UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS
GREICIELE FARIAS DA SILVEIRA

Diversidade genética e aspectos reprodutivos de *Passiflora cristalina* Vanderp. & Zappi, uma espécie nativa da Amazônia Matogrossense

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO BRASIL
FEVEREIRO - 2015

GREICIELE FARIAS DA SILVEIRA

Diversidade genética e aspectos reprodutivos de *Passiflora cristalina* Vanderp. & Zappi, uma espécie nativa da Amazônia Matogrossense

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Dra. Ana Aparecida Bandini Rossi

Co-orientadora: Profª. Dra. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho

Co-orientadora: Profª. Ph. D. Telma Nair Santana Pereira

ALTA FLORESTA
MATO GROSSO BRASIL
FEVEREIRO 2015

DIVERSIDADE GENÉTICA E ASPECTOS REPRODUTIVOS DE *Passiflora cristalina* VANDERP. & ZAPPI, UMA ESPÉCIE NATIVA DA AMAZÔNIA MATOGROSSENSE

GREICIELE FARIAS DA SILVEIRA

Dissertação apresentada à UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de Mestre.

Comissão Examinadora:

_____

Prof. Alexandre Magno Sebbenn (Ph.D., Genética Florestal) Instituto Florestal de São Paulo

_____

Profª. Sérgio Alessandro Machado Souza (D.Sc., Genética e Melhoramento de plantas) Universidade do estado de Mato Grosso

_____

Profª. Maurecilne Lemes da Silva Carvalho (D.Sc., Genética e Melhoramento) Universidade do estado de Mato Grosso (Co-orientadora)

_____

Profª. Ana Aparecida Bandini Rossi (D.Sc., Genética e Melhoramento) Universidade do estado de Mato Grosso (Orientadora)

M M M M MM

Mas, lutei para que o melhor fosse feito

Não sou o que deveria ser

M MM M M M MM M M

Marthin Luther King

A Deus
Aos meus pais, Ronaldo e Ieda
A meu irmão, Renan
Ao meu fiel companheiro Nego
Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida, por sempre estar ao meu lado, por me dar força e ser meu alicerce para seguir em frente em meio às adversidades.

À Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pelas oportunidades concedidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso (FAPEMAT) pela concessão da bolsa de estudo.

À minha orientadora, professora Dr. Ana Aparecida Bandini Rossi pelos seis anos de ensinamentos (graduação e mestrado), tudo que sei hoje, grande parte dos ensinamentos, deve-se a ela e ao tempo que trabalhei no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular. Obrigado pelo apoio, incentivo, profissionalismo, por acreditar no meu trabalho e pela confiança em mim depositada.

Aos meus pais, que estiveram sempre ao meu lado, sempre me incentivando quando tudo parecia ser tão difícil e por me apoiarem em meus sonhos, porque M MM gM M M M M M M MM M M Mmas um sonho que se sonha junto M M M M M MM M M formação, amo vocês.

Ao meu irmão que sempre esteve ao meu lado, pelos risos roubados e por sempre se fazer presente na minha vida.

Ao meu fiel e eterno companheiro NEGO que sempre esteve ao meu lado quando estava redigindo a dissertação, por toda alegria que sempre me proporcionou.

Aos meus amigos pela força que me deram para seguir em frente, me proporcionando alegria sempre, afinal, quem tem amigo, tem tudo! Priscila e meu lindo afilhado Arthur (presente concedido neste mestrado), Maria, Angélica, Tatá, Taynara, Rogério, Joelma, Bruna Caroline e Kemely, muito obrigado por sempre se fazerem presentes.

À turma do mestrado, por todo companheirismo, por todas as risadas e pela amizade que construímos nestes curtos e passageiros dois anos.

Aos meus melhores amigos de campo e laboratório: Tati quebra barraco (Tatiane Varella) e ao Exú (Maicon Arenas) que sempre estiveram ao meu lado durante toda essa caminhada, pelas risadas, os choros conjuntos, pela força, pelas palavras amigas e todos os ensinamentos que adquiri junto a vocês. Pelas noites em claro, por todo o companheirismo e amizade. O meu muito obrigado.

À Juliana, Bruna, Luana, Felipe, Auana e o professor Sérgio por todo o auxílio concedido sempre que precisei.

Aos colegas de laboratório, não apenas pela colaboração durante a execução da pesquisa, mas pelos momentos maravilhosos que passamos juntos.

Aos funcionários do *Campus* e a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente, pela amizade e ajuda! Meu eterno obrigado!

BIOGRAFIA

Greiciele Farias da Silveira, filha de Ronaldo Aparecido da Silveira e de Ieda Farias, irmã de Renan Farias da Silveira, nasceu em Alta Floresta - Mato Grosso no dia 04 de setembro de 1992. Em 2008, terminou o terceiro ano do Ensino médio na Escola Estadual Vitória Furlani, porém, da primeira série ao segundo ano do Ensino médio estudou na Escola estadual 19 de Maio. No ano de 2009 ingressou no curso de Licenciatura plena em Ciências Biológicas pela Universidade do Estado de Mato Grosso, *Campus* de Alta Floresta, o qual concluiu em 2012 sob a orientação da Profª. D.Sc. Ana Aparecida Bandini Rossi. Em 2013, iniciou o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas UNEMAT *Campus* de Alta Floresta, o qual concluiu em 2015, também com a orientação da Profª. D.Sc. Ana Aparecida Bandini Rossi.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 12
2. REVISÃO DE LITERATURA 14
2.1 Botânica e taxonomia 14
2.2 Importância econômica 15
2.3 Diversidade genética 15
2.4 Marcador molecular SSR 16
2.5 Receptividade estigmática 17
2.6 Viabilidade polínica 18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 20
4. CAPÍTULOS 25
4.1 CAPÍTULO 1 25
Estrutura Populacional e Variabilidade Genética em Populações Nativas de *Passiflora cristalina* Vanderpl. & Zappi, em Fragmentos Florestais no estado de Mato Grosso.25
RESUMO 25
INTRODUÇÃO 27
MATERIAL E MÉTODOS 28
Área de estudo 28
Material vegetal 29
Extração e quantificação de DNA 30
Amplificação via de PCR 30
Análise dos dados 31
RESULTADOS E DISCUSSÃO 32
CONCLUSÕES 37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 38
4.2 CAPÍTULO 2 41
Divergência genética entre genótipos de *Passiflora cristalina* Vanderpl & Zappi. baseada em caracteres de flores e frutos 41
RESUMO 41
ABSTRACT 42
INTRODUÇÃO 43
MATERIAL E MÉTODOS 44

Área de estudo 44
Material vegetal 44
Características morfológicas da Flor 46
Características morfológicas do fruto 48
Análise estatística 48
RESULTADOS E DISCUSSÃO 49
CONCLUSÕES 45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46
4.3 CAPÍTULO 3 48
Biologia floral, viabilidade polinica e receptividade estigmática de *Passiflora cristalina* Vanderpl. & Zappi 48
RESUMO 48
ABSTRACT 49
INTRODUÇÃO 50
MATERIAL E MÉTODOS 51
Área de estudo 51
Material Vegetal 52
Biologia Floral 52
Viabilidade Polínica 52
Receptividade estigmática 53
RESULTADOS E DISCUSSÃO 54
Biologia Floral 54
Viabilidade polínica 56
Receptividade estigmática 60
CONCLUSÕES 63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64
5. CONCLUSÕES GERAIS 68

RESUMO

Silveira; Greiciele Farias da; M. Sc.; Universidade do Estado de Mato Grosso; Feveiro de 2015. Diversidade genética e aspectos reprodutivos de *Passiflora cristalina* Vanderp. & Zappi uma espécie nativa da Amazônia matogrossense. Orientadora: Ana Aparecida Bandini Rossi. Conselheiras: Maurecilne Lemes da Silva Carvalho e Telma Nair Santana Pereira.

Passiflora cristalina é uma espécie nativa da Amazônia com ocorrência natural no municipio de Alta Floresta MT. Apresenta potencial ornamental, pode ser fonte de propriedades farmacológicas, genes de resistência para algumas espécies cultivadas, além de propriedades nutricionais para o consumo *in natura*. Entretanto, as modificações causadas pela ação antrópica têm promovido a extinção de muitas espécies. Diante disto, estudos que visem o resgate, a descrição e a avaliação das espécies são necessários, pois auxiliarão na elaboração de estratégias de uso sustentável destes recursos. O presente trabalho objetivou analisar a diversidade genética e aspectos reprodutivos em indivíduos de *P. cristalina* com ocorrência em populações naturais no municipio de Alta Floresta, MT. Para estimar a diversidade genética, foram amostrados 50 individuos, sendo 25 localizados em cada população (EPA e ECE), dos quais foram coletadas folhas para extração de DNA genômico. As amplificações foram realizadas via PCR com o emprego de 8 *primers* SSR. Foi avaliada também a divergência genética em 15 genótipos por meio de 30 características morfológicas, sendo 21 de flores e 9 de frutos. As características foram mensuradas em 150 frutos e 150 flores. Os aspectos reprodutivos foram avaliados por meio da viabilidade polínica com base em testes colorimétricos (solução tripla de Alexander, lugol e carmim acético), através da receptividade estigmática com auxilio do peróxido de hidrogênio e com base em observações no desenvolvimento floral. Estes aspectos foram avaliados do início da antese até a senescência floral (01h 13h). O número de alelos por loco SSR apresentou uma média de 5,62 e um total de 45 alelos para os 8 locos avaliados. Os resultados da Análise Descritiva por UPGMA e PCoA bem como a Análise de Variância Molecular, indicaram que há uma grande diversidade genética nas populações naturais de *P. cristalina*. A maior parte da variabilidade genética foi intrapopulacional (65%). O dendrograma gerado pelo método UPGMA e os dados rodados através do M M M o de dois grupos distintos. Os resultados das análises baseadas nas características morfológicas de frutos e flores também revelaram que há uma grande divergência genética entre os genótipos analisados. As características que mais contribuíram para a discriminação dos genótipos foram o peso fresco do fruto, o comprimento do estigma, o comprimento dos filamentos da corona, a largura do fruto, a largura da pétala e o peso da polpa. Sendo, portanto, os caracteres mais responsivos para a seleção de genótipos de *P. cristalina*. As menores contribuições para a diversidade foram obtidas dos caracteres: largura da antera, largura da bráctea e comprimento do fruto. Quanto aos aspectos reprodutivos, foi observado que *P. cristalina* inicia a abertura floral por volta da 01h da manhã e o processo de senescência por volta das 13h do mesmo dia tendo, portanto, uma antese com duração aproximada de 12h. A espécie possui flores hermafroditas, porém com comportamento masculino e feminino baseado na movimentação e posicionamento dos estiletes. A viabilidade polínica permaneceu alta, independente do horário de coleta e do corante utilizado, com um porcentual

superior a 92%, exceto para o horário das 13h, onde foi observada uma queda na porcentagem de viabilidade polínica. Os estigmas de *P. cristalina* permaneceram receptivos desde a antese até a senescência floral, com percentual médio acima de 71%; entretanto, às 13h observou uma queda da receptividade. Recomenda-se que as polinizações manuais na espécie sejam realizadas entre as 04h e 10h. Com base nos resultados obtidos neste estudo, verifica-se que as populações naturais de *P. cristalina* são importantes para subsidiar ações futuras de programas de melhoramento e de conservação, e uso destes recursos genéticos.

Palavras chave: Maracujá Silvestre, Recursos vegetais, Conservação.

ABSTRACT

Silveira; M.S.; University of Mato Grosso state; february 2015. *Passiflora cristalina* Vanderp. & Zappi Genetic diversity and reproductive aspects, native species from Mato Grosso Amazon. Adviser: Ana Aparecida Bandini Rossi. Counselors: Maurecilne Lemes da Silva Carvalho and Telma Nair Santana Pereira.

Passiflora cristalina is a native species from the Amazon with a natural occurrence in Alta Floresta municipal district MT. Its ornamental potential can be a source of pharmacological properties, resistance genes for some cultivated species and nutritional properties in natura consumption. However, the changes caused by anthropic have caused the extinction of many species. Before, it studies that aim the species rescuing, description and evaluation are needed as an aid in developing strategies for sustainable use of these resources. This study aimed to analyze the genetic diversity and reproductive aspects in *Passiflora cristalina* individuals occurring in natural populations in Alta Floresta municipal district - MT. To estimate the genetic diversity, 50 individuals were sampled, 25 from each population (EPA and ECE), whose leaves were collected for genomic DNA extraction. The amplifications were performed by PCR with the use of 8 SSR primers. Was also assessed the genetic diversity in 15 genotypes by 30 morphological characteristics, being 21 flowers and 9 fruits. The measured characteristics were 150 fruits and 150 flowers. The reproductive aspects were evaluated by the pollen viability based on colorimetric tests (Alexander triple solution, lugol and acetic carmine); through the stigmatic receptivity with the hydrogen peroxide aid and based in floral development observations. These aspects were evaluated in the beginning of the anthesis up to the floral senescence (01h 13h). The number of alleles per SSR locus had an average of 5,62, and a total of 45 alleles for the 8 evaluated loci. The descriptive analysis results by the UPGMA and the PCoA as well as the Molecular variance analysis indicated a high genetic diversity in natural Passiflora cristalina populations. Most of the genetic variability was intrapopulational (65%). The dendrogram generated by the UPGMA method and the data run through the structure made formation of two distinct groups possible. The analyzes results based on morphological fruits and flowers characteristics also revealed that there is a large genetic divergence among the analyzed genotypes. The characteristics that most contributed to the genotypes discrimination were the fresh fruit weight, the stigma length,the corona filaments length, the fruit width, the petal width and the pulp weight. Therefore, those were characters that most contributed to the selection of *Passiflora cristalina* genotypes. The smaller contributions to the diversity were obtained from the anther width, the bract width and the fruit length characters. As for the reproductive aspects, it was observed that the *Passiflora cristalina* starts the floral opening at around 01h and the senescence process at around 13h on the same day, one anthesis lasts about 12h. The species has hermaphrodite flower when one male and female behavior based on the movement and positioning of stilettos. The pollen viability remained high regardless the time collection and the dye used, with a percentage higher than 92%, except for the 1:00pm one, where a decrease in the percentage of pollen viability was observed. The *Passiflora cristalina* stigmas remained receptive from the anthesis to the floral senescence, with an average percentage above 71%; however, at 01h a decrease in receptivity was observed. It is recommended that in this species the manual pollinations should be performed

between 04h and 10h. Based on the results obtained in this study, it is verified that the Passiflora cristalina natural populations are important to support breeding, conservation and use of these genetic resources in future program actions.

