rubra*, respectivamente; E e F) Óvulos de *P. capsularis* e *P. rubra*, respectivamente. A-D) Barra = 10µm; E-F) Barra = 1mm.

### Razão P:O

Os dados referentes ao número de grãos de pólen (GP) e de óvulos (Fig. 1C-F), e à razão P:O são apresentados na Tabela 6. Os valores médios para a razão P:O foram de 22,51 e 27,42 em *P. capsularis* e *P. rubra*, respectivamente, sendo classificadas como autógamas obrigatórias. As análises de variância (Tabela 7) demonstraram não

haver diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a relação P:O em ambas as espécies. Já em relação aos GP, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as espécies.

**Tabela 6.** Valores médios do número de grãos de pólen (GP) e óvulos, e da razão pólen-óvulo (P:O), considerando-se quatro repetições (PL), em *P. capsularis* e *P. rubra*.

Espécies		Média ± Desvio Padrão					
		Grãos de Pólen		Óvulos		P:O	
<i>P. capsularis</i>	PL 1	2342,8	±235,9	116,4	±19,70	20,12	±0,005
	PL 2	2949,6	±590,3	127,2	±11,92	23,18	±0,006
	PL 3	3031,4	±698,5	126,2	±23,61	24,02	±0,0004
	PL 4	3207,4	±272,9	141,0	±15,29	22,40	±0,004
<i>P. rubra</i>	PL 1	4338,0	±504,0	145,6	±20,95	29,79	±0,002
	PL 2	3703,8	±428,4	145,8	±17,62	25,40	±0,002
	PL 3	3638,6	±317,7	132,8	±18,53	27,39	±0,006
	PL 4	3552,6	±685,7	131,2	±28,90	27,07	±0,005

**Tabela 7.** Resumo da ANOVA para número de grãos de pólen e óvulos, e razão pólen-óvulo (P:O) em *P. capsularis* e *P. rubra*.

FV	GL	QM	
		Grãos de Pólen	Óvulos
<i>P. capsularis</i>	3	7050848,9 <sup>NS</sup>	511,8 <sup>NS</sup>
Erro	16	241659,9	330,5
CV%		17,05	14,23
<i>P. rubra</i>	3	642804,8 <sup>NS</sup>	314,9 <sup>NS</sup>
Erro	16	252195,8	482,3
CV%		13,18	15,81
Entre as espécies	1	8564577,0*	1243,2 <sup>NS</sup>
Erro	38	314411,9	407,5
CV%		16,76	15,14

FV, Fonte de variação; GL, graus de liberdade; QM, quadrados médios. \*Significativo e <sup>NS</sup> não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

## Discussão

### Polinização in vivo

Existe uma ampla diversidade de estratégias reprodutivas nas angiospermas, presentes em diferentes comunidades (Richards, 1986). Os processos de cruzamentos intra-específicos e interespecíficos constituem ferramentas importantes em programas de melhoramento genético, sendo fundamentais para o desenvolvimento de novas variedades, pois a hibridação possibilita o aumento da heterose pela ocorrência de novas combinações de genes codificadores de caracteres de interesse agrônomo (Borém, 1999; Paterniani, 2001). A autopolinização pode levar à perda de variabilidade genética devido à depressão endogâmica, fenômeno que é agravado em espécies raras (Reis et al., 2005).

Neste sentido, algumas espécies autocompatíveis possuem um “*back-up*” caso a polinização cruzada falhe, ou seja, se nenhum grão de pólen proveniente de um indivíduo distinto chegar ao estigma, a flor poderá se autofertilizar garantindo a produção de sementes (Hmeljevski, 2007). Assim, a possibilidade de ocorrência da autogamia nas espécies estudadas, provocaria uma redução na frequência das formas heterozigóticas e, conseqüentemente, aumento na proporção dos tipos homozigóticos, favorecendo a geração de linhagens para produção de híbridos (Allard, 1999), além, de permitir a formação de sementes sem que haja necessidade de polinizadores (Cardoso, 2007).

*Byrsonima coccolobifolia* apresenta um sistema reprodutivo misto, com níveis elevados de alogamia e autogamia. Tal sistema, segundo Scariot et al. (1991), combina as vantagens da autofecundação e polinização cruzada, garantindo um alto nível de adaptabilidade da população às condições vigentes do ambiente associado à manutenção de elevado potencial evolutivo através da recombinação, o que capacita a espécie para a colonização de novas e extensas áreas. Na Família Passifloraceae a reprodução pode envolver tanto sistemas autocompatíveis como auto-incompatíveis. A auto-incompatibilidade é compreendida como um mecanismo de aumento da variabilidade genética (Varassini e Silva, 1999).

De modo geral, o florescimento de plantas tropicais está relacionado a fatores físicos como fotoperíodo, temperatura e precipitação, e a fatores bióticos, como a disponibilidade de agentes polinizadores (Sobrinho, 2006). O maracujazeiro é uma



planta exigente quanto à luminosidade necessitando de cerca de 12 horas diárias de luz para ocorrer o florescimento (Camillo, 2003). Além disso, tanto o período anual quanto a intensidade do florescimento podem variar em cada região devido à variações oscilações no fotoperíodo, resultando, assim, em períodos e intensidades de florescimento que podem ser distintos (Teixera, 1994). Tanto *P. capsularis* quanto *P. rubra* floresceram durante todo o ano, mas com alguns picos de intensidade de florescimento durante o verão e o outono (observações pessoais), sendo que esse período na região é acometido por altas taxas pluviométricas.

Assim como *P. capsularis* e *P. rubra*, as espécies *Passiflora alata*, *Passiflora kermesina*, *Passiflora suberosa*, *Passiflora foetida*, *M. glaziovii* e *Passiflora malacophylla* estudadas por Benevides (2006) apresentaram antese nas primeiras horas da manhã, entre 5:00 h e 6:30 h e, dentre essas espécies, apenas *P. alata* e *P. suberosa*, se assemelharam-se às espécies *P. capsularis* e *P. rubra*, quanto ao período de abertura das flores, com duração entre 10 a 15 horas. No mesmo trabalho, a autora realizou cruzamentos com as espécies citadas acima e observou que, em *M. glaziovii*, os experimentos reprodutivos indicaram a xenogamia para 95% das flores testadas, podendo ocorrer também autopolinização e geitonogamia em menor porcentagem (que conseguem se reproduzir também por autopolinização). *Passiflora alata* é uma espécie exclusivamente xenógama, necessitando de polinização cruzada para frutificação, já *P. suberosa* é autocompatível com cerca de 50% de frutificação. Com o tratamento de autopolinização manual, os resultados dos experimentos em *P. capsularis* e *P. rubra* demonstraram que ambas as espécies são capazes de se reproduzir tanto por autopolinização quanto por polinização cruzada (intra e interespecífico).