Keywords: Wild passion fruit, Plant resources, Conservation.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Passifloraceae é constituída por 20 gêneros e cerca de 600 espécies com ampla distribuição em regiões tropicais a temperadas, dos quais, quatro apresentam ocorrência no Brasil: Passiflora L., Dilkea Mast. e Mitostemma Mast. e Ancistrothyrsus Harms (Cervi, 2005; Souza e Lorenzi, 2008). O Brasil é considerado centro de origem e o maior centro de diversidade genética do gênero *Passiflora* com aproximadamente 140 espécies nativas, sendo 83 endêmicas (Bernacci et al., 2013).

A reprodução sexuada das espécies deste gênero pode envolver sistemas de polinização cruzada ou de autofecundação, além de algumas espécies apresentarem sistemas de autocompatibilidade e autoincompaibilidade, havendo casos em que ocorrem ambos os sistemas reprodutivos dentro de uma mesma espécie (Endress, 1994). Entrentato, sua grande maioia são espécies de polinização cruzada, pois, as flores de *Passiflora* apresentam mecanismos que dificultam a ocorrência da autopolinização (Hoffmann,1997). Um desses mecanismos, são as flores maiores, fator que favorece a polinização cruzada, devido a ação de polinizadores como as abelhas de grande porte, vespas, aves e vertebrados (Varassin, 2005).

Apesar da grande representatividade do gênero *Passiflora* (Cervi, 2005), várias espécies ainda vêm sendo descobertas e caracterizadas, dessa forma, para que a variabilidade genética presente seja utilizada da melhor forma possível, é necessário que haja uma efetiva caracterização e avaliação morfológica, reprodutiva e molecular, contribuindo assim, para a conservação e caracterização destas espécies silvestres

Espécies do gênero *Passiflora* são consumidos *in natura* ou utilizados para produção de sucos e doces, e muitas destas, possuem valor ornamental, em função da vistosidade e exuberância de suas flores, além de apresentarem propriedades medicinais (Cerqueira-Silva et al., 2012). *Passiflora* silvestres apresentam grande contribuição no melhoramento genético do maracujazeiro comercial, por apresentarem, além da resistência a doenças e algumas pragas, outras características interessantes, como longevidade, autocompatibilidade, maior adaptação às condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, androginóforo mais curto que facilita a polinização por insetos menores e maior concentração de componentes químicos (Meletti et al., 2005; Junqueira et al., 2005).

Passiflora cristalina Vanderp. & Zappi é uma espécie com ocorrência natural no Município de Alta Floresta, descrita recentemente e com estudos relativamente escassos. Sendo assim, trabalhos referentes à diversidade genética, aspectos reprodutivos e divergência genética, permitem a caracterização e ainda fornecem conhecimentos que poderão auxiliar em futuros trabalhos de melhoramento genético, bem como na conservação da espécie em estudo e do gênero *Passiflora*.

Diante disto, estudar a diversidade genética é uma atividade de grande relevância para o melhoramento de plantas e para a conservação de muitas espécies. Por meio desse conhecimento, é possível identificar genótipos contrastantes, com características de interesse, como fontes de resistência a doenças e alta produtividade, a fim de realizar cruzamentos promissores, para serem utilizados em programas de melhoramento (Cruz e Carneiro, 2006).

A grande importância de estudos de divergência genética está no conhecimento do grau de variabilidade genética das populações (Amaral Júnior e Thiébaut, 1999) pois, tais estudos, obtidos antes que qualquer cruzamento seja realizado, poderá auxiliar o melhorista a concentrar seus esforços nas combinações mais promissoras, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento genético (Wagner Júnior, 2011).

Outro parâmetro relevante para complementar a caracterização de plantas de interesse para o melhoramento genético é a viabilidade polínica, uma vez que constitui um importante parâmetro em análises de fluxo gênico (Martins et al., 1981; Botto, 1997), além de ser fundamentais para estudos taxonômicos, assim como, para estudos ecológicos e palinológicos, fornecendo informações básicas para a aplicação prática na conservação genética, como no monitoramento do grão de pólen de modo a garantir a fecundação, tornando possíveis cruzamentos entre genótipos com potencial econômico (Alexander, 1969).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo estimar a diversidade genética, avaliar a divergência com base em características morfológicas e estudar os aspectos reprodutivos de *P. cristalina*, visando promover a caracterização, conservação e prospecção desta espécie silvestre recentemente descrita.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Botânica e taxonomia

A família Passifloraceae é composta por aproximadamente 18 gêneros e 530 espécies, congregando herbáceas, trepadeiras, lenhosas e espécies arbóreas, sendo estas mais raras (Paull e Duarte, 2012). No Brasil ocorre a existência de quatro gêneros *Ancitrothysus* Harms, *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast., e o gênero *Passiflora*, que é o mais importante e abundante com cerca de 140 espécies nativas e 83 endêmicas (Bernacci et al., 2013).

O gênero *Passiflora* em geral caracteriza-se por possuir caule cilíndrico ou quadrangular, ramificado, anguloso, suberificado, glabro ou piloso (Vanderplank, 2000). Este gênero possui uma enorme variação fenotípica, em especial, nas folhas, sendo esta uma estratégia de escape contra o ataque de borboletas (Feuillet e Macdougal, 2007). As folhas podem ser alternadas, simples ou compostas, inteiras ou lobadas e forma variável, de margem inteira ou serrilhada. É possível observar glândulas nectaríferas, no pecíolo, na margem da bráctea ou na parte dorsal da folha (Cervi et al., 2010).

Caracterizam-se ainda pela presença de gavinhas axilares, nectários extraflorais no pecíolo foliar, flores com androginóforo e corona de filamentos em uma, a várias séries, cinco estames e três carpelos (Ulmer e Macdougal, 2004). Podem apresentar flores solitárias ou em pares, raramente formando inflorescências cimosas, normalmente com brácteas e com cinco sépalas que eventualmente possuem glândulas (Feuillet e Macdougal, 2007).

Na maioria das espécies, as flores apresentam heterostilia, autoincompatibilidade, protandria, que favorecem a polinização cruzada (Rego et al., 1999). Devido às características das flores de Passiflora, a polinização depende de agentes polinizadores, principalmente de grande porte, como as mamangavas, vespas, mariposas, borboletas e morcegos (Varassin et al., 2001). Os frutos são do tipo bagas e indeiscentes e as sementes são comprimidas, reticuladas, escavadas ou alveoladas (Farinazzo e Salimena, 2007).

A espécie *P. cristalina* caracteriza-se pela presença de flores solitárias, hermafroditas, actinomorfas, cíclicas e homoclamídeas. Apresentam três brácteas com glândulas. O cálice é formado por cinco sépalas, dialisépala, linear-lanceoladas, vermelhas e carenadas no dorso. A corona é constituída por duas séries de

filamentos radiais (estaminoides). Os frutos de *P. cristalina* possuem formato ovoide, do tipo baga, apresentando coloração esverdeada com máculas brancas, adquirindo coloração amarronzada quando maduros e sabor agridoce (Freitas, 2010).

2.2 Importância econômica

No Brasil, o cultivo do maracujá está diretamente associado ao fruto, visando o aumento da produtividade, qualidade do fruto e resistência a doenças (Meletti, 2011). Dessa forma, o melhoramento genético está diretamente ligado à qualidade do fruto (Bruckner et al., 2002), seja para o consumo in natura ou para a indústria. Para o mercado *in* natura são priorizados os frutos grandes e ovais, a fim de se obter boa aceitação comercial. Por outro lado, a indústria de sucos visa o maior rendimento da polpa, mais acidez, coloração constante e ao alto teor de sólidos solúveis (Gomes et al., 2006).

O maracujazeiro ainda pode ser utilizado para a indústria farmacêutica, uma vez que seus frutos e folhas apresentam propriedades medicinais, como a passiflorina ou maracujina, calmantes naturais (Souza e Meletti, 1997). Além de apresentar propriedades como vermífugo e febrífugo e também efeitos diuréticos, antiblenorrágicos, hipnóticos e abortivos para o gado (Oliveira, 1987), podem ser utilizados ainda em tratamentos de tumores gástricos e estresse, fazendo parte do conhecimento tradicional associado à cultura de diferentes povos (Gosmann et al., 2011).

Outro mercado que vem crescendo com a utilização do maracujazeiro é o mercado florístico. Devido ao valor ornamental das belas flores que a planta produz, despertam interesse pela sua beleza exótica com formatos e cores impares (Abreu et al., 2009). Cruzamentos interespecíficos têm sido realizados a fim de obter flores com formato e cores peculiares, destinada para a utilização na linha do agronegócio de plantas ornamentais (Santos et al., 2011).

2.3 Diversidade genética

Diversidade genética é a porção hereditária de uma variação possível de ser observada e mensurada, sendo empregada como termo alternativo para representar a variação genética, indicando o somatório da informação genética conhecida e

potencial de indivíduos, grupos de indivíduos, populações ou subpopulações (Vilela-Morales et al., 1997).

A diversidade genética é avaliada a partir de características agronômicas, morfológicas, moleculares, entre outras, sendo que as informações obtidas com as avaliações são expressas em medidas de dissimilaridade que representam a diversidade no conjunto de acessos estudados (Cruz et al., 2011).

Os estudos sobre a diversidade genética facilitam a identificação de variações genéticas (Lima et al., 2003), permitem conhecer os padrões de variabilidade entre e dentro de populações, sendo considerados um valioso instrumento que poderá ajudar na adoção de práticas mais eficientes, no tocante à conservação, podendo servir de base para técnicas de manejo adequado de fragmentos e fornecer subsídios para medidas de conservação *in situ* (Renau-Morata et al., 2005). Assim, permite descrever e diferenciar acessos, o que facilita na identificação de genótipos contrastantes a fim de realizar cruzamentos promissores e encontrar fontes de resistências a doenças (Cruz e Carneiro, 2006).

Porém, a falta de informações sobre os aspectos genéticos das espécies é um dos principais problemas na avaliação de recursos genéticos e decorre, principalmente, da carência de estudos sobre diversidade genética. Esse problema dificulta o estabelecimento de estratégias que assegurem não só a conservação de populações naturais de plantas ecologicamente importantes, mas também a de outros recursos genéticos potencialmente úteis às populações humanas (Blanco, 2007).

2.4 Marcador molecular SSR

Os marcadores moleculares têm contribuído para a caracterização de germoplasma já que são capazes de localizar diferenças significativas em nível de DNA. Com os marcadores moleculares, a caracterização pode ser realizada em uma maior velocidade, qualidade e em larga escala (Varshney et al., 2005).

Os marcadores microssatélites são sequências simples repetidas em tandem, com um a seis nucleotídeos. Estas regiões são conhecidas como SSRs (*Simple Sequence Repeats*) ou STRs (*Short Tandem Repeats*), estão presentes no genoma de eucariotos e procariotos (Field e Wills, 1996), e por isto representam a classe de marcadores moleculares mais polimórficos disponíveis atualmente.

Estes marcadores são os que mais se destacam no estudo da diversidade genética por serem codominantes, característica esta que permite a distinção entre homozigotos e heterozigotos, além de se mostrarem altamente reproduzíveis e usualmente multialélicos (Pereira, 2005). Neste sentido, muitos alelos podem ser detectados para uma determinada população, onde indivíduos homozigotos possuem o mesmo número de repetições nos dois cromossomos homólogos, enquanto indivíduos heterozigotos possuem número de repetições diferentes nos homólogos (Zane et al., 2002).

As sequências de microssatélites variam de uma espécie para outra, porém as regiões flanqueadoras são bastantes conservadoras, o que permite desenhar *primers* para amplificar os alelos dos locos microssatélites (Pádua, 2004). Oliveira et al. (2005) desenvolveram e caracterizaram marcadores microssatélites para a espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* através de uma biblioteca genômica enriquecida.

2.5 Receptividade estigmática

A receptividade do estigma é um estádio muito importante da maturação da flor que pode influenciar grandemente a taxa de fertilização (Galen e Zimmer, 1987). O tempo de receptividade do estigma pode variar de poucas horas até 10 dias. A idade da flor, o horário do dia, e a presença ou a ausência de exsudato no estigma são fatores que influenciam a receptividade do estigma.

A receptividade do estigma pode ser determinada por mudanças morfológicas, como por exemplo, presença de exsudatos e mudança de coloração no estigma e por testes para verificação de enzimas ativas, como a peroxidase e a esterase (Dafni, 1992).

Desta forma, conhecer o período em que o estigma encontra-se receptivo ao grão de pólen é fundamental para garantir o sucesso em experimentos de hibridação e em todo e qualquer procedimento que ocorra polinização artificial (Bruckner et al., 1995). Permite, assim, programar o processo de polinização, em termos de tempo despendido e quantidade de pólen utilizado, uma vez que, devido à falta de informações sobre o período exato de receptividade do estigma, as polinizações são feitas repetidas vezes, para assegurar na produção de sementes (Hodgson**,** 1976).