Segundo Benevides (2006), dentre as passifloras com antese diurna incluídas em seus estudos, três padrões distintos de florescimento são encontrados: períodos numerosos e curtos (dois a três dias) de florescimento ao longo do ano (1), períodos curtos de florescimento, com produção simultânea de grande número de flores durante cerca de quatro semanas (2), e períodos de pouca produção de flores por dia com baixa sincronia entre os indivíduos, com extensão variável no período de florescimento na população (3). Em *P. capsularis* e *P. rubra*, o padrão encontrado foi do tipo 2, o mesmo observado pela autora em *Mitostemma glaziovii*, com florescimento ocorrendo em massa conhecido como “*Big Bang*”, tendo de 3 a 4 semanas de flores abertas diariamente e ainda atraindo diversos visitantes florais.

Em *P. capsularis* e *P. rubra*, os testes indicaram que ambas as espécies são capazes de se reproduzir tanto por autopolinização, quanto por polinização cruzada intra-específica, e que os cruzamentos interespecífico foram bem sucedidos, mesmo com uma taxa menor de polinização. Na maioria das passifloras, a reprodução se dá através de polinização cruzada devido à morfologia da flor, onde as anteras são localizadas abaixo do estigma, aos tipos de grãos de pólen, que geralmente são pesadas e pegajosas e, principalmente, devido à auto-incompatibilidade, em que o pólen de uma planta é incapaz de fertilizar as flores da mesma planta, considerando-se que diferentes plantas podem ou não ser compatíveis entre si (Bruckner et al., 2002; Souza et al., 2004).

### **Germinação in vitro**

A germinação de grãos de pólen in vitro é um dos métodos que permite verificar a sua fertilidade, sendo de grande importância em programas de melhoramento de frutíferas (Pio et al., 2004). Entretanto, este método é influenciado por diferentes fatores. Existem diferenças entre espécies quanto às condições exigidas para a germinação do pólen, envolvendo, principalmente, os constituintes do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação. Além disso, a viabilidade do pólen também é influenciada pelo estágio de desenvolvimento da flor, quando da coleta do pólen, e pelas condições de armazenamento (Franzon et al., 2005).

Segundo Franzon e Raseira (2006), nenhum teste de viabilidade ou germinabilidade artificial é completamente satisfatório, principalmente após o pólen ter sido armazenado, pelas seguintes razões: os testes químicos usam corantes que reagem com constituintes químicos ou estruturas cujas presenças podem não refletir a capacidade de o grão de pólen germinar; amostras de grãos de pólen que germinam bem in vitro, podem não produzir suficiente elongação do tubo polínico para afetar a fertilização. Por outro lado, amostras de pólen que parecem não-viáveis quando testadas in vitro, podem produzir boa porcentagem de sementes, e o pólen armazenado pode germinar diferentemente em amostragens repetidas ou em diferentes meios (Miranda e Clement, 1990). A manutenção da capacidade de germinação do pólen depende, além das características intrínsecas da espécie, das condições de armazenamento (Miranda e Clement, 1990; Franzon e Raseira, 2006).

No trabalho de Cruz et al. (2008) foram obtidos índices muito baixos de germinação in vitro para *P. suberosa*, enquanto que para *P. edulis* f. *flavicarpa*,

utilizado como controle, o resultado foi de quase 100% de germinação. O percentual médio de germinação do pólen de *P. suberosa* foi negativamente influenciado pelo número de horas após a antese, com a maior média de germinação obtida às 7h, e a mais baixa às 17h, ou seja, com tendência de queda de percentual durante o tempo de abertura da flor. O mesmo foi observado por Souza et al. (2002) em *P. edulis* f. *flavicarpa* utilizando testes químicos para aferir a viabilidade polínica. Neste trabalho, as observações da germinabilidade do pólen em *P. capsularis* e *P. rubra* foram realizados até 3 horas após a abertura da flor, e tal fato pode ter influenciado nos resultados obtidos, com valores abaixo de 65% em ambas as espécies.

Segundo Cruz et al. (2008), a germinabilidade in vitro do pólen de *P. suberosa* caiu cerca de 64% em apenas duas horas após a abertura. Em *P. capsularis* e *P. rubra*, os valores obtidos foram próximos àqueles observados para o controle, *P. edulis* f. *flavicarpa*, que foi de apenas 76,9% de germinabilidade in vitro. Este valor difere daqueles encontrados para a espécie por Bruckner et al. (2000) e Cruz et al. (2008), e tal fato pode ser atribuído a alterações nas condições do meio ou do cultivo in vitro, ou até mesmo à manipulação do pólen durante a realização do experimento, porém os prováveis erros foram atenuados pela utilização da espécie controle.

Fatores ambientais também podem interferir na performance polínica. Buckner et al. (2000) estudaram a germinabilidade in vitro do pólen do maracujazeiro-amarelo, armazenado sob diferentes condições de temperatura, com o uso ou não de dessecador, in vitro e in vivo, e concluíram que a performance do pólen foi prejudicada pela exposição a baixas temperaturas (4 – 10° C) e pelo modo de armazenamento. Estudos realizados por Silva et al. (1999) para selecionar meios de cultura e temperaturas mais adequadas para germinação de grãos de pólen in vitro de *P. edulis*, com a finalidade de estudar a interferência de agrotóxicos, demonstraram que as condições cultivo in vitro interferiram nos resultados de germinabilidade do pólen. Os obtidos em *P. capsularis* e *P. rubra* corroboraram com os autores anteriormente citados, uma vez que a baixa taxa de germinação in vitro obtidas neste trabalho pode estar relacionada ao meio de cultura, já que o meio utilizado no teste de germinação in vitro é específico para outra espécie de *Passiflora* (Bruckner et al, 2000).

### **Razão P:O**

A razão P:O está diretamente relacionada ao modo de polinização e ao sistema reprodutivo das espécies e, tratando-se de uma espécie com sistema misto de

reprodução, os benefícios da autogamia e da alogamia podem ser compartilhados pela planta (Silva et al., 2006). A autogamia permite a formação de sementes sem que haja necessidade de polinizadores. Esta forma de reprodução é utilizada em programas de melhoramento, com vistas à obtenção de linhagens homozigóticas para obtenção de híbridos a partir de seus intercrossamentos (Iuchi, 1994). A alogamia possibilita a manutenção ou aumento do vigor híbrido das espécies pela ocorrência de novas combinações de genes codificadores de caracteres de interesse agrônomico, como observado na espécie *Ocimum canum* Sims (Lamiaceae), uma vez que a alogamia permitiu maior produção de óleos essenciais, esses por sua vez são amplamente utilizados pelas indústrias farmacêuticas, e têm alto valor no mercado nacional e internacional (Amaral et al., 2007).