Existem numerosas técnicas para estimar a receptividade do estigma (Dafni, 1992; Kearns e Inouye, 1993), uma delas é o uso de peróxido de hidrogênio, onde ocorre a detecção da ação da peroxidase (Osborn et al., 1998) sendo este um método simples e barato (Maués e Couturier, 2002).

2.6 Viabilidade polínica

A viabilidade polínica é considerada importante e útil na condução de experimentos nas áreas agrícolas e biotecnológicas, pois possibilitam correlacionar anormalidades meióticas à infertilidade do pólen, auxiliar na seleção de materiais genéticos e fazer inferências sobre as direções dos cruzamentos (Techio, 2002).

Sendo assim, fornece informações básicas de aplicação prática na conservação genética e contribui em estudos taxonômicos, ecológicos e palinológicos (Guinet, 1989), além de ser um importante parâmetro em análises de fluxo gênico (Martins et al., 1981; Botto, 1997).

A viabilidade do grão de pólen pode ser determinada por meio de diferentes técnicas (Dafni, 1992; Kearns Inouye, 1993). Um destes métodos são os testes colorimétricos que utilizam corantes químicos específicos que reagem com componentes celulares presentes no grão de pólen maduro. Este método apresenta algumas vantagens, como à rapidez e facilidade em relação à germinação de pólen *in vitro*, entretanto, uma desvantagem do uso deste método é que os corantes superestimam a viabilidade do pólen, já que grãos de pólen inviáveis podem ser corados devido à presença de enzimas, amido ou outras substâncias (Galletta,1983).

Dentre estes testes, destacam-se os testes com lugol, sudan IV, carmim acético e a solução tripla de Alexander (Pagliarini e Pozzobon, 2004). Em testes colorimétricos, a viabilidade polínica relaciona-se diretamente com a normalidade da microsporogênese (Muñoz et al., 2006).

O lugol e o sudan IV são utilizados em alguns estudos como indicativos de viabilidade polínica (Souza et al., 2002; Huang et al., 2004). Entretanto, esses testes estão associados apenas à detecção e substâncias constituintes dos grãos de pólen, como amido e lipídios que podem estar presentes tanto em grãos de pólen maduros como nos abortados (Rodriguezriano e Dafni, 2000). O carmim acético indica a integridade cromossômica, enquanto que a solução de Alexander contém fucsina

ácida e verde de malaquita que reagem, respectivamente, com o protoplasma e a celulose da parede do pólen (Munhoz et al., 2008).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P.P., SOUSA, M.M., SANTOS, E.A., PIRES M.V., PIRES M.M., ALMEIDA A.A.F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brasil. **Euphytica**,166: 307 315.2009.

ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. **Stain Technology**. 44:117-122. 1969.

AMARAL JÚNIOR, A.T.; THIÉBAUT, J.T.L. **Análise multivariada na avaliação da diversidade em recursos genéticos vegetais.** Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 1999. p.155 (Apostilha).

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. *Passifloraceae*. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB000182>. Acesso em: 13, julho, 2013.

BOTTO, V.O. Cruzamientos interspecíficos en *Eucalyptus* sp. **XI Congreso Forestal Mundial**, Antalya, Turquía 8:1-9. 1997.

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

BRUCKNER, C.H., MELETTI, L.M., OTONI, W.C., JUNIOR, F.M.Z. **Melhoramento de fruteiras tropicais**, Viçosa: UFV,2002. p.373-410.

BLANCO, A.J.V.; PEREIRA, M. F.; COELHO, A. S. G.; CHAVES, L. J. Diversidade genética em populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) por meio da análise de seqüências de cpDNA**. Pesquisa Agropecuária Tropical.** 37: 169-175, 2007.

CERVI, A.C. 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**. 27: 19-24. 2005.

CERVI, A.C., MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A., BERNACCI, C. (2010) Passifloraceae. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB000182>. Acesso 20, janeiro, 2013.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. et al. Genetic variation in a wild population of the M M M (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto.11: 731-738. 2012.

CRUZ, C.D., CARNEIRO, P.C.S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético.** 2nd ed.Viçosa: UFV, 2006.p.585.

CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética.** Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2011. p.620.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a practical approach**. New York: IRL, 1992. 250p.

Endress, P. K. **Diversity and evolutionary biology of tropical flowers**. Cambridge, Cambridge University Press, 1994. 511p.

FEUILLET, C., MACDOUGAL, J.M. Passifloraceae. In: Kubitzi, K. The Families and Genera of Vascular Plants. **Springer**, Berlin. 9: 270-281.2007.

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

FIELD, D.; WILLS, C. Long polymorphic microssatelites in simple organisms. **Proceeding of the Royal Society of London**. Series B. 263: 209-215.1996.

FREITAS, E. J. **Reprodutiva e germinação de *Passiflora cristalina* Vanderpl. & Zappi em fragmentos florestais no perímetro urbano do município de Alta Floresta** MT. Alta Floresta, Mato Grosso: Universidade do Estado de Mato Grosso. 2010. 93p.

GALETTA, G. J. **Pollen and Seed Management**. Methods in fruit Breeding**.** Indiana: Purdne Universitz Press, 1983.p. 23-47,

GALEN, *C.,* ZIMMER, K. A., NEWPORT, M. E. A. Pollination in floral scent morphs of *Polemonium uiscosum**:*** a mechanism for disruptive selection on flower size. **Evolution,** 41: 599-606.1987.

GOMES, T.S., CHIBA, H.T., SIMIONATO, E.M.R.S., SAMPAIO, A.C. Seleção afruvec, em função das condições de armazenamento dos frutos, **Alimentos e Nutrição Araraquara**, 17: 401-405.2006.

GOSMANN, G., PROVENSI, G., NARDI, L.; MARIS, S.; RATES, K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de Passiflora L (Passifloraceae), **Revista Brasileira de Biociências**, 9: 88-99.2011.

GUINET, P.H. Advances in legume biology: structure evolution, and biology of pollen in Leguminosae.**Missouri Botanical Garden**, 1989.p.842.

HODGSON. L.M. Some aspects of flowering and reproductive behaviour in *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden at J.D.M.. Keet Forest Research Station (Formerly Zomerkomst Forest Research Station): 1 - flowering, controlled pollination methods, pollination and receptivity. **South African forestry journal**, Pretoria. 97:18-28.1976.

HOFFMANN, M. Polinização do maracujá amarelo *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. In: MANICA, I. (Ed.). **Maracujá:** temas selecionados (1). Porto Alegre: Cinco Continentes. 1997.p.58-70.

HUANG, Z., ZHU, J., MU, X. & LIN, J. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany** 93:295-301. 2004.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. **Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças.**(Ed.)Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. Cap. 4, 2005.p.81-107.

KEARNS, C. A.; INOUYE, D. W. **Techniques for pollination biologists.** Niwot, Colorado: University Press, 1993.p.559.

LIMA, M.R.; AUGUSTIN, E.; CHOER, E.; RASEIRA, M. do C.B. Caracterização de cultivares de pessegueiro e de nectarineira por marcadores moleculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 38: 349-355. 2003

MAUÉS, M.M.; COUTURIER, G. Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. 25: 441-448. 2002.

MARTINS, M.E., PRERA, L.E.H.; KAGEYAMA, P.Y. **Manejo de pólen de *Pinus* para fins de melhoramento genético.** Piracicaba, Instituto de Pesquisas e estudos florestais, IPEF**.** Circular Técnica nº 128.1981.p.1-7.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. da S **Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro**. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). Maracujá. 2005.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas.33: 83-91.2011.

MUNHOZ, M.; LUZ, C.F.P.; MEISSNER-FILHO, P.E.;BARTH, O.M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**. 31: 209-214.2008.

MUÑOZ, A. M, CAETANO, C. M., VALLEJO, F. A., SANCHEZ. M. S. Comportamiento meiótico y descripción morfológica del polen de pronto alivio. **Acta Agronómica.** 55: 37-42. 2006.

OLIVEIRA, J. C. **Melhoramento genético.** In: RUGGIERO, C. (Ed.) Cultura do maracujazeiro. Ribeirão Preto: L. Summa. 1987.p.218-246,

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. flavicarpa). **Molecular Ecology Notes**. 5:331- 333, 2005.

OSBORN, M. M;.KEVAN, P. G. LANE, M. A. Pollination biology of *Opuntia polyacantha* and *Opuntia phaeacantha* (Cactaceae) in southern Colorado. **Plant Systematics and Evolution**.159: 85-94, 1998.
PAULL, R. E.; DUARTE, O. **Tropical fruits**. 2. Ed. Wallingford: CABI. 2012.p.371.

PÁDUA, J. G. Análises **genéticas de espécies do gênero Passiflora L. com base em abordagens filogenéticas, morfométricas e em marcadores microssatélites**. Piracicaba.r M M M M M M M M M M M Paulo, 2004.127p. (Tese-Doutorado em Agronomia).

PAGLIARINI, M. S., POZZOBON, M. T. **II Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Distrito Federal. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2004.

REGO, M. M.; BRUCKNER, C. H.; SILVA, E. A. M.; FINGER, F. L.; SIQUEIRA, D. L.; FERNANDES, A. A. Self incompatibility in passion fruit: evidence of two locus genetic control. New York.**Theoretical and Applied Genetics.** 98: 564-568, 1999.

RENAU-MORATA, B.; NEBAUER, S.G.; SALES,E.; ALLAINGUILLAUME, J.; CALIGARI, P.; SEGURA, J. Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlantica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphism DNA. **American Journal of Botany**. 92: 875 884. 2005.

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

SANTOS, E.A.; SOUZA, M.M.; ABREU, P. P., Da Conceição, L.D.H.C.S., Araújo, I.S., Viana, A.P., Almeida, A.-A.F. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of Passiflora L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica.**184: 389-399.2011.

SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá:** espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: FEALQ. 1997.179 p.

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

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II.** 2nd ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2008. 704 p.

TECHIO, V. H. ,**Meiose e análise genômica em Pennisetum spp**. Lavras. Universidade Federal de Lavras. 2002.p.104. (Tese-Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

ULMER, T., MCDOUGAL, J.M. ***Passiflora*: Passionflowers of the World**.2004. p.276.

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

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

VARASSIN, I. G.; TRIGO, J.; SAZIMA, M. The role of néctar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of Passiflora (Passifloraceae) in South-Eastern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean** Society, London.136, p: 139-152. 2001.

VARASSIN, I.G. Polinização em espécies cultivadas de maracujá e conservação da fauna nativa. 56° **Congresso Nacional de Botânica**. SBB/UFPR/UEPG, Curitiba, CD-ROM. 2005.p.3.

VILELA-MORALES, E.A.; VALOIS, A. C. C.; NASS, L.L. **Recursos genéticos vegetales**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa Cenarge. 1997. p.78.

WAGNER JÚNIOR, A. et al. Divergência genética entre progênies de Pessegueiro em Zaragoza, Espanha. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 33:303-310. 2011.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**.11:1-16. 2002.

4. CAPÍTULOS

4.1 CAPÍTULO 1

Estrutura Populacional e Variabilidade Genética em Populações Nativas de *Passiflora cristalina* Vanderpl. & Zappi, em Fragmentos Florestais no estado de Mato Grosso.

RESUMO

Passiflora cristalina é uma espécie nativa da Amazônia Meridional com ocorrência natural no Município de Alta Floresta, MT. A espécie por ter sido recentemente descrita apresenta poucos estudos, sendo uma espécie de grande potencial para estudos de conservação e melhoramento genético. O presente estudo objetivou avaliar a diversidade genética de populações nativas de *P. cristalina* por meio de marcador molecular SSR. Para o estudo foram selecionadas duas populações denominadas: ECE (Estrada Central) e EPA (Estrada Porto de Areia) e amostrados um total de 50 indivíduos, sendo 25 provenientes de cada população, dos quais foram coletadas folhas para extração de DNA genômico. As amplificações foram realizadas via PCR com o emprego de 8 *primers* SSR. O número de alelos por loco variou de 3 a 10 com média de 5,62, e um total de 45 alelos para os 8 locos avaliados. A heterozigozidade esperada apresentou média de 0,71, enquanto que o número de alelos efetivos apresentou uma média de 4,05. O GST variou de 0,26 a 1,78, com uma média de 0,83, refletindo um nível de diferenciação entre as populações de *P. cristalina*, e o fluxo gênico (Nm) apresentou uma média de 1,16. A AMOVA revelou que a maior parte da variabilidade encontra-se dentro das populações (65%) do que entre as populações (35%). O dendrograma gerado pelo método UPGMA possibilitou a formação de dois grupos distintos, assim como no M M M M M M M M M M suas respectivas populações. Devido aos elevados níveis de diversidade detectados no presente estudo nas duas populações confirmadas pela diversidade genética, é de grande importância que sejam realizadas estratégias que visem a caracterização, conservação e prospecção desse material.

PALAVRAS- CHAVE: Maracujá, Variabilidade Genética, Marcador molecular (SSR).

Population Genetic Structure and Variability in Native Populations of *Passiflora cristalina* Vanderpl. & Zappi Forest Fragments in Mato Grosso state.