A razão pólen-óvulo para as flores brevistilas e longistilas de *P. barbiflora* correspondeu ao tipo de sistema reprodutivo envolvendo a xenogamia facultativa, segundo classificação de Cruden (1977). Entretanto, outros métodos, como os testes de polinizações manuais e a análise do crescimento do tubo polínico, utilizados para avaliar o sistema reprodutivo em *P. barbiflora*, mostraram que a espécie apresentou xenogamia obrigatória, dependendo, dessa forma, da eficiência dos polinizadores para sua manutenção (Teixeira, 2004). Tais resultados se assemelharam com os resultados obtidos em nossos estudos, observando-se que *P. capsularis* e *P. rubra* foram categorizadas segundo razão P:O como autógamas obrigatórias, mas confrontando-se esses resultados com aqueles das polinizações controladas, observa-se que ambas as espécies podem se reproduzir tanto por autopolinização quanto por polinização cruzada intra e interespecífica.

Souza et al. (2005b), nos estudos de razão pólen:óvulo em *P. suberosa*, indicaram que essa espécie produz um número de grãos de pólen 83 vezes maior que o número de óvulos. Essa característica, aliada ao fato de que essa espécie é autocompatível, são as responsáveis pela baixa performance do pólen não prejudicar a frutificação em *P. suberosa*, demonstrando que a razão P:O foi um método eficiente na avaliação do sistema reprodutivo da espécie.

Embora a razão P:O tenha sido amplamente utilizada para caracterizar o sistema reprodutivo de muitas espécies, ainda não estão claros os fatores que a determinam (Wyatt, 1984). Vasek e Weng (1988) sugeriram que a interpretação da razão P:O não seja a única forma de caracterização do sistema reprodutivo de uma

espécie, e que formas de avaliação da razão P:O devem ser padronizadas em nível de família.

## **Conclusão**

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que a utilização da germinação *in vitro* para testes de germinabilidade de pólen de *P. capsularis* e *P. rubra*, usando o meio e condições descritas na metodologia, fornece resultados satisfatórios quando comparado à germinação *in vivo*. As análises da razão P:O demonstraram ser pouco eficientes na determinação do sistema reprodutivo nas duas espécies de passiflora estudadas, uma vez que foram classificadas como autógamas obrigatórias, enquanto os testes de polinização indicaram boas taxas de cruzabilidade intra e inter-específica. A caracterização do sistema reprodutivo em *P. capsularis* e *P. rubra* será essencial para o estabelecimento de estratégias de conservação e de melhoramento genético, visando à obtenção de híbridos.

## **Agradecimentos**

A autora agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e apoio financeiro, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pelo apoio financeiro à pesquisa, e ao pesquisador Dr. Vitor Osmar Becker, pela permissão de coleta na reserva RPPN Serra Bonita, Camacan – BA.

## Referências

- Abreu, P. P., Souza, M. M., Santos, E. A., Pires, M. V., Pires, M. M., Almeida, A. A. F. 2008. Passion Xower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. *Euphytica*.
- Allard, R. W., 1999. Principles of Plant Breeding. John Wiley e Sons, New York.
- Amaral, C. L. F., Almeida, O. S., Silva, A. B., Brito, A. C. 2007. Tendências reprodutivas de *Ocimum canum* Sims. (Lamiaceae) subsidiando programas de melhoramento genetic. *Rev. de Ensino FTC* v.12.
- Barroso, G. M., 1978. Passifloraceae. In: Sistemática de Angiospermas do Brasil. v. 1, Editora da Universidade de São Paulo, SP, p. 194-197.
- Benevides, C. R. 2006. Biologia Floral e Polinização de Passifloraceae Nativas e Cultivadas na Região Norte Fluminense-RJ. Dissertação (Mestre em Ecologia e Recursos Naturais) - da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes – RJ.
- Bernacci, L. C., Vitta, F. A., Bakker, Y. V., 2003. Passifloraceae. In: Wanderley, M. G. L., Shepperd, G. J., Melhem, T. S., Giulietti A. M., Kirizawa M. (Eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, RiMa/FAPESP, v.3, p. 247-274.
- Borém, A., 1999. Híbridaçãõ artificial de plantas. UFV, Viçosa.
- Bruckner, C. H., 1997. Perspectivas do melhoramento genético do maracujazeiro. In: Manica, I., Bruckner, C. H., Hoffmann, M. (Eds.) Maracujá: temas selecionados. Porto Alegre: Cinco Continentes Editora, p. 25-46.
- Bruckner, C. H., Melleti, L. M. M., Otoni, W. C., Zerbini Jr., F. M. 2002. Maracujazeiro. In: Bruckner, C. H. (Ed). Melhoramento de fruteiras tropicais. Viçosa, MG: UFV, p. 373-409.
- Bruckner, C. H., Otoni, W. C., 1999. Híbridaçãõ em maracujá. In: Borém, A. (Ed.), Híbridaçãõ artificial de plantas. Viçosa: Editora UFV, p. 379-399.
- Bruckner, C. H., Silva, M. M., Falleiro, T. M., Andrade, B. B., Moreira, A. E. 2000. Viabilidade do pólen de maracujazeiro sob diferentes condições de armazenamento. *Revista Ceres*, Viçosa. v. 47, p.523-531.

- Camillo, E. 2003. Polinização do Maracujá. Ribeirão Preto: Editora Holos.
- Cardoso, A. I. I., 2007. Produção de pimentão com vibração das plantas. *Ciência Agrotécnica* 31, 1061-1066.
- Cervi, A.C. (2005) Espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) publicadas e descritas nos últimos 55 anos (1950 –2005) na América do Sul e principais publicações brasileiras *Estudos de Biologia*, v. 27, n. 61, p. 19-24.
- Cervi, A. C. 2006. O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. *Adumbrationes ad Summae Editionem*, v. 16, p.1-5.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Cruden, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31, 32-46.
- Cruz, C. D. 2006. Programa Genes – estatística experimental e matrizes, Editora UFV, Viçosa.
- Cruz, T. V., Souza, M. M., Roza, F. A., Viana, A. J. C., Belo, G. O., Fonseca, J. W. S. 2008. Germinação In Vitro de grãos de pólen em *Passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. *Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP*, v. 30, n. 4, p. 875-879.
- Dafni, A. 1992. *Pollination Ecology: A Practical Approach*. Oxford: IRL, 250p.
- Feuillet, C. 2004. Passifloraceae (Passion Flower Family). p. 286-287 in Smith, N., Mori, S. A., Henderson, A., Stevenson, D. W., Heald, S. V. (Eds.) *Flowering Plants of the Neotropics*. Princeton - Oxford: Princeton University Press & New York Botanical Garden. 594 p.
- Franzon, R. C., Raseira, M. D. C. B. 2006. Germinação *in vitro* e armazenamento do pólen de *eugenia involucrata* dc (myrtaceae). *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP*, v. 28, n. 1, p. 18-20.
- Frazon, R. C., Corrêa, E. R. and Raseira, M. C. B. 2005. *In vitro* pollen germination of feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 5: 229-233.



- Hmeljevski, K. V., Reis, A., Reis, M. S., Rogaslski, J. M., Neto, C. D., Lenzi, M. 2007. Resultados Preliminares da Biologia Reprodutiva de *Dyckia ibiramensis* Reitz (Bromeliaceae): uma espécie rara e endêmica de Santa Catarina. *Revista Brasileira de Biociências* 5 (1): 267-269.
- Iuchi, V. L. 1994. Morfologia, biologia floral, propagação e crescimento de “rainha do abismo” (*Sinningia leucotrichia* Hoene) Moore. Tese. (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., 1999. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Press, New York.
- Koschnitzke, C., Sazima, M., 1997. Biologia Floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. *Revista Brasileira de Botânica* 20, 19-126.
- Li, Q.J., et al. 2002. Mating system and stigmatic behavior during flowering of *Alpinia kwangsiensis* (Zingiberaceae). *Plant Systematics and Evolution*, v.232. p.123-32.
- Meletti L. M. M., Santos R. R., Minami, K. 2000. Breeding of yellow passion-fruit: development of the cultivar Composto IAC-27. *Scientia Agrícola*, v.56, n. 3, p.491-498.
- Meletti, L. M. M., Soares-Scot, M. D., Bernacci, L. C., Passos, I. R. S., 2005. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (Eds.), *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Embrapa Cerrados, Planaltina, p. 55-78.
- Menzel, C. M., Simpson, D. R. 1988. Effect of continous shading on growth, flowering and nutrient uptake of passion fruit. *Scientia Horticulturae*, v.35, p.77-88.
- Miranda, P. A., Clement, C. R. 1990. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) palmae pollen. *Revista de Biologia Tropical*, San José, v. 38, n. 1, p. 29-33.
- Nunes, T. S. L., Paganucci, D. E, Queiroz, 2001. A família *Passifloraceae* na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Sitentibus Ciências Biológicas* 1, 33-46.
- Nunes, T. S., Queiroz, L. P. 2007. Uma nova espécie de *Passiflora* L. (Passifloraceae) para o Brasil. *Acta bot. bras.* 21(2): 499-502.

- Paterniani, M. E. A. G. Z. 2001. Use of heterosis in maize breeding: history, methods and perspectives – A Review. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 1, 159-178.
- Pio, L. A. S., Santos, F. C., Rufini, J. C. M., Ramos, J. D. and Araújo, A. G. 2004. Germinação *in vitro* de pólen de citros sob diferentes concentrações de cálcio e boro. *Revista Brasileira Agrociência* 10: 293-296.
- Reis, A., Rogasliki, J. M., Berkenbrock, I. S., Vieira, N. K. 2005. Conservação de espécies reófitas de *Dyckia* no Sul do Brasil. Relatório Parcial para Fundação Biodiversitas (Programa Espécies Ameaçadas), p. 28.
- Richards, A.J. 1986. Plant breeding systems. George Allen & Unwin, London.
- Scariot, A. O., Lleras, E., Hay, J. D. 1991. Reproductive Biology of the Palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. *Biotropica*. 23(1): 12-22.
- Semir, J. K. S., Brown, J. R. 1975. Maracujá: a flor da paixão. *Revista Geogr. Univ.* 5, 40-47.
- Silva, A. B., Souza, M. F., Brito, A. C., Pereira, D. A., Amaral, C. L. F. 2006. Relação pólen/óvulo do manjeriço-doce (*Ocimum canum* Sims): um indicativo do sistema reprodutivo In: Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC - Florianópolis, SC – Julho.
- Silva, M. M., Bruckner, C. H., Picanço, M., Cruz, C. D. 1999. Fatores que afetam a germinação do grão de pólen do maracujá: meios de cultura e tipos de agrotóxicos. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 34, n. 3, p. 347-352.
- Sobrinho, J. J. 2006. Avaliação de genótipos de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) no município de Poxoréu – MT. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical) – Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Cuiabá – MT.
- Sousa, J. S. I., Meletti, L. M. M. 1997. Maracujá: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba, FEALQ.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Viana, A. P., Pereira, M. G., Amaral Jr., A. T. e Madureira, H. C. 2004. As características da receptividade da flor e da fruta associadas à época da polinização no *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* do Passiflora amarelo da fruta de paixão Degener (Passifloraceae). *Scientia Horticulturae*, v.101, p. 373–385.

- Souza, M. M., Belo, G. O., Fonseca, J. W. S., Viana, A. J. C., Cruz, T. V., Soprani Jr., G. G., Roza, F. A., Silveira, A., Pereira, N. E. 2005a. Viabilidade polínica e receptividade do estigma em *Passiflora suberosa* por meio de testes histoquímicos como subsídio para hibridação interespecífica. In: 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS Gramado, RS. Livro Eletrônico de Resumos do 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas. RS - CD ROM.
- Souza, M. M., Cruz, T. V., Franco, M. A., Belo, G. O., Fonseca, J. W. S., Viana, A. J., Soprani Jr., G. G., Roza, F. A., Pereira, N. E., Silveira, A. 2005b. Estudo do sistema reprodutivo de *Passiflora suberosa* para fins de hibridação interespecífica. In: 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2005, Gramado – RS. Livro Eletrônico de Resumos do 3º CBMP.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Martins, E. R. 2002. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). *Ciência e Agrotecnologia*, 26: 1209-1217.
- Teixeira, C. G. 1994 Cultura. In: Maracujá: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, p.1-25.
- Varassin, I. G. e SILVA, A. G. 1999. A melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae), em vegetação de restinga. *Rodriguésia* 50(76/77): 5-17.
- Vasek, F. C. e Weng, V. 1988. Breeding systems of *Clarkia* section *Phaeostoma* (Onagraceae): I. Pollen-ovule ratios *Systematic Botany* 13: 336-350.
- Viana, A. P.; Pereira, T. N. S.; Pereira, M. G.; Souza, M. M.; Maldonado, J. F. M.; AMARAL JR, A. T. Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among *Passiflora* species using RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 25, n. 3, p. 489-493, 2003.
- Viana, A. J. C., Belo, G. O., Fonseca, J. W. S., Cruz, T. V., Roza, F. A., Soprani Jr., G. G., Souza, M. M. 2005. Viabilidade polínica por meio de testes histoquímicos utilizando lugol e solução de Alexander em *Passiflora coriacea*. In: 56º Congresso Nacional de Botânica. Curitiba, PR. Anais do 56º Congresso Nacional de Botânica. SP: Sociedade Botânica do Brasil, CD ROM.

Wyatt, R. 1984. Evolution of self-pollination in granite outcrop species of *Arenaria* (Caryophyllaceae). III. Reproductive effort and pollen-ovule ratios. *Systematic Botany* 9, 432-40.