ABSTRACT

Passiflora cristalina Vanderpl. & Zappi is a native species from the Meridional Amazon with a natural occurrence in Alta Floresta municipal district - MT. Few studies of these species have been recently described, being a great potential for genetic conservation and breeding studies. This study aimed to evaluate the genetic diversity of native Passiflora cristalina populations through the SSR molecular marker. For the study, two populations denominated were selected: ECE (Central Road) and EPA (Sand Port Road), and a total of 50 individuals were sampled, 25 from each population, whose leaves were collected for the genomic DNA extraction. The amplifications were performed by PCR with the use of 8 SSR primers. The number of alleles per locus ranged from 3 to 10 with an average of 5,62, and a total of 45 alleles for the 8 evaluated loci. The expected heterozygosity presented an average of 0,71 while the number of effective alleles reported an average of 4,05. The GST ranged from 0,07 to 0,53, with an average of 0,25 reflecting a level of differentiation among the Passiflora cristalina populations, and the gene flow (Nm) reported an average of 1,16. The AMOVA revealed that, most of the variability is within the populations (65%) than among the populations (35%). The dendrogram generated by the UPGMA method allowed the formation of two distinct groups, as well as in the "Structure" grouping, showing that the individuals were allocated to their respective populations. Due to the high diversity levels found in this study regarding both populations confirmed by the genetic diversity, strategies need to be performed to aim the characterization, conservation and exploration of this material.

KEYWORDS: Passion fruit, Genetic variability, Molecular markers (SSR).

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é o mais importante da Família Passifloraceae, por possuir espécies que têm valor econômico e por conter maior número de espécies (Milward-de-Azevedo e Baumgratz, 2004). Cerca de 530 espécies pertencem a este gênero. Destas, aproximadamente 150 são originárias do Brasil, o que o torna um dos maiores centros de diversidade genética (Cervi, 2006) com uma ampla variabilidade intra e interespecífica (Manica, 1981).

Entretanto, as modificações causadas pela ação antrópica tem promovido a destruição do seu ambiente natural, tornando o processo de fragmentação de ecossistemas cada vez mais acentuada, afetando assim, de forma negativa a biodiversidade existente.

Ambientes fragmentados comportam um menor número de espécies, mantendo, por sua vez, menor diversidade genética (Zuidema et al., 1996), o que pode ocasionar o aumento dos níveis de endogamia nas populações e modificações nas interações bióticas como a polinização, dispersão de sementes, predação e na herbivoria (Castellen et al., 2005).

Bellon et al. (2007), relatam que espécies silvestres são alternativas para ampliação da base genética de resistência a diversas doenças que podem ser combinadas com características de produtividade e qualidade de frutos de espécies cultivadas.

P. cristalina é uma espécie nativa da Amazônia Meridional, recentemente descrita por Vanderplank e Zappi (2011). Esta espécie apresenta potencial ornamental devido à beleza de suas flores; os frutos são utilizados como fonte de alimento por muitas espécies de animais silvestres, tais como pássaros, macacos e alguns roedores. Podendo ainda, ser fontes de propriedades farmacológicas, fonte de genes de resistência para algumas espécies cultivadas, além de suas propriedades nutricionais para o consumo *in natura*. Sendo assim são de extrema importância que sejam realizados estudos em populações naturais de *P.cristalina*, visando sua caracterização, e consequentemente, sua utilização e inclusão em programas de melhoramento.

Os marcadores moleculares são ferramentas úteis para a caracterização das espécies, pois essa caracterização pode ser realizada em uma maior velocidade, qualidade e em larga escala (Varshneyet al., 2005). Além de permitir estimar a

alteração na frequência alélica, a perda ou fixação de alelos e a diversidade genética das populações.

Dentre os marcadores disponíveis, os microssatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) são amplamente utilizados em estudos genéticos e de conservação genética (Santos et al., 2010). Esta ampla aplicação deve-se ao fato de que os SSR são codominantes e multialélicos, altamente reprodutíveis, têm ampla resolução e são baseados na reação em cadeia da DNA *polimerase* (PCR) (Oliveira et al., 2006).

Neste contexto, considerando a escassez de estudos sobre a espécie, este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética de populações de *P. cristalina* que ocorrem naturalmente no Município de Alta Floresta MT, por meio de marcador molecular SSR.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O presente estudo foi realizado em duas áreas na Amazônia meridional, localizadas no Município de Alta Floresta, região norte do estado de Mato Grosso (Figura 1). As áreas foram selecionadas com base na ocorrência natural de populações de *P. cristalina*. Em cada população foram amostrados 25 indivíduos, os quais foram georreferenciados através das coordenadas UTM com GPS.

A primeira população está localizada na Estrada Porto de areia, na Zona Rural do Município de Alta Floresta, e foi denominada população (EPA). Os indivíduos desta população estão predominantemente localizados nas bordas dos fragmentos florestais, alguns genótipos encontram-se isolados em pequenos e esparsos fragmentos devido ao processo de antropização desta região, principalmente para a criação de pastagens.

A segunda população foi denominada Estrada Central (ECE). Também é uma área localizada na Zona rural de Alta Floresta, e apresenta uma maior quantidade de vegetação se comparada à população anterior. As amostras em sua grande maioria foram coletados indivíduos nas bordas dos fragmentos florestais.

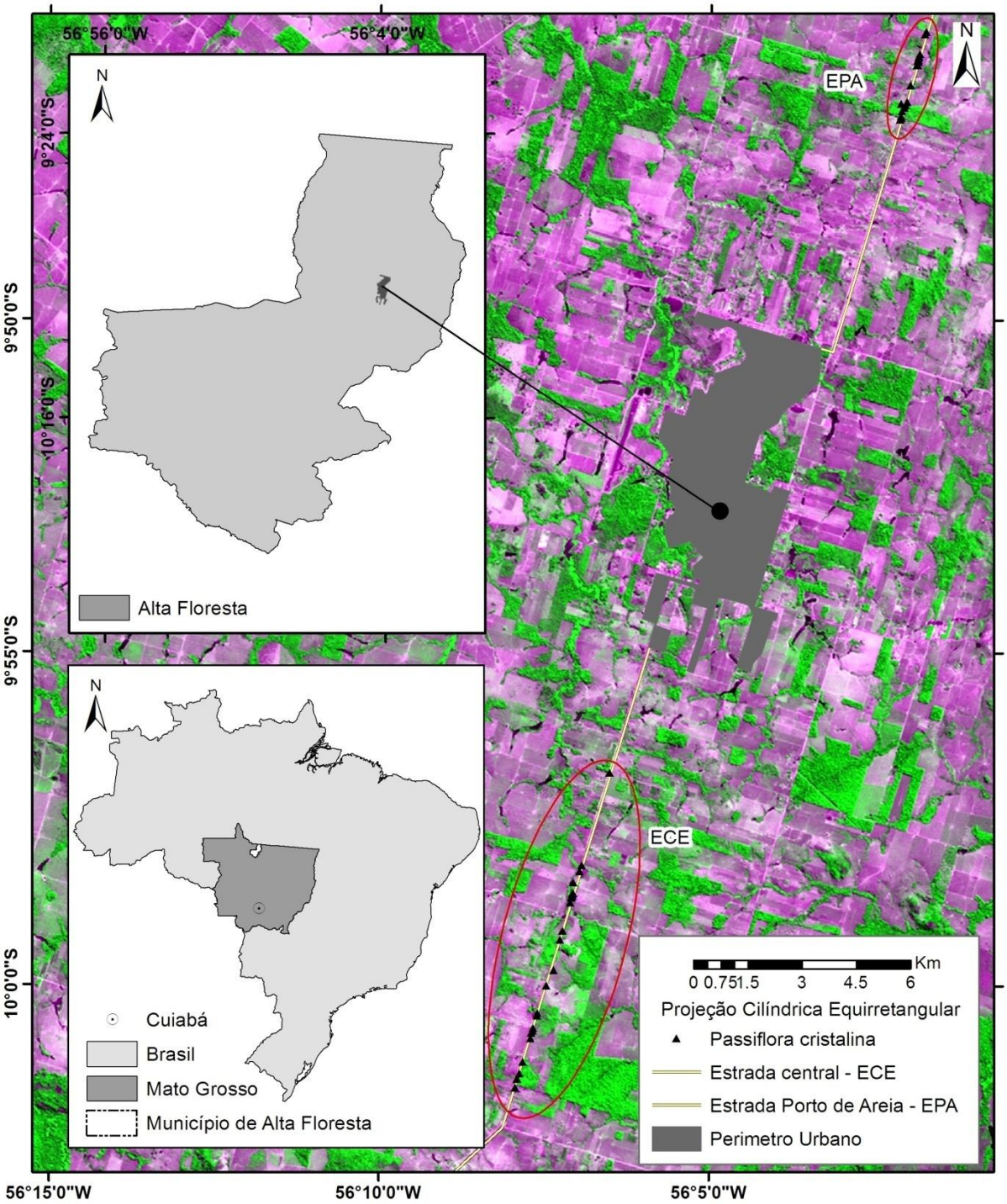

FIGURA 1: Mapa da área de estudo. Com destaque para o município de Alta Floresta, MT e a localização das duas áreas de estudo. Estrada Porto de areia (EPA) e Estrada central (ECE).

Material vegetal

Para a análise da diversidade genética foram coletados 50 genótipos, sendo 25 provenientes de cada uma das populações em estudo. A amostragem foi realizada de maneira aleatória, com o maior espaçamento possível entre indivíduos.

De cada genótipo foi coletado folhas jovens, expandidas e sadias, para extração de DNA. O material coletado foi devidamente identificado e acondicionado ainda em campo em recipientes contendo sílica gel. Posteriormente, as folhas foram armazenadas em freezer a -20ºC no Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular da Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), C*ampus* Universitário de Alta Floresta MT, para posterior extração de DNA.

Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico total foi extraído de aproximadamente 100 mg de folhas, usando o método de CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990), com modificações adequadas para a espécie em estudo, como o aumento da concentração de polivinilpirrolidona (PVP) de 1% para 2%, aumento do β-mercaptoetanol de 0,2% para 3% no tampão de extração, além da redução do tempo de incubação. A confirmação da qualidade e quantidade do DNA extraído foi realizada por meio da eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA extraído foi comparado com DNA padrão (*lambda* M M M M M M M M MM M M M nM M foi diluído para a obtenção das s M M MM M

Amplificação via de PCR

Foi testado a transferibilidadede vinte e um pares de *primers* microssatélites (SSR) desenvolvidos para *P. edulis* (Oliveira, 2006) e para *P. alata* (Pádua et al., 2005). A amplificação inicial foi realizada em 04 indivíduos de *P. cristalina* visando à seleção dos iniciadores. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador MJ 96 (Biocycler®) M M M M M M M M bM M M q n M bM M M M M p M M M e M RM M M e M M H_2 M bM M M Cl_2 M M M M M M M dNTP (0,1 mM M M MM M M M M

O programa de amplificação utilizado foi proposto por Oliveira (2006), com um ciclo inicial de desnaturação de 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 ºC por 40 segundos, 55 ºC por 40 segundos e 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72º C por 5 minutos. Entretanto para os iniciadores PE75 e PE41 foi utilizado o programa de amplificação estabelecido por Paiva (2013), uma vez que produziu melhores resultados, com um ciclo inicial de desnaturação de 94 °C por 4 minutos,

seguido por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 55ºC por 1 minuto e 72 ºC por 3 minutos e uma extensão final 72 ºC por 7 minutos. Foram realizados vários testes para adequar à temperatura de cada primer**,** entretanto, a temperatura que apresentou os melhores resultados para os primers foi à de 55°C, sendo padronizada para todas as reações.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 3% em tampão de corrida TBE 1X, em voltagem aproximada de 90V por cerca de quatro horas. A coloração do gel foi realizada com brometo de etídeo (0,6 ng/mL). Para comparação dos tamanhos dos fragmentos amplificados foi utilizado o DNA Ladder de 100 pb (Invitrogen™). Em seguida o gel foi fotografado com auxílio de uma câmera digital (Sony®) quando irradiado por luz ultravioleta pelo Transiluminador UVB LTB-21x26 (loccus biotecnologia®).

Análise dos dados

Os fragmentos de SSR obtidos dos produtos de amplificação foram analisados no programa GelQuantPro® (DNR, 2006) para a construção de uma matriz com base no tamanho das bandas (pb) encontradas nos géis. Os dados da matriz foram analisados pelo programa GenAlEx 6.5® (Peakall e Smouse 2006, 2012) para a obtenção da análise das coordenadas principais (PCoA) e da análise variância molecular (AMOVA), que foi utilizado para inferir sobre a estrutura genética das populações por meio da decomposição total nos componentes entre e dentro das populações. Através do programa GenAlEx foi realizada também a análise descritiva geral, onde foi inferido a diversidade genética, heterozigosidade esperada, múmero de alelos e número de alelos efetivos.

O programa Power Marker V.3.25 (Liu e Mouse, 2005), foi aplicado para a determinação da matriz dos valores de distância genética de Nei (1983) entre os indivíduos, foram geradas pelo programa Power Marker V.3.25 e posteriormente importada para o programa MEGA 6.5 (Kumar et al. 2004) para a construção do dendrograma através do método UPGMA.

M M MU M M M M M bayesiana foi utilizado para inferir o número de grupos (k). Foram realizadas 20 corridas M M M M M M - MM M ções de Monte Carlo de Cadeias de Markov (MCMC). Para definição do K mais provável em relação

aos propostos foram utilizados os critérios de Pritchard e Wen (2004) e também o critério de Evano et al. (2005), sendo os resultados enviados para o site Structure Harvester (Earl, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos vinte e um *primers* testados, oito mostraram-se efetivos na amplificação do genoma de *P. cristalina*, desta forma foram utilizados na análise da diversidade genética de *P.cristalina* (Tabela 1).

TABELA 1: *Primers* SSR utilizados para a amplificação dos indivíduos *P. cristalina* amostrados nas duas populações. TA: Temperatura de anelamento.