## 5. CONCLUSÕES GERAIS

Os dados citogenéticos, morfológicos, e moleculares, possibilitaram melhor caracterização taxonômica para as espécies em estudo. Embora *P. capsularis* e *P. rubra* possuam características fenotípicas diferentes, ambas podem se tratar de uma mesma espécie, sendo essas diferenças categorizadas em variedade dentro da espécie, podendo ser duas formas botânicas, a exemplo de *P. edulis* e *P. edulis* f. *flavicarpa*.

Juntamente com os resultados obtidos da biologia da reprodução, pode-se concluir que a utilização da germinação in vitro para testes de germinabilidade de pólen de *P. capsularis* e *P. rubra*, usando o meio e condições descritas na metodologia, fornece resultados satisfatórios quando comparado à germinação in vivo. As análises da razão P:O demonstraram ser pouco eficientes na determinação do sistema reprodutivo nas espécies estudadas, uma vez que foram classificadas como autógamias obrigatórias, enquanto os testes de polinização indicaram boas taxas de cruzabilidade intra e inter-específica.

Portanto, concluímos que as espécies *P. capsularis* e *P. rubra* não puderam ser diferenciadas taxonomicamente pelas características analisadas (citogenética, molecular e morfológica). No entanto a caracterização do sistema reprodutivo será essencial para o estabelecimento de estratégias de conservação e de melhoramento genético, visando à obtenção de híbridos.

## 6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

ABREU, P. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A. A. F. 2008. Passion Xower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**.

ALLARD, R. W. 1999. Principles of Plant Breeding. New York: **John Wiley e Sons**, 254 p.

AMELA GARCÍA, M. T. AND HOC, P. S. 2001. Pollination of *PASSIFLORA*: do different pollinators serve species belonging to different subgenera? **Acta Hort. (ISHS) 561**: 71-74

AMELA GARCÍA, M. T. and HOC, P. S. 1997. Floral biology and reproductive system of *Phaseolus augusti* (Fabaceae). **Beitr. Biol. Pflanzen 70**: 121-140.

AMELA GARCÍA, M. T. and HOC, P. S. 1999. Biología floral y sistema reproductivo de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (Fabaceae). **Rev. Biol. Trop. 47**: 59-67.

AMELA GARCÍA, M. T. and HOC, P. S. 1998a. Floral biology and reproductive system of *Phaseolus augusti* (Fabaceae). **Beitr. Biol. Pfl. 70. (1)**: 121-140

AMELA GARCIA, M. T.; GALATI, B. G. and ANTON, A. M. 2002. Microsporogenesis, microgametogenesis and pollen morphology of *Passiflora* spp. (Passifloraceae) The Linnean Society of London, **Botanical Journal of the Linnean Society of London**, 139, 383–394.

BARBOSA, S.; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V. 2003. Citogenética de híbridos entre *Pennisetum purpureum* Schumach. e *Pennisetum glaucum* L. e seus genitores. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 1, p. 26-35.

BARROSO, G. M. 1978. Passifloraceae. In: Sistemática de Angiospermas do Brasil. Rio de Janeiro: **Livros Técnicos e Científicos**/ São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 194-197.

BARROSO, G.M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. 1999. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. **Viçosa**: UFV, 443 p.

BATTAGLIA, E. 1955. Chromosome morphology and terminology. **Caryologia**, v.8, p. 179-187.

BEAL, P. R. 1973. Cytology of native Australian and several exotic *Passiflora* species: 2. Chromosome morphology. **Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences**, v. 30, n.1, p. 17-18.

BELO, G. O.; FONSECA, J. W. S.; ROZA, F. A.; VIANA, A. J. C.; SOUZA, M. M. 2006. Viabilidade polínica por meio de testes histoquímicos em flores de maracujá. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Cabo Frio-RJ. **Palestras e Resumos** do XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura. SP: SBF.

BELO, G. O.; FONSECA, J. W. S.; VIANA, A. J. C.; NASCIMENTO, R. R.; ROZA, F. A.; SOUZA, M. M. 2005a. Análise da viabilidade de grãos de pólen de *Passiflora morifolia* através de testes histoquímicos. In: VIII SIMPÓSIO DE BIOLOGIA DO SUL DA BAHIA (SIMBIO). Ilhéus, BA. **Resumos** do VIII Simpósio de Biologia do Sul da Bahia (SIMBIO). Revista Eletrônica-CD ROM. Ilhéus-BA: UESC Empresa Júnior.

BELO, G. O.; SOUZA, M. M.; FONSECA, J. W. S.; ROZA, F. A.; VIANA, A. J. C.; CRUZ, T. V.; SOPRANI JR., G. G.; SILVEIRA, A.; PEREIRA, N. E. 2005b. Germinação in vitro e viabilidade polínica em *Passiflora suberosa* para sua utilização como genitor em produção de híbrido ornamental. In: 45º CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 15º CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS, 2º CONGRESSO BRASILEIRO DE CULTURA DE TECIDOS DE PLANTAS. Fortaleza, CE. **Suplemento da Revista Horticultura Brasileira**. Fortaleza, CE: Expressão Gráfica, v. 23. p. 550-550.

BENIN, G.; CARVALHO, F. I. F de; OLIVEIRA, A. C. de; MARCHIORO, V. S.; LORENCETTI, C.; KUEK, A. J.; SILVA, J. A. G.; CRUZ, P. J.; HARTWING, I.; SCHMIDT, D. A. M. 2003. Comparações entre medidas de dissimilaridade e estatística multivariadas como critérios no direcionamento de hibridações em aveia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, p. 657-662.

BENSON, W. W.; BROWN, K. S.; GILBERT, L. E. 1975. Coevolution of plant and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution**, v. 29, p. 659-680.

BENTO, D. A. V. Mapeamento de QTLs para produção de grãos e seus componentes em uma população de milho tropical. 2006. 134 f. **Tese** (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

BERNACCI L. C.; VITTA F. A.; BAKKER Y. V. 2003. Passifloraceae. In: WANDERLEY M.G.L.; SHEPPERD G.J.; MELHEM T.S.; GIULIETTI A.M.; KIRIZAWA M. (Eds.) **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. RIMA/FAPESP, v.3, p. 247-274.

BERNACCI, L. C. 2003 (Coord.) Passifloraceae. In: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MELHEM, T. S. (Ed.) **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: RiMa/FAPESP, v.3, p. 247-274

BERNACCI, L. C.; VITTA, F. A. 1999. Flora Fanerogâmica da Reserva do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil). **Hoehnea**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 135-147.

BERTÃO, M.R. 1993. Evolução cariotípica no gênero *Capsicum* (Solanaceae). 1993. 79 f. **Dissertação** (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade de São Paulo - USP, Piracicaba – SP.

BOWDEN, M. W. 1945. A list of chromosome numbers in higher plants. II *Menispermaceae* to *Verbenaceae*. **American Journal of Botany**, v. 32, p. 191-201.

BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; MORAES, C. F.; REGAZZI, A. J.; SILVA, E. A. M. 1995. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae**, v. 370, p. 45-57.

BRUCKNER, C. H.; MELLETTI, L. M. M.; OTONI, W. C.; ZERBINI JR., F. M. 2002. Maracujazeiro. In: BRUCKNER, C. H. (Ed). Melhoramento de fruteiras tropicais. **Viçosa**, MG: UFV, p. 373-409.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; CARDOSO-SILVA, C. B.; OLIVEIRA, A. C.; SOUZA, M. M.; CORRÊA, R. X. 2008. Amplificação cruzada de marcadores microssatélites (SSR) entre espécies de Maracujazeiro (Passifloraceae; *Passiflora*). in: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008. Salvador – BA. **Livro Eletrônico de Resumos do 54º CBG**.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; CARDOSO-SILVA, C. B.; OLIVEIRA, A. C.; SOUZA, M. M.; CORRÊA, R. X. 2008. Amplificação cruzada de marcadores microssatélites (SSR) em espécies do gênero *Passiflora*. in: 20º Congresso Brasileiro de Fruticultura, 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, 2008. Vitória – ES. **Livro Eletrônico de Resumos do 20º CBF**.



CERVI, A. C. 1986. Passifloraceae. **Flora do estado de Goiás - Coleção Rizzo 7**: 1-45. Universidade Federal de Goiás.

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

CERVI, A. C. 2005. Espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) publicadas e descritas nos últimos 55 anos (1950–2005) na América do Sul e principais publicações brasileiras. **Estudos de Biologia**, v. 27, n.61, p. 19-24.

CERVI, A. C. 2006. O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. **Adumbrationes ad Summae Editionem**, v. 16, p.1-5.

CERVI, A. C.; DUNAISKI JR., A. 2004. Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Distephana* (Juss.) Killip. **Estud. Biol. (Curitiba)**, 26(.55): 45-67.

CERVI, A. C.; SANTOS, E. P. 2000. Flórmula do Morro dos Perdidos, Serra de Araçatuba, Estado do Paraná, Brasil: Passifloraceae. **Estudos de Biologia**, PUCPR, Curitiba, **46**: 25-47.

CERVI, A.C. 2006. A new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Minas Gerais, Brazil. **Brittonia** 58: 385-387.

CHARLESWORTH, D. 2006. Evolution of Plant Breeding Systems. **Current Biology**, v. 16, p. 726-735.

CHARLESWORTH, B., 1994 Evolution in Age-structured Populations. Cambridge **University Press**, Cambridge, UK.

COLETTA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A.; TARGON, M. L. P. N.; MOREIRA, M. C. P. Q. D. G.; POMPEU JR., J. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. **Euphytica**, **102**: 133-139.

COLETTA FILHO, H. D.; MACHADO, M. A.; TARGON, M. L. P.N.; POMPEU JR. J. 2000. The use of Random Amplified Polymorphic DNA to evaluate the genetic variability of Ponkan mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) accessions. **Genetics and Molecular Biology**, **23**: 169-172.

CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B.; STENZEL, N. M. C. 2003. Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.5-10.

CRUDEN, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. **Evolution**, v. 31, p. 32-46.

CRUDEN, R. W. 2000. Pollen grains: why so many? **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, p. 143-165.

CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. 2003. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. v. 2, **Viçosa**: UFV, p. 585.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, J. A.; CARNEIRO, P. C. S. 2004. Divergência genética. In: CRUZ, C. D.; REGAZZI, J. A.; CARNEIRO, P. C. S. (Org). Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. **Viçosa**: UFV, p.377-413.

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

DEGINANI, N.B. 2001. Las especies argentinas del género *Passiflora* (Passifloraceae). **Darwiniana**, v. 39, p. 43-129.

DIAS, L. A. S.; KAGEYAMA, P. Y.; CASTRO, G. C. T. 1997. Divergência genética multivariada na preservação de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao* L.) **Agrotropica**, Ilhéus, v.9, p. 29-40.

DONADIO, N. M. M.; DEMATTÊ, M. E. S. P. 2000. Morfologia de frutos, sementes, e plântulas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) e jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex Benth.) - Fabaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 64-73

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. 1987. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. **Phytochemical Bulletin**, [S.l.], v.19, p.11-15.

ESCOBAR, L. K. 1989. A new subgenus and five new species in *Passiflora* (Passifloraceae) from South America. **Annals Molecular Botanic Garden**, v. 76, p. 877-885.

FAJARDO, D. et al. 1998. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. **Euphytica**, n.101, p. 341-347.

FARINAZZO, N. M.; SALIMENA, F. R. G. 2007. Passifloraceae na Reserva Biológica da Represa do Grama, Descoberto, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguesia**, v. 58, p. 823-833.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: **EMBRAPA/CENARGEM**, p. 220.

FEUILLET, C. 2004. Passifloraceae (Passion Flower Family). p. 286-287 in SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. (Eds.) **Flowering Plants of the Neotropics**. Princeton - Oxford: Princeton University Press & New York Botanical Garden. 594 p.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. 1999. A new infrageneric classification of *Passiflora*. In: INTERNATIONAL BOTANICAL CONGRESS, 16., 1999. Abstracts... St. Louis: Mc Graw Hill ; **Yale University Press**.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. 2003. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora**, v. 13, p. 34-38.

FONSECA, J. W. S.; BELO, G. O.; VIANA, A. J. C.; ROZA, F. A.; FREITAS, J. C. O.; SOUZA, M. M. 2006. Avaliação da viabilidade polínica, receptividade do estigma e germinação in vitro em *Passiflora micropetala* para sua utilização como genitor em hibridação interespecífica. In: XIX CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Cabo Frio, RJ. **Palestras e Resumos** do XIX Congresso Brasileiro de Fruticultura. SP: SBF.

FREITAS, P. C. D. 1985. Estudo Farmacognóstico comparativo de espécies Brasileiras do Gênero *Passiflora* L. **Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo**, São Paulo.

GIBBS, P. E.; MILNE, C.; CARRILLO, M. V. 1975. Correlation between the breeding system and recombination index in five species of *Senecio*. **New Phytology**, v. 75, p. 619-626.

GUERRA, M. 1988. **Introdução à Citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara. p. 140.

GUERRA, M. S. 1986. Citogenética de Angiospermas coletadas em Pernambuco. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 21-40.

HAMRICK, J. L. 1987. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations. In: **Differentiation patterns in higher plants**. Academic Press, p. 53-67.

HANDEL, S. N. 1983. Pollination ecology, plant population structure, and gene flow. In: REAL, L. (Ed) **Pollination biology** Orlando: Academic Press, p. 163-211.

HANSEN, A. K.; GILBERT, L. E.; SIMPSON, B. B.; DOWNIE, S. R.; CERVI, A. C.; JANSEN, R. K. 2006. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany**, v. 31, n. 1, p. 138–150.

HARTL, D. L.; JONES, E. W. 1998 Genetics: Principles and analyses. 4th edition., Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, **Massachusetts**, p. 842.