Loco	Motivo	TA (°C)	Tamanho esperado (pb)
AF08P1	$(TG)_9$	58	105
PE11	$(GT)_{11}$	58	178
PE37	$(TG)_8$	60	232
PE38	$(TG)_8$	58	215
PE41	$(TTAA)_5$	60	220
PE66	$(AC)_9$	60	165
PE74	$(ATCACA)_5$	58	215
PE75	$(TG)_{17}$	60	178

O número de alelos por loco variou de 3 (A08FP1) a 10 (PE75), com média de 5,62, obtendo-se um total de 45 alelos para os 8 locos avaliados (Tabela 2). Variação alélica semelhante foi encontrada por Cazé et al. (2012), ao caracterizarem locos de SSR desenvolvidos para *P. contracta* e por Cerqueira-Silva et al. (2012) ao trabalhar com *P. edulis*, onde foi observou-se que número de alelos por loco variou de 2 a 9, com média igual a 5, para as ambas as espécies. O número efetivo de alelos (Ne) variou de 2,14 (PE74) a 5,94 (PE66) apresentando uma média de 4,05. Castro (2008) ao trabalhar com acessos de *Passiflora* obteve valores relativamente superiores aos observados neste estudo, onde o número efetivo de alelos foi de 7,38 para *P. edulis*; 6,30 para *P. cincinnata*; 10,00 para *P. alata* e 6,92 na espécie *P. setacea*.

TABELA 2: *Locus*, número de alelos (Na), número de alelos efetivos por *locus* (Ne) e diversidade genética (He)

Locus	Na	Ne	He
AF08P1	3	2,790	0,642
11	3	2,989	0,665
37	8	3,969	0,748
38	4	3,179	0,685
41	5	4,392	0,772
66	9	5,944	0,832
74	3	2,148	0,534
75	10	7,003	0,857
Total	45	-	-
Média	5,62	4,05	0,71

A heterozigozidade esperada ou diversidade gênica apresentou uma média de 0,71, com um mínimo de 0,53 no loco PE74 e um índice máximo de 0,85 para o loco PE75. Na literatura, vários trabalhos de diversidade genética são descritos para espécies de *Passiflora* como os observados por Paiva (2013), ao trabalhar com 56 acessos de espécies do gênero *Passiflora*, onde obteve uma heterozigozidade esperada com uma média de 0,57, que variou de 0,33 (PE37) a 0,69 (PE08). Enquanto que Oliveira (2005) ao trabalhar com *P. Edulis* obteve He= 0,54 e Cerqueira- silva (2012) com *P. Cincinnata* He= 0,51, já Reis et al. (2011), ao estudar populações de dois ciclos de seleção recorrente de *P.edulis*, obteve He=0,20.

A diversidade genética variou de 0,57 na população EPA para 0,50 na população ECE com uma média de 0,54, indicando uma alta diversidade genética (Tabela 4).

TABELA 4: Estruturação genética (GST) e Fluxo Gênico (Nm) para os 8 *loci* de microssatélites.

Locus	Gst	Nm
MAF08PR1	1,78	0,21
M11	0,94	0,63
M37	0,44	1,63
M38	1,52	0,30
M41	0,55	1,25
M66	0,66	1,01
M74	0,26	2,96
M75	0,55	1,25
Média	0,83	1,16

A estruturação genética (GST) nas populações analisadas apresentou uma média de 0,83, enquanto que o fluxo gênico (Nm) apresentou uma média de 1,16. Nunes (2009), em trabalhos realizados com Passiflora silvestres obteve resultados diferentes ao encontrados neste estudo, onde a estruturação genética (GST) para *P. ovalis* foi de 0,41 e o fluxo gênico (Nm) de 0,69, enquanto que *P. contracta* o GST foi de 0,13 e o Nm de 3,32 .

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) revelou que a maior variabilidade genética encontra-se distribuída dentro (65%) do que entre as populações com (35%). Loss (2006), ao estudar *Passiflora alata* Curtis observou que a maior parte do total de variação genética foi expressa entre os indivíduos dentro das populações (57,44%), enquanto que o restante (42,56%) foi entre as populações. A alta variabilidade dentro da população pode ser influenciada pelo modo de reprodução, sistema de cruzamento, tamanho da população, distribuição geográfica e fluxo gênico (Hamrick, 1982).

O Dendrograma gerado com todos os indivíduos analisados a partir da distância de NEI pelo método UPGMA (Figura 2), possibilitou a formação de dois grupos, sendo os individuos alocados em suas respectivas populações. Revelando que existe uma maior similaridade genética entre os genótipos de cada população.

O grupo I foi formado pelos individuos da população EPA (genótipos de 1-25). Neste agrupamento pode ser detectado a formação de três subgrupos, sendo o subgrupo IA constituído pelos individuos 1,2,3,4,5; o subgrupo IIA pelos individuos 6,7 e o subgrupo IIIA 8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19 e 20. Os individuos mais similares geneticamente na população EPA são os 17 e 18 e os dissmilares 12,16 e o 10.

O grupo II foi formado pelos indivíduos da população da ECE (genótipos do 26-50). Neste agrupamento pode ser detectado a formação de quatro subgrupos, sendo o subgrupo IB 26,27, 28, 29 e 48; o subrgrupo IIB 39, 40; IIIB 31,32,33,34,35 e o IVB 30, 36,37, 38,42,43,44,45,46, 47, 49 e 50. Nesta população, os resultados revelaram quatro pares de indivíduos similares geneticamente (32-31; 33-35; 41-37 e o 44-45) e mais dissimilar, indivíduo 47.

De acordo com o agrupamento apresentado na Figura 2, a maioria dos genótipos apresentam dissimilaridade genética, sendo recomendados para futuros programas de melhoramento e de conservação genética da espécie. Pois segundo

Wagner Júnior (2011), o uso de medidas da divergência genética obtidas antes que qualquer cruzamento seja realizado, poderá auxiliar o melhorista a concentrar seus esforços nas combinações mais promissoras, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento.

Figura 2: Dendrograma gerado a partir da distancia de NEI pelo método UPGMA dos indivíduos de *P. cristalina* das duas populações amostradas.

De acordo com o agrupamento apresentado na Figura 2, a maioria dos genótipos apresentam dissimilaridade genética, sendo recomendados para futuros programas de melhoramento e de conservação genética da espécie. Pois segundo Wagner Júnior (2011), o uso de medidas da divergência genética obtidas antes que qualquer cruzamento seja realizado, poderá auxiliar o melhorista a concentrar seus

esforços nas combinações mais promissoras, aumentando a eficiência dos programas de melhoramento.

A diversidade genética de *P. cristalina* também foi avaliada por meio da análise de coordenadas principais (PCoA). As coordenadas principais explicaram 69,41% da variação total entre as amostras, sendo que o primeiro componente revelou cerca de 37,59 da variação entre as amostras, o segundo componente explicou 18,83% e o terceiro 12,99 % (Figura 3).

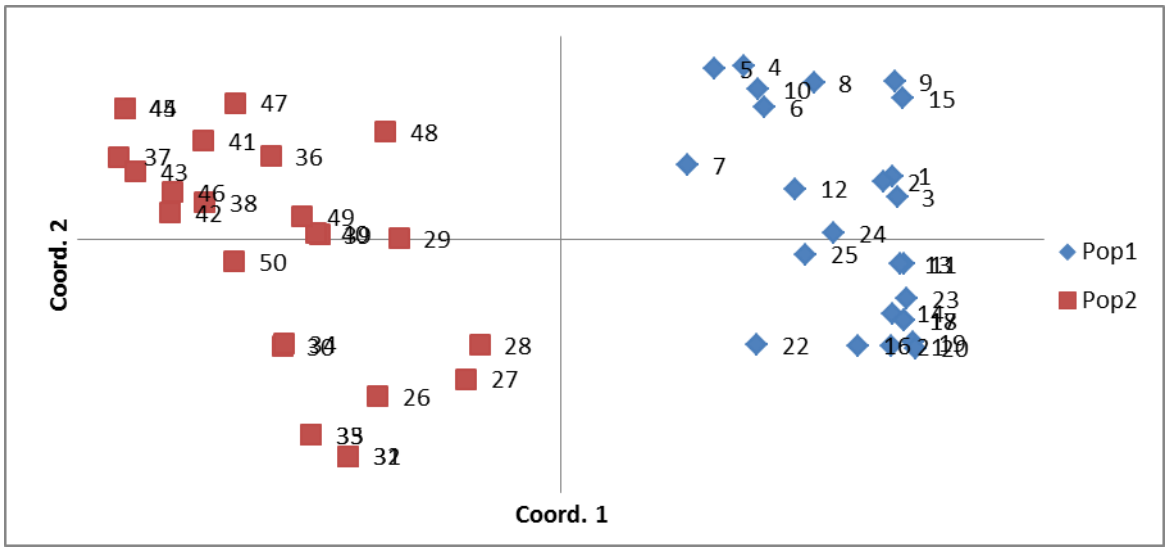

Figura 3: Dispersão gráfica a partir da análise das coordenadas principais (PCoA) dos 50 indivíduos de *Passiflora cristalina* provenientes das duas populações amostradas em Alta Floresta, MT.

Neste estudo, como as populações encontram-se na Zona rural do Municipio de Alta Floresta, a cidade pode estar atuando como uma barreira geográfica, fator que pode interromper o fluxo gênico, pois as chances das sementes e polens serem dispersos e alcançar outras populações são menores. Segundo Lutz et al. (2000) as populações podem ser separadas por alguma barreira ou mesmo isoladas pela distância entre elas, favorecendo assim o nível de endocruzamentos e a fixação de alelos deletérios nestas populações.

M M M M M M M M M M

Pritchard & Wen (2004), o número de grupos formados pode ser pré-determinado, mas são os dados que definem o K (número de grupos), cujo valor mais confiável é estimado pelo menor número com valor negativo de Ln e pelo menor desvio padrão encontrado durante a análise estatística.

Através do Structure constatou que o melhor k encontrado foi para a

representação de dois grupos (k=2), (Figura 4). Sendo o grupo I formado pelos genótipos do 1 ao 25 e o grupo II pelos genótipos do 26 ao 50.

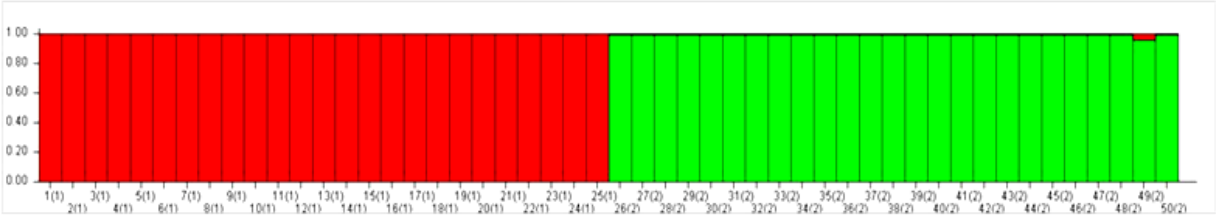

Figura 4: Representação da distribuição dos 50 indivíduos de *Passiflora cristalina* em grupos segundo dados moleculares de 8*primers* M MM M M M indivíduos estão representados por barras verticais com colorações de acordo com o grupo ao qual pertencem (dois grupos, K=2).

Os dados obtidos através da análise de Coordenadas principais, dendogram, corroboram com os dados apresentados no Structure, demostrando que os indivíduos ficaram alocados em suas populações de acordo com o relacionamento genético e a proximidade geográfica.

CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites utilizados neste estudo revelaram uma alta diversidade gênica nos indivíduos das populações de *P. cristalina*, porém uma baixa heterozigosidade foi observada, ou seja, há um grande número de alelos diferentes na população, porém os indivíduos apresentam-se em homozigose para os locos estudados.

P. cristalina apresentou uma maior variabilidade genética a nível intrapopulacional do que interpopulacional, o que pode estar correlacionado com o sistema de reprodução da população ou com a distribuição geográfica dessas populações.

A conservação de populações naturais de *P. cristalina* são importantes para subsidiar futuros programas de melhoramento genético e conservação dos recursos genéticos por possuirem uma grande variação de alelos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLON, G., FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, K.P., JUNQUEIRA, N.T.V..Variabilidade genética de acessos silvestres e comerciais de Passiflora edulis Sims. com base em marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 29:124-127.2007.

CASTELLEN, M. S.; CERVI, A. C.; AMARAL, W. A. N. **O gênero *Passiflora* L. nosTabuleiros Costeiros**. Recursos genéticos dos tabuleiros e seus ecossistemas associados- fruteiras. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros. 2005.32p.

Castro. J. A. **Conservação dos recursos genéticos de *passiflora* e seleção de descritores mínimos para caracterização de maracujazeiro.** Cruz das Almas, Bahia. da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura 2012.84p.(Dissertação Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais).

CAZÉ A.L.R.; KRIEDT, R.A.; Beheregaray, L.B.; Bonatto S.L.; Freitas, L.B. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Passiflora contracta*. **International Journal of Molecular Sciences**.13:11343-11348.2012.

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

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A.M., MORI, G.M.; OLIVEIRA, E.J.; Corrêa, R.X.; SOUZA, A.P. Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). **American journal of botany**.99:170-172.2012.

DOYLE, J.J; DOYLE, J. L.A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**.19:11 15.1987

EARL, D. A.; VON H.; BRIDGETT M. **STRUCTURE HARVESTER**: A WEBSITE AND PROGRAM FOR VISUALIZING STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources.4: 359-361 2012.

EVANO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**.14: 2611 2620. 2005.

GELQUANT PRO. **DNR Bio-Imaging Systems**.2006. Disponível em: http://www.dnr-is.com/Product.asp?Par=3.19&id=81. Acesso em 14 de dezembro de 2013.

HAMRICK, J.L. **Distribuition of genetic whitin and among natural forest population**. In: CHAMBERS, S.M.; MACBIDE, B. & THOMAS, W.L. (Eds.) Shonewald-cox. 1982.

HERNAN, L.Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. **Genetic Resources and Crop Evolution.** 56: 277-292.2009.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**. 5: 150-163. 2004.

LOSS, A.C.C.; LEITE, YLR.; LOURO ID.; BATITUCCI MCP. Diversidade genética de populações de maracujá-doce (Passiflora alata Curtis) no estado do Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line** 4:55-61.2006.

LIU K.,MUSE S. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. **Bioinformatics** 21: 2128 2129.2005.

Lutz E, Schneller J & Holderegger R. Understanding population history for conservation purposes; population genetics of Saxifraga aizoides (Saxifragaceae) in the lowlands and lower mountains north of the Alps. **American Journal of Botany**. 87: 583-590.2000.

MANICA, I. Fruticultura tropical: maracujá. São Paulo: **Agronômica Ceres.**1981. 160p.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; BAUMGRATZ, J.F.A. *Passiflora* L. subgênero Decaloba (DC.) Rchb.(Passifloraceae) na Região Sudeste do Brasil. **Rodriguésia**, 55:17-54. 2004.

NUNES, T. S. **Estudos sistemáticos em *Passiflora* L. subgênero *Deidamioides* (Harms) Killip (Passifloraceae).** Feira de Santana, Bahia.Universidade Estadual de Feira de Santana.2009.214p. (Tese-Doutorado em Botânica).

OLIVEIRA, E. J. **Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.)**.Piracicaba.Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2006.152p.(Tese- Doutorado em Agronomia).

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**.29: 294-307, 2006.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; CAMARGO, L.E.A.; FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (Passiflora edulis f. flavicarpa). **Molecular Ecology Notes**. *5*: 331 333.2005.

PÁDUA, J.G.; OLIVEIRA, E.J.; ZUCCHi, M.I.; OLIVEIRA, G.C.X.; CAMARGO, L.E.A.; VIEIRA, M.L.C. Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). **Molecular Ecology Notes***.* 5: 863-865.2005.

PAIVA, C.L.; **Descritores morfológicos e marcadores microssatélites na caracterização de germoplasma de Passiflora spp**. Campos Goytacazes, Universidade estadual do norte Fluminense Darcy Ribeiro.2013.73p. (Dissertação

Mestrado em Genética e melhoramento de plantas).

PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**.28: 2537-2539, 2012.

PRITCHARD, J; STEPHENS, M; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics.** 155: 945 959, 2000.

PRITCHARD, J.K. & WEN W. **Documentation for structure software: Version 2.1**. 2004.

REIS, R.V.; OLIVEIRA, E.J.; VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.S. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites, **Revista Brasileira de Fruticultura**.46: 51 57.2011.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; RODRIGUES, M. A.; RIBEIRO, H. L. C. Caracterização molecular de cultivares de cebola com marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**.45:49-55.2010.

VANDERPLANK. J.; ZAPPI, D. *Passiflora cristalina*, a striking new species of Passiflora (Passifloraceae) from Mato Grosso, Brazil. **Kew Bulletin**. 66: 149-153. 2011.

VARSHNEY, R.K., GRANER, A., SORRELLS, M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. **Trends Biotechnology**. 23: 48-55.2005.

WAGNER JÚNIOR, A. et al. Avaliação da necessidade de frio de pessegueiro por meio de ramos enxertados. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 31: 1054-1059. 2009.

ZUIDEMA, P. A., SAYER, J. A. & DIJKMAN, W. Forest fragmentation and biodiversity: the case for intermediate-sized conservation areas. **Environmental Conservation**. 23: 290-297.1996.

4.2 CAPÍTULO 2

Divergência genética entre genótipos de *Passiflora cristalina* Vanderpl & Zappi. baseada em caracteres de flores e frutos

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a divergência genética entre genótipos de *Passiflora cristalina* e quantificar a contribuição relativa de 30 caracteres de flores e frutos, auxiliando o resgate e a caracterização visando a preservação e o uso em futuros programas de melhoramento. Foram avaliados 150 frutos e 150 flores coletados em 15 genótipos com ocorrência natural no município de Alta Floresta, MT. A caracterização dos genótipos foi realizada mediante 30 caracteres morfológicas de flores e frutos, sendo 21 caracteres para flor e 9 para fruto. Os dados foram avaliados através dos Componentes principais e do Agrupamento obtido pelo método UPGMA, a partir da matriz de dissimilaridade (distância euclidiana média) com auxílio do programa Genes. Pela análise dos componentes principais verificou-se que os três primeiros componentes explicam 52,11% da variação acumulada. As características que mais contribuíram para a discriminação dos genótipos foram: peso fresco do fruto, comprimento do estigma, comprimento dos filamentos da corona, largura do fruto, largura da pétala e peso da polpa, sendo estes considerados os caracteres mais responsivos para a seleção de genótipos de *P. cristalina* em estudo. As menores contribuições para a diversidade foram obtidas dos caracteres: largura da antera, largura da bráctea e comprimento do fruto. O método de agrupamento UPGMA revelou que há uma grande divergência genética entre os genótipos analisados, uma vez que todos os genótipos se agruparam acima de 50% de dissimilaridade. Através desse estudo foi possível identificar que os genótipos 4, 9 e 11 são os mais divergentes, sendo os mais indicados para cruzamentos em futuros programas de melhoramento e de conservação genética da espécie.

Palavras-chave: Maracujá Silvestre, Descritores morfológicos, Recurso genético.

Genetic divergence among *Passiflora cristalina* Vanderpl & Zappi. genotypes based on flowers and fruits characteristics

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the genetic divergence among the *Passiflora cristalina* genotypes and quantify the relative contribution of the 30 flowers and fruits characteristics, supporting the rescue and the species characterization for the preservation and use in future breeding programs. We evaluated 150 fruits and 150 flowers collected in 15 genotypes with a natural occurrence in Alta Floresta municipal district - MT. The genotypes characterization was performed through 30 morpholgical flower and fruit characters, being 21 for the flower and 9 the for fruit. Data were evaluated through the principal components and the cluster obtained by the UPGMA method, from the similarity matrix (Euclidian average distance), using the Genes program. It has been found by the principal components analysis that the first three components have absorbed 52.11% of the accumulated variation. The characteristics that most contributed to the genotypes discrimination were the fresh fruit weight, the stigma length, the corona filaments length, the fruit width, the petal width and the pulp weight. Therefore, these meant to be the most responsive characters to the Passiflora cristalina genotypes selection under this study. Smaller contributions to the diversity were obtained from these characters: the anther width, the bract width and the fruit length. The UPGMA clustering method revealed that there is a large genetic divergence among the analyzed genotypes because all genotypes were grouped with dissimilarity of over 50%. Through this study, we observed that the genotypes 4, 9 and 11 are the most divergent, being the most suitable species for crossings in future breeding programs and genetic conservation.

Keywords: Wild Passion fruit, Genetic Resource.

INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado centro de diversidade do gênero *Passiflora* (Manica,1981) devido a sua ampla variabilidade genética intra e interespecífica (Bellon et al., 2009).

Algumas espécies silvestres de maracujazeiros apresentam características de interesse para a cultura do maracujá, como: longevidade, adaptação às condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos de interesse para indústria farmacêutica e cosmética, além de fornecer possíveis genes para resistência a doenças (Junqueira et al., 2006).

O gênero *Passiflora* apresenta ainda grande importância no setor agrícola, devido à alta produtividade, aceitação no mercado mundial e à sua diversificada utilização na indústria de cosméticos, para fins medicinais, ornamentais e alimentares, além de ser consumida como fruta fresca ou industrializada, como sucos, sorvetes, doces, licores e geléias (Meletti, 2011).

As modificações causadas pela ação antrópica têm promovido a erosão genética do gênero *Passiflora* em consequência da expansão da fronteira agrícola, principalmente no Centro-Norte do Brasil (Ferreira, 2005). A erosão genética pode resultar em estreitamento da base genética populacional e na perda de genes de importância, que podem levar a redução da capacidade das espécies de responderem as adversidades ambientais (Raposo et al., 2007). Assim, o resgate, a descrição e a avaliação destas espécies são necessários.

Neste contexto, o estudo da diversidade genética entre um grupo de genótipos tem grande importância, pois fornecem informações sobre os recursos genéticos disponíveis, o que propicia subsídios para a sua caracterização. Nos estudos de divergência genética podem ser utilizadas técnicas multivariadas, dentre as quais se destacam a análise por agrupamento e componentes principais. As análises multivariadas permitem combinar as múltiplas informações de cada genótipo, de modo a facilitar a execução da seleção com base na combinação de variáveis, o que possibilita a discriminação dos genótipos mais promissores (Cruz e Regazzi, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a divergência genética entre genótipos de *Passiflora cristalina* e quantificar a contribuição relativa de 30

características de flores e frutos, visando auxiliar o resgate e a caracterização de recursos genéticos da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

Frutos e flores de *P. cristalina* foram coletados em fragmentos florestais no município de Alta Floresta (Figura 01).

A cidade de Alta Floresta localiza-se a 283 m de altitude, o clima é equatorial quente e úmido e a temperatura média anual é de 24ºC, com máxima de 40ºC (Bleich e Silva, 2013). Na região predomina a vegetação do tipo Floresta Ombrófila Aberta (IBGE, 2012), latossolos, solos podzólicos, solos litólicos distróficos, solos indiscriminados concrecionários, e ao longo dos rios ocorrem solos do tipo gley pouco húmico, e areias quartzosas (Seplan, 2000).

Os materiais coletados foram devidamente identificados e transportados ao Laboratório de Genética Vegetal e Biologia Molecular, Campus de Alta Floresta, Universidade do Estado de Mato Grosso, onde foram realizadas as avaliações.

Material vegetal

Para estimar a divergência genética foram amostrados 15 genótipos em diferentes fragmentos florestais no Município de Alta floresta (Figura 1). De cada genótipo amostrado, foram coletados, 10 flores totalmente expandidas (Figura 2A) e 10 frutos maduros (Figura 2B e 2C), totalizando 150 frutos e 150 flores.

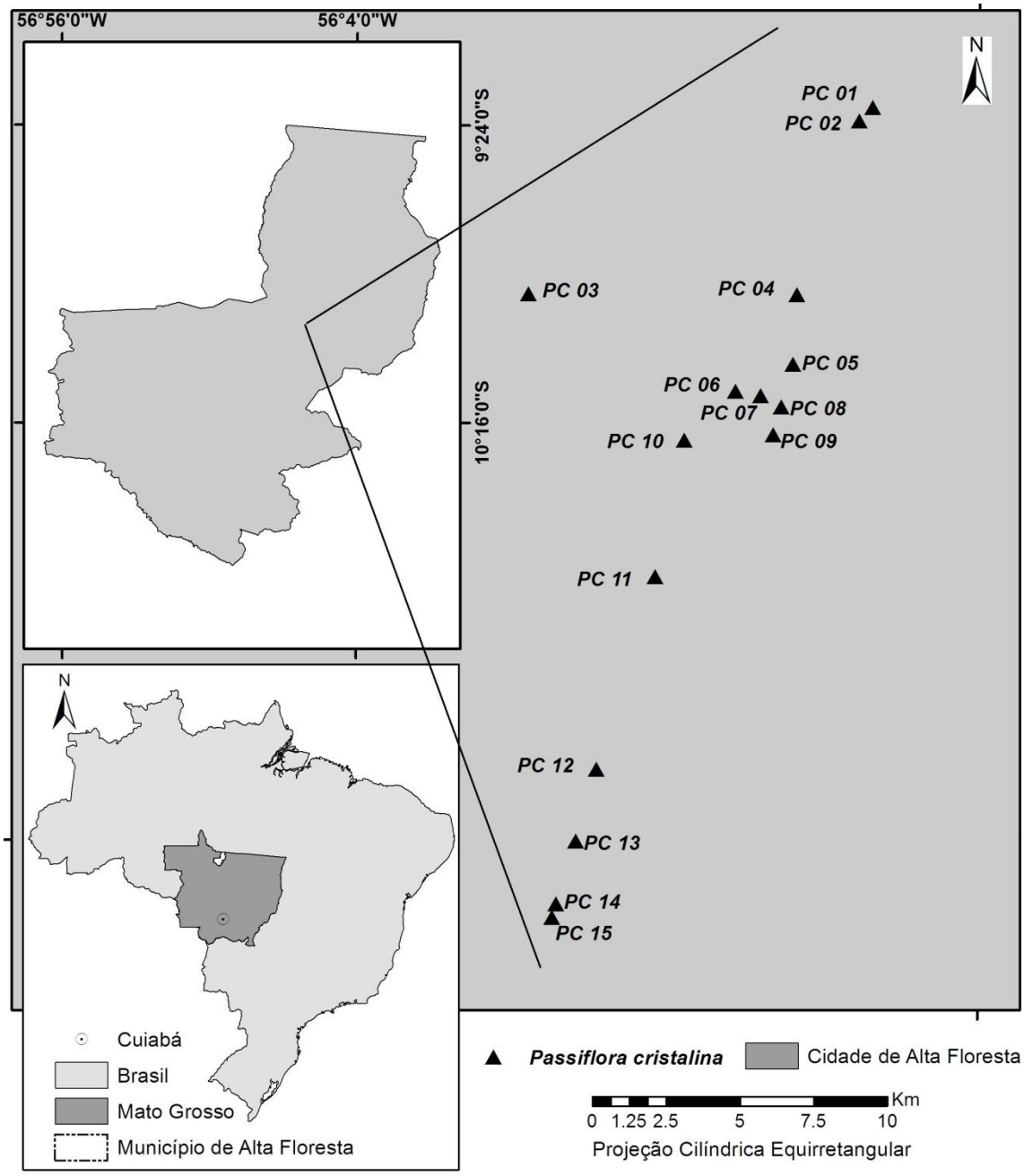

FIGURA 1: Mapa com a localização e distribuição dos indivíduos de *P. cristalina* no Município de Alta Floresta, Mato Grosso.