IUCHI, V. L. 1994. Morfologia, biologia floral, propagação e crescimento de “rainha do abismo” (*Sinningia leucotrichia* Hoene) Moore. 1994. **Tese**. (Doutorado) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

JOLY, A. B. 1998. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: **Companhia Editora Nacional**, p. 777.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. 1999. Plant systematics: a phylogenetic approach. **New York: Press**, p. 464.

- KAY, E. 2001. Observations on the pollination of *Passiflora pedunculiflora*. *Biotropica* 33(4): 709-713.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. 1993. Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado, Colorado, USA, p.583. Larcher, W. 1986. **Ecofisiologia vegetal**. EPU, São Paulo, Brasil, p.319.
- KILLIP, E.P. 1938. The American species of Passifloraceae. Publ. / Field Mus. Nat. Hist., Bot. ser. p. 613.
- KING, L.A. 2000. The Passiflora hybrid *P. Excel*: *P. edulis* (&#9792) x *P. caerulea* (&#9794). **Passiflora**, v. 10, p. 16-18.
- KOPTUR, S. 1984. Outcrossing and pollinator limitation of fruit set: Breeding systems of neotropical *inga* trees (Fabaceae: Mimosoideae). **Evolution, Vernon**, v. 38, n. 5, p.1130-1143, 1984.
- KOSCHNITZKE, C. & SAZIMA, M. 1997. Biologia Floral de cinco espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em mata semidecídua. **Rev. Bras. de Bot.** São Paulo. 20(2):19-126.
- LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, K. M.; GARCIA, A. A. F.; PATERNIANI, M. E. A. G. Z.; SOUZA, A. P. 2005. Tropical maize germplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molecular markers? **Theoretical and Applied Genetics**, v.111, p.1288–1299.
- LIMA-ROSA, C. A. V. 1998. Marcadores de DNA microssatélite em Oryzomyinos (Cricetidae, Rodentia) da região do cerrado brasileiro. 1998. 71 f. **Dissertação**. (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- MARTIN, F. W. & NAKASONE, H. Y. 1970. The edible species of *Passiflora*. **Economic Botany** 24: 333-343.
- MELETTI, L. M. M. 2003. Comportamento de híbridos e seleção de maracujazeiro (*Passifloraceae*) (Compact disc.) In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO,6., Campos dos Goytacazes, 2003. **Palestras**. Campos dos Goytacazes: Cluster Informática.
- MELETTI, L. M. M.; SANTOS, R. R.; MINAMI, K. 2000. Breeding of yellow passion-fruit: development of the cultivar Composto IAC-27. **Scientia Agrícola**, v.56, n. 3, p.491-498.
- MELETTI, L.M.M. 1995. Maracujá: produção e comercialização. Campinas: IAC, **Boletim técnico**, n. 158.
- MELO, N. F., CERVI, A. C., GUERRA, M. 2001. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 226, p. 69-84.

- MELO, N. F.; GUERRA, M. 2003. Variability of the 5S and rDNA sites in *Passiflora* L. with species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, v. 92, p. 309-316.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; BAUMGRATZ, J. F. A. 2004. *Passiflora* L. subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na região sudeste do Brasil. **Rodriguésia**, v. 55, n. 85, p. 17-54.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; BAUMGRATZ, J. F. A. 2004. *Passiflora* L. subgênero *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na região Sudeste do Brasil. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, 55(85): 1-54.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V.; BAUMGRATZ, J. F. A. 2004. Palinotaxonomia das espécies de *Passiflora* L. subg. *Decaloba* (DC.) Rchb. (Passifloraceae) no Sudeste do Brasil. **Rev. Bras. Bot.**, Brasília, 27(4): 655-665.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; VALENTE, M. C. 2004. Passifloraceae da mata de encosta do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ **Arq. Mus. Nac.**, Rio de Janeiro, 62(4): 367-374.
- MONDIN, C. A. 2001. *Passiflora organensis* Gardner (Passifloraceae), primeira citação para o Rio Grande do Sul. **Pesquisas Botânica**, 51: 147-150.
- MUSCHNER, V. C. 2005. Filogenia molecular, taxas evolutivas, tempo de divergência e herança organelar em *Passiflora* L. (Passifloraceae). 2005. 162 f. **Tese** (Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MUSCHNER, V. C.; LORENZ, A. P.; CERVI, A. C.; BONATTO, S. L.; SOUZA-CHIEZ, T. T.; SALZANO, F. M.; FREITAS, L. B. 2003. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, v. 90, n. 8, p. 1229-1238.
- MUSCHNER, V. C.; LORENZ, A. P.; CERVI, A. C.; VECCHIA, M.; BONATTO, S. L.; SALZANO, F. M.; FREITAS, L. B. 2006. Differential organellar inheritance in *Passiflora*'s (Passifloraceae) subgenera. **Genetica**, v. 128, p. 449-453.
- NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. 1969. *Passiflora* In: **Flora da Bahia**. 2006.
- NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. 2007. Uma nova espécie de *Passiflora* L. (Passifloraceae) para o Brasil. **Acta Botânica Brasilica** 21 (2): 499-502.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. 2005. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.5, p.331-333.
- OLIVEIRA, R. P.; NOVELLI, V. M.; MACHADO, M. A. 2000. Freqüência de Híbridos em Cruzamento entre Tangerina 'Cravo' e Laranja 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.9, p.1895-1903.

ORNDUFF, R. Reproductive biology in relation to systematics. **Taxon**, v. 18, p. 121-133.

PÁDUA, J. G. 2004. Análises genéticas de espécies do gênero *Passiflora* L. com base em abordagens filogenéticas, morfométricas e em marcadores microssatélites. **Tese** (Doutorado em Agronomia) Universidade de São Paulo (USP), São Paulo – SP.

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

PENHA, H. A. **et al.** 2007. Desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com microssatélites (SSR) em *Passiflora alata* e análise de transferibilidade de marcadores SSR entre *Passiflora* f. *edulis flavicarpa* e *Passiflora alata*. In: **53º Congresso Brasileiro de Genética**, Resumos 108.

PESSOA, S. V. A. 1994. Passifloraceae. In: LIMA, M. P. M.; GUEDES-BRUNI, R. R. (org.). Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, RJ. : aspectos florísticos das espécies vasculares. Rio de Janeiro : **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**,1:315- 322.

PESTSOVA, E.; KORZUN, V.; GONCHAROV, N. P.; HAMMER, K.; GANAL, M. W.; RÖDER, M. S. 2000. Microsatellite analysis of *Aegilops tauschii* germplasm. **Theoretical and Applied Genetics**, 101: 100-106.

RAVEN, P. H. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: cytology. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 62, p. 724-764.

REITZ, R. 1980 . Flora Ilustrada Catarinense: Passifloráceas. **Itajaí**: HBR.