A caracterização dos genótipos foi realizada mediante trinta (30) características morfológicas de flores e frutos, sendo algumas relacionadas pelo Serviço Nacional de Proteção de Cultivares (SNPC), vinculado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2008) e outras propostas neste estudo.

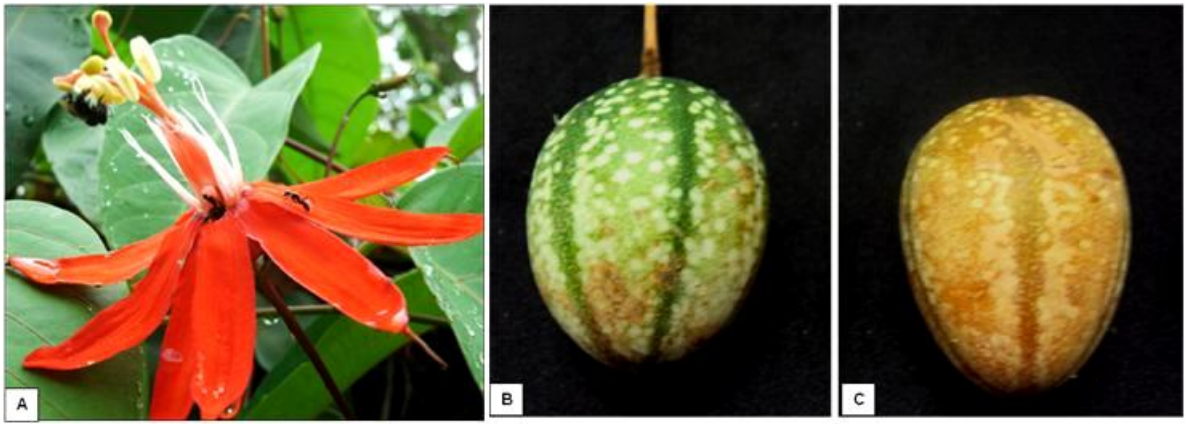

FIGURA 2: A) Flor de *Passiflora cristalina*; Frutos de Passiflora cristalina: B) Fruto verde; C) Fruto maduro.

Características morfológicas da Flor

Foram utilizados vinte e um (21) descritores na avaliação das flores, sendo: comprimento da flor (CFF) a partir do androginóforo até o fim do pedúnculo floral; diâmetro da flor (DFF) a partir dos pontos extremos das pétalas; comprimento do androginóforo (CAF), toda a extensão que sustenta os órgãos sexuais; comprimento da pétala (CPF) (Figura3A), desde a inserção na flor até o ápice; largura da pétala (LPF) (Figura 3B), na maior dimensão; comprimento da sépala (CSF) (Figura 3C), desde a inserção na flor até o ápice; largura da sépala (LSF) na maior dimensão (Figura 3D); comprimento da antera (CAF) (Figura 3E); largura da antera (LAF); comprimento do filete (CFI); comprimento do estigma (CEF) (Figura 3F); largura do estigma (LEF); comprimento de estilete (CSF); comprimento do ovário (COF) (Figura 3G) e largura do ovário (LOF); comprimento da bráctea (CBF) (Figura 3H); largura da bráctea (LBF); diâmetro da corona (DCF) a partir dos pontos extremos dos filamentos da corona (Figura 3I); tamanho dos filamentos externos da corona (FCO) (Figura 3J); tamanho do tubo floral (TFF) (Figura 3K), a partir da inserção no receptáculo da flor; tamanho do pedúnculo floral (TPF) a partir do receptáculo da flor até a sua inserção no caule. Todas as características quantitativas foram mensuradas em milímetros com paquímetro digital com precisão de 0,01mm.

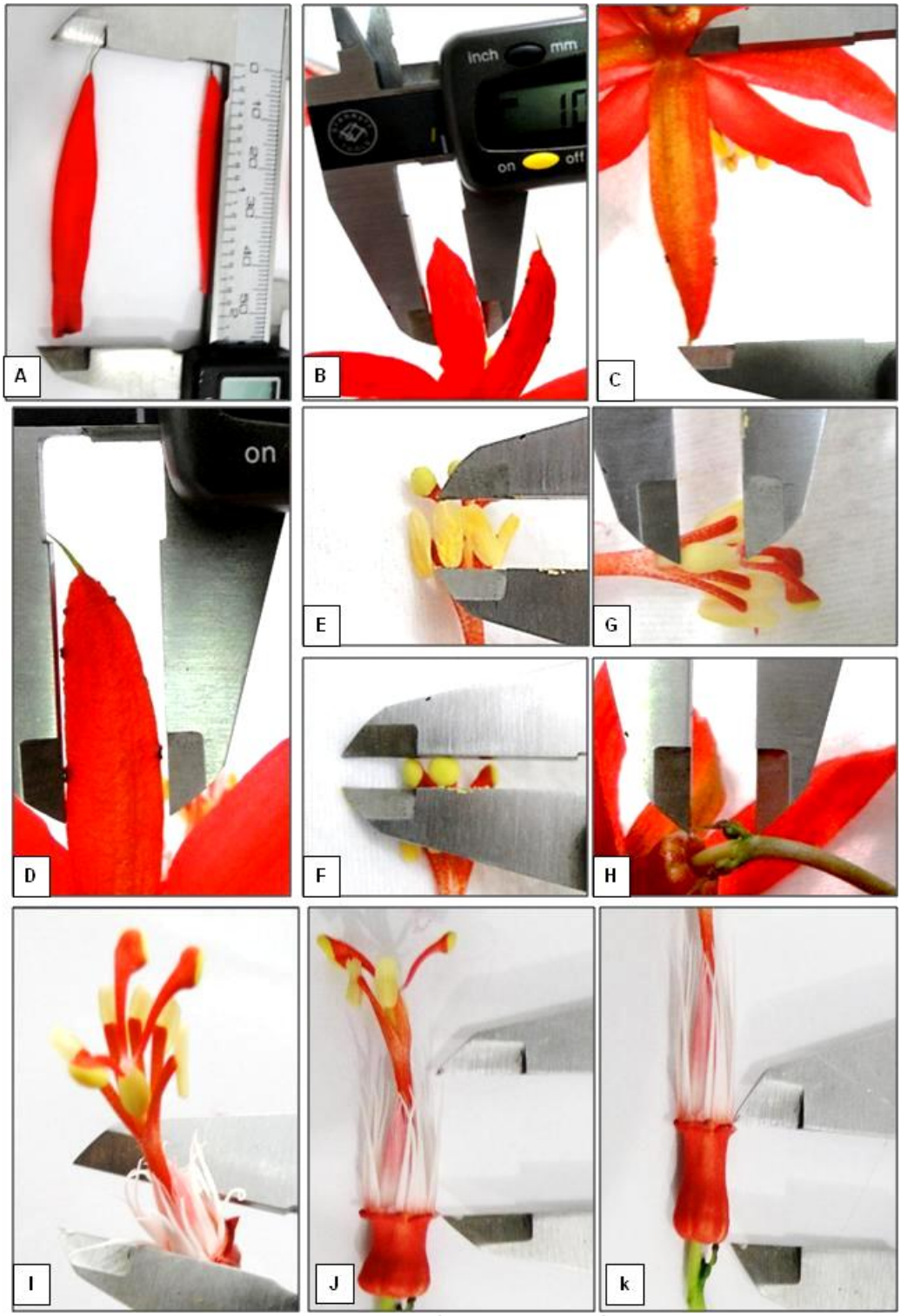

FIGURA 3: Detalhe de algumas características morfológicas avaliadas nas flores de *Passiflora cristalina*. A) Comprimento da pétala; B) Largura da pétala; C) Comprimento da sépala; D) Largura da sépala; E) Comprimento da antera; F) Comprimento do estigma; G) Comprimento do ovário; H) Comprimento da bráctea; I) Diâmetro da corona; J) Comprimento dos filamentos externos da corona; k) Comprimento do tubo floral.

Características morfológicas do fruto

Os frutos foram avaliados através de nove características, sendo: o comprimento do fruto (CFU) (Figura 4A), largura do fruto (LFU) (Figura 4B), espessura do fruto (EFF) e espessura da casca (ECF), ambas realizadas com o auxilio de um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm. Com auxílio de uma balança de precisão de 0,00001g, foi obtido o peso do fruto (PFF) (Figura 4C).

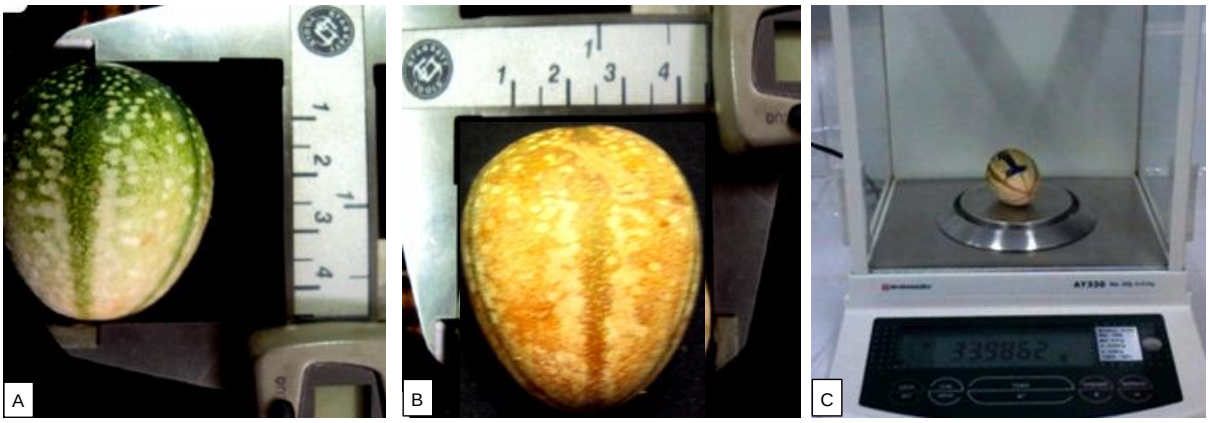

FIGURA 4: Caracteres morfológicos dos frutos de *Passiflora cristalina*: A) Comprimento do fruto; B) Largura do Fruto; C) Peso fresco do fruto.

Para obtenção do peso da polpa (PPF), os frutos foram seccionados, a polpa com as sementes colocadas em uma placa Petri e pesadas em conjunto. Logo em seguida, as sementes foram isoladas da polpa com auxílio de uma peneira por meio da fricção manual, e em seguida pesadas. O peso das sementes foi subtraído do peso da polpa+sementes e assim obtido o peso da polpa (Figura 05). Posteriormente, foi avaliado o número de sementes por fruto.

O teor de sólidos solúveis (BRIX) foi avaliado através da leitura direta em refratômetro manual com os dados corrigidos pela temperatura.

Análise estatística

Foram realizadas análises multivariadas para a obtenção das estimativas de divergência genética dos genótipos por meio do método da distância Euclidiana Média Padronizada. Com base na matriz de distância gerada foi realizado o agrupamento dos indivíduos pelo Método UPGMA (Unweighted Pair Grouped Method Average) e a análise por componentes principais. Nas análises dos componentes principais foi transformado o p das variáveis originais X_1, X_2,... ,X_p, sendo o n: número de indivíduos ou populações, em um novo conjunto de variáveis,

Y_1, Y_2, ..., Y_p de dimensão equivalentes. Cada componente principal foi considerado uma combinação linear das variáveis originais, construídos para explicar o máximo da variabilidade total dessas variáveis originais e não a sua correlação.

De acordo com o método de Morrison (1981) define o primeiro componente principal (Y_1) de um conjunto de p variáveis, X_1, X_2, ..., X_p, contidas no vetor X' = (X_1, X_2, ..., Xp) como a combinação linear: $Y_1 = b_{11}X1 + b_{21}X_2 + ... + bp_1Xp$ = **b'1X** cujos coeficientes bi1 são elementos do vetor característico b1, associado à maior raiz característica da matriz de covariância amostral, **S**, das variáveis Xi's. O segundo componente principal (Y_2) estará associado à segunda maior raiz característica e, assim sucessivamente, até que toda a variância tenha sido explicada**.**

Os autovalores (ou raízes características) ordenados são as variâncias amostrais dos componentes principais. O primeiro componente também é definido como o de maior importância, uma vez que retém a maior parte da variação total encontrada nos dados originais. A técnica envolve a matriz de covariância amostral **S** ou a matriz de correlação **R**, sendo que a maioria das aplicações tem envolvido esta última. Tendo em vista o grande número de variáveis medidas em unidades diferentes, foi necessária a padronização destas variáveis X_j (j = 1, 2,..., p). Assim, a estrutura de dependência de X_j foi determinada pela matriz de correlação **R**.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do Programa GENES (Cruz, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise de componentes principais, verificou-se que os três primeiros componentes absorveram 52,11% do total da variação, sendo que o primeiro componente explicou 22,45% e o segundo componente 39,27% da variação total, conforme descrito na Tabela 01.