RICHARDS, A. J. 1997. Plant breeding systems. Chapman & Hall, **London**. 529 p.

ROZA, F. A.; SOPRANI JR., G. G.; VIANA, A. J. C.; CRUZ, T. V.; FONSECA, J. W. S.; BELO, G. O.; SOUZA, M. M. 2005. Estudo de parâmetros da fenologia floral em espécies silvestres de *Passiflora* como subsídio para programas de hibridação. In: XI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UESC. Ilhéus, BA. **Anais** do XI Seminário de Iniciação Científica da UESC - CD Rom. Ilhéus : UESC-Empresa Júnior de Informática, p. 84-86.

RUSSELL, J.; FULLER. J.; YOUNG. G.; THOMAS, B.; TARAMINO, G.; MACAULAY, M.; WAUGH, R.; POWELL, W. 1997. Discriminating between barley genotypes using microsatellite markers. **Genome**, v. 40, p. 442-450.

SACCO, J. C. 1980. Passifloráceas. In: REITZ, R. (ed.), **Flora ilustrada Catarinense-Itajaí**: Herb. “Barbosa Rodrigues”.

SANTOS, A. S. 2000. Marcadores de DNA no melhoramento genético do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) visando resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*. 2000. 140 f. **Tese** (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, UENF, Campos dos Goytacazes, R.J.

SANTOS, E. A.; SOUZA, M. M.; ALMEIDA, A. A. F.; ABREU, P. P.; LAWINSCKY, P. R.; SOUZA, P. S. C.; ARAUJO, I. S.; FREITAS, J. C. O.; VIANA, A. P. 2007. Caracterização morfológica de híbrido interespecífico F1 UESC-HD13 de *Passiflora*. In: I WORKSHOP SOBRE PESQUISAS COM PASSIFLORAS NA UESC. Ilhéus, BA. **Resumos** do I Workshop sobre Pesquisas com Passifloras na UESC. Ilhéus, BA: UESC, v. 01, p. 73-73.

SHARMA, A. K.; SEM, S. 2002. Chromosome botany. Enfield, NH, USA: **Science Publishers**, p. 155.

SHIVANNA, K. R.; JOHRI, B. M. 1985. The angiosperm pollen structure and function. New Delhi, India: Wiley Eastern.

SILVA, A. G.; BARROSO, G. M. 1995. A biologia da reprodução de *Bonnetia stricta* (Theaceae). **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 33, p.115-138.

SNOW, N.; MacDOUGAL, J. P. 1993. New Chromosomes Reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Systematic Botany**, v. 18, n. 2, p. 261-273.

SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. 2005. Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: FALEIRO, F.G.;

JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 213-240.

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

SOUZA, M. M. 2002. Estudos genômico e reprodutivo em espécies de *Passiflora*. 2002. **Tese**. (Doutorado em Produção Vegetal) Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes – RJ.

SOUZA, M. M., PEREIRA, T. N. S., SILVA, L. C., REIS, D. S. S., SUDRÉ, C. P. 2003. Karyotype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro. **Cytologia**, v. 68, p. 165-171.

SOUZA, M. M.; CRUZ, T. V.; FRANCO, M. A.; BELO, G. O.; FONSECA, J. W. S.; VIANA, A. J.; SOPRANI JR., G. G.; ROZA, F. A.; PEREIRA, N. E.; SILVEIRA, A. 2005. Estudo do sistema reprodutivo de *Passiflora suberosa* para fins de hibridação interespecífica. In: 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, 2005, Gramado – RS. **Livro Eletrônico de Resumos do 3º CBMP**.

SOUZA, M. M.; MARTINS, E. R.; PEREIRA, T. N. S.; OLIVEIRA, L. O. 2003. Reproductive studies in ipecac (*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich; Rubiaceae): flower bud and anther size associated to male gamete development stages. **Cytologia**, Tokyo, v. 68, p. 351

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; SILVA, L. C.; REIS, D. S. S.; SUDRÉ, C. P. 2003. Karyotype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro. **Cytologia**, v. 68, p. 165-171.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G.; AMARAL Jr., A. T. e MADUREIRA, H. C. 2004. As características da receptividade da flor e da fruta associadas à época da polinização no *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* do *Passiflora* amarelo da fruta de paixão Degener (Passifloraceae). **Scientia Horticulturae**, v.101, p. 373–385.

STOREY, W. B. 1950. Chromosomes numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. **Pacific Science**, v. 4, p. 37-42.

STRUSS D. AND PLIESKE, J. 1998. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. **Theor. Appl. Genet.**97: 308-315.

TAUTZ, D.; RENZ, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 4127-4138.

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

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

VARASSIN, I. G. e SILVA, A. G. 1999. A Melitofilia em *Passiflora alata* Dryander (Passifloraceae), em Vegetação de Restinga. **Rodriguésia**, v. 50, p. 5-17.

VIANA, A. J. C.; BELO, G. O.; FONSÊCA, J. W. S.; CRUZ, T. V.; ROZA, F. A.; SOPRANI JR., G. G.; FRANCO, M. A. M.; SOUZA, M. M. 2005. Estudo do sistema reprodutivo de *Passiflora coriacea* para fins de hibridação interespecífica. Anais do **56° Congresso Nacional de Botânica**, SBB 2005, 9 a 14 de outubro de 2005, Curitiba, PR. CD Rom.

VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SOUZA, M. M.; MALDONADO, J. F. M.; AMARAL JR, A. T. 2003. Genetic diversity among yellow passion fruit commercial genotypes and among *Passiflora* species using RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 489-493.

VIEIRA, M. L. C.; BARBOSA, L. V.; MAYEDA, L. Y. 2004. Citogenética dos maracujazeiros (*Passiflora* spp.). In: LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. (Eds.)



Maracujá: produção e qualidade na passicultura. Crus das Almas, EMBRAPA **Mandioca e Fruticultura**, pp. 45-65.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. 1992. The families of Flowering Plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Disponível em: <http://biodiversity.uno.edu/delta>.

WEILER, R. 2006. Caracterização morfológica, citogenética e molecular de uma população de tangerineiras híbridas de 'Clementina Fina' (*Citrus clementina* Hort. ex. Tan.) e 'Montenegrina' (*C. deliciosa* Ten.). 2006. 67f. **Dissertação** (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WEISIN, G. K.; GARDNER, R. C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. **Genome**, **42**: 9-19.

WYATT, R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. In: REAL, L. (Ed) **Pollination biology**. Orlando: Academic Press, p. 51-95.

YAMAMOTO, I.; KADONO, Y. 1990. A study on the reproductive biology of aquatic *Utricularia* species in south. **Acta Phytotaxonomica et Geobotanica**, v. 41, p. 189-200.

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

ZEN, D. M.; ACRA, L. A. 2005. Biologia Floral e Reprodutiva de *Agapanthus africanus* (L.) Hoffmanns (Liliaceae). **Estud. Biolog.**, v.27, n.59.