A variação acumulada distribuiu-se entre vários componentes, não retendo o máximo de variação nos componentes iniciais, como indicado por Cruz et al., (2004) e por Cruz e Carneiro (2003), mas, semelhante ao que vem sendo observado em trabalhos realizados por Godoy et al., (2007) estudando a diversidade genética existente entre genótipos de maracujá encontrou 69,07% da variação total nos três primeiros componentes principais. Em progênies híbridas obtidas do cruzamento de

Passiflora gardneri x *Passiflora gibertii*, Belo (2010), encontrou 72,20% da variação nos três primeiros componentes, sendo que o primeiro componente principal explica 47,70% da variância total. Crochemore et al., (2003) ao estudar a diversidade genética em espécies de maracujazeiro, observou que o primeiro e o segundo componentes representaram 29,60% e 19,40% do total da variação, respectivamente, enquanto que o terceiro representou apenas 12,20 %.

TABELA 1: Estimativas dos autovalores associados aos componentes principais, juntamente com sua importância relativa (Raiz %) e acumulada (%), referentes a 30 descritores morfológicos (21 flores e 9 frutos) de *Passiflora cristalina*.

CP	AUTOVALOR	IMPORTÂNCIA RELATIVA (%)	(%) ACUMULADA
1	6,73	22,45	22,45
2	5,04	16,81	39,27
3	3,85	12,84	52,11
4	2,91	9,71	61,83
5	2,57	8,58	70,41
6	2,15	7,19	77,60
7	1,76	5,87	83,48
8	1,33	4,45	87,94
9	1,27	4,24	92,19
10	0,81	2,72	94,92
11	0,66	2,22	97,14
12	0,39	1,32	98,46
13	0,32	1,09	99,56
14	0,12	0,43	99,99
15	0,00	0,00	99,99
16	0,00	0,00	99,99
17	0,00	0,00	99,99
18	0,00	0,00	99,99
19	0,00	0,00	99,99
20	0,00	0,00	99,99
21	0,00	0,00	99,99
22	0,00	0,00	99,99
23	0,00	0,00	99,99
24	0,00	0,00	99,99
25	0,00	0,00	99,99
26	0,00	0,00	99,99
27	0,00	0,00	99,99
28	0,00	0,00	99,99
29	0,00	0,00	99,99
30	0,00	0,00	100

Para o primeiro componente, a variável de maior contribuição para a discriminação dos genótipos foi o peso do fruto (0,32) e o comprimento do estigma (0,29). No segundo componente, destacam-se o comprimento dos filamentos da corona (0,32) e a largura do fruto (0,16). E para o terceiro componente, as características que apresentaram um maior valor foram a largura da pétala (0,36) e o peso da polpa do fruto (0,18) (Tabela 2). Estas variáveis são as que mais contribuíram para estimar a variabilidade genética da espécie e, portanto, mais responsivas à seleção de genótipos de *Passiflora cristalina* em futuros programas de melhoramento.

Os descritores de menor contribuição para avaliar a divergência genética de genótipos de *P. cristalina* neste estudo foi a largura da antera (LAF), largura da bráctea da flor (LBF) e comprimento do fruto (CFU), posteriormente descartados pelo critério sugerido por Cruz e Regazzi (1997), quando avaliados os últimos componentes principais, os caracteres que menos contribuírem para a variação total serão os mais passivos de descartes.

Cruz et al. (2004) enfatizam que caracteres dispensáveis são aqueles invariantes ou redundantes por serem correlacionados a outros. A redução do número de caracteres por eliminação daqueles que pouco contribuem para a descrição de acessos no melhoramento genético torna o processo de avaliação menos oneroso (Arriel et al., 2004), propiciando economia de tempo e recursos materiais, ao mesmo passo que disponibiliza informações para a conservação da espécie em estudo (Alves et al., 2003).

Com o emprego do método de agrupamento UPGMA com linha de corte em 90% de dissimilaridade, foi possível observar a formação de quatro grupos distintos, devido à divergência genética existente em relação às características avaliadas (Figura 5). Os genótipos 3; 10; 14 ficaram no grupo I, o genótipo 5 ficou alocado no grupo II, os genótipos 6; 7; 8; 11; 12; 14 e 15 no grupo III e os genótipos 1; 2; 3; 9, ficaram no grupo IV. Sugerindo que os genótipos que ficaram alocados no mesmo grupo possuem um maior grau de similaridade genética e os que ficaram isolados, ou seja, não se agruparam com outros genótipos, como o individuo 5 que apresentou uma maior divergência genética.

TABELA 2: Conjunto dos autovetores (coeficiente de ponderação) das 30 variáveis analisadas (21flores e 9 frutos) em *P. cristalina*.

CP	CFF	DFF	TFF	DCF	CAF	TPF	FCO	COF	LOF	CPF	LPF	CSF	LSF	CBF	LBF
1	0,17	-0,06	-0,09	-0,03	-0,01	-0,00	0,14	-0,07	-0,03	-0,23	-0,13	-0,13	-0,01	0,01	0,11
2	-0,27	-0,32	0,04	-0,21	-0,14	-0,24	-0,32	0,08	0,01	-0,22	-0,13	-0,22	-0,13	-0,20	0,26
3	0,043	0,21	-0,35	0,23	0,02	0,05	-0,04	0,10	0,13	-0,00	0,36	-0,18	0,27	-0,31	0,30
4	-0,16	-0,10	0,05	-0,17	0,32	-0,32	-0,01	0,45	0,26	-0,06	-0,12	-0,22	0,10	0,20	0,09
5	0,05	-0,04	-0,11	0,28	0,17	-0,03	-0,11	-0,02	0,37	0,20	-0,08	0,02	-0,32	-0,24	-0,09
6	0,14	-0,17	0,07	0,01	0,13	0,12	0,05	-0,22	-0,31	-0,12	0,10	-0,32	-0,20	0,13	-0,01
7	0,09	0,07	0,02	0,08	-0,28	-0,29	-0,27	-0,05	-0,10	0,26	0,17	0,05	-0,27	-0,02	-0,12
8	0,18	0,19	0,47	-0,22	0,25	0,07	-0,00	0,17	0,09	0,10	0,09	0,22	0,18	-0,02	0,04
9	0,02	-0,23	-0,10	-0,09	-0,03	0,25	-0,15	0,07	0,06	-0,20	0,16	0,05	0,11	0,20	-0,10
10	-0,34	0,11	0,08	0,13	0,49	0,00	0,04	-0,05	0,08	0,044	0,22	-0,09	-0,12	0,02	-0,28
11	-0,01	0,14	-0,27	-0,46	0,01	-0,26	0,06	-0,38	0,07	0,13	0,12	-0,22	0,10	0,18	-0,18
12	-0,38	0,11	0,04	-0,01	0,14	-0,13	0,31	-0,15	-0,45	-0,02	-0,05	0,08	-0,13	-0,14	0,17
13	0,35	-0,02	-0,13	-0,01	0,12	-0,39	0,40	0,14	0,08	-0,00	-0,17	0,05	-0,20	-0,12	-0,12
14	0,21	-0,00	-0,11	0,12	0,38	0,18	-0,22	0,04	-0,24	-0,12	-0,25	-0,01	-0,03	0,07	-0,21
15	-0,18	-0,09	0,34	0,11	-0,11	-0,02	0,15	-0,38	0,28	-0,06	-0,23	-0,06	0,29	-0,31	-0,22
16	0,02	0,29	0,23	0,02	-0,00	0,26	-0,12	-0,21	0,19	-0,02	-0,30	-0,14	-0,15	0,13	0,31
17	-0,05	-0,10	-0,30	-0,22	0,20	0,03	-0,26	-0,06	-0,21	0,21	-0,34	0,21	0,28	-0,29	-0,09
18	-0,00	-0,00	0,12	-0,04	-0,06	-0,12	0,05	0,01	-0,04	0,23	0,00	0,07	0,05	0,39	0,07
19	-0,05	0,07	-0,10	-0,30	0,00	0,03	-0,10	-0,20	0,28	-0,05	0,10	0,38	-0,15	0,04	-0,00
20	0,18	0,12	0,03	-0,08	0,00	-0,04	0,00	-0,02	0,03	-0,31	-0,16	0,10	-0,16	-0,07	0,03
21	0,13	-0,16	0,00	0,02	-0,16	0,00	0,24	0,09	0,01	0,07	-0,16	0,27	0,03	0,02	0,08
22	0,11	0,31	0,02	-0,03	0,11	-0,25	-0,26	-0,19	0,00	-0,42	0,01	0,14	0,05	-0,03	0,00
23	0,08	0,35	0,03	0,19	-0,09	-0,29	-0,10	0,08	-0,18	-0,16	-0,01	0,02	0,25	0,07	-0,02
24	-0,25	0,49	-0,15	-0,10	-0,19	0,17	0,09	0,31	-0,04	0,06	-0,24	-0,13	-0,20	-0,04	-0,09
25	-0,39	-0,04	-0,13	0,28	-0,01	-0,06	-0,00	0,02	-0,00	-0,14	-0,06	0,44	0,05	0,29	0,03
26	0,02	-0,09	0,00	0,24	0,05	-0,16	0,17	-0,07	0,02	-0,20	0,14	-0,00	0,16	-0,00	0,00
27	0,00	-0,09	0,26	-0,04	0,12	-0,14	-0,18	0,05	-0,17	0,06	0,25	0,17	-0,25	-0,22	0,14
28	0,08	0,034	0,17	0,05	0,04	-0,11	-0,13	-0,02	-0,17	0,35	-0,13	-0,14	0,28	-0,01	0,08
29	0,05	-0,01	-0,18	-0,04	0,26	0,04	0,15	-0,21	0,05	0,14	0,01	0,10	-0,00	0,03	0,58
30	0,01	-0,03	-0,08	0,32	0,04	-0,21	-0,23	-0,18	0,10	0,17	-0,24	-0,07	-0,05	0,31	0,09

CP	CAF	LAF	CFI	CEF	LEF	CSF	CFU	LFU	EFF	PFF	PPF	PFS	NSF	ECF	BRIX
1	-0,24	-0,18	0,18	0,29	0,23	0,16	-0,25	-0,31	-0,23	-0,32	0,24	-0,24	-0,26	-0,03	-0,06
2	-0,08	0,13	-0,31	-0,10	-0,14	-0,29	-0,11	-0,16	-0,00	-0,01	0,01	0,01	-0,15	0,11	-0,03
3	-0,13	0,06	-0,08	0,23	0,31	-0,18	0,07	-0,02	-0,00	0,13	-0,18	0,06	-0,03	0,08	0,06
4	0,02	-0,20	0,16	0,12	0,11	0,16	0,18	0,05	0,08	0,08	-0,04	-0,11	0,20	-0,13	0,23
5	0,23	0,08	0,00	0,07	0,02	-0,09	-0,19	0,17	0,31	-0,05	0,33	-0,32	-0,13	-0,25	0,10
6	-0,22	-0,17	-0,14	0,12	0,09	-0,00	-0,04	0,16	0,33	0,12	0,11	0,04	0,25	0,40	0,22
7	-0,25	-0,23	-0,06	0,09	-0,06	-0,05	0,23	-0,03	-0,20	-0,12	-0,00	-0,03	-0,00	-0,24	0,45
8	-0,15	0,23	-0,12	0,04	-0,03	-0,11	0,14	-0,02	-0,08	-0,19	0,19	-0,08	-0,18	0,36	0,20
9	-0,03	0,39	0,06	0,08	0,07	-0,06	-0,22	0,08	0,04	-0,13	0,22	0,34	0,05	-0,37	0,34
10	-0,29	-0,12	0,01	-0,03	-0,09	-0,33	-0,18	-0,18	-0,14	-0,10	0,01	0,13	0,12	-0,13	-0,21
11	0,16	0,12	-0,18	-0,10	0,26	-0,09	0,22	-0,00	0,06	-0,11	0,20	-0,05	-0,06	-0,02	-0,10
12	0,05	0,35	0,26	0,11	0,049	-0,09	0,06	0,00	0,06	0,08	-0,05	-0,15	-0,11	-0,13	0,28
13	-0,21	0,10	-0,09	-0,08	-0,00	0,03	-0,08	0,00	0,07	0,12	-0,10	0,46	-0,22	0,00	0,03
14	0,20	0,08	-0,40	0,05	0,07	0,00	0,17	-0,29	-0,08	0,10	-0,21	-0,15	-0,10	-0,18	0,08
15	0,03	-0,01	-0,23	0,32	0,04	0,14	0,04	-0,05	-0,04	0,04	-0,02	0,14	0,13	-0,07	0,13
16	0,00	-0,20	0,15	-0,25	0,23	-0,18	0,11	-0,06	0,13	0,06	-0,00	0,28	-0,22	-0,16	0,12
17	-0,00	-0,29	0,23	0,01	0,03	-0,14	-0,06	0,09	-0,04	-0,04	0,08	0,22	0,02	0,18	0,11
18	0,30	-0,16	-0,15	0,41	0,06	-0,31	-0,42	0,13	-0,09	0,09	-0,21	0,05	-0,18	0,03	0,00
19	-0,15	0,01	0,02	-0,05	0,08	0,16	-0,27	-0,33	0,01	0,43	-0,16	-0,17	0,13	0,12	0,18
20	-0,05	0,05	-0,03	0,06	0,15	-0,28	0,06	0,42	-0,46	0,26	0,21	-0,12	0,30	-0,09	-0,14
21	-0,07	-0,01	-0,05	-0,03	0,21	-0,43	0,09	-0,28	0,31	-0,27	-0,09	-0,14	0,43	-0,09	-0,05
22	-0,01	-0,01	0,02	0,07	-0,11	0,05	-0,13	0,24	0,29	-0,4	-0,36	-0,03	0,05	-0,04	-0,04
23	0,12	-0,05	0,02	0,04	-0,19	-0,07	-0,10	-0,33	0,20	0,28	0,49	0,09	0,11	-0,02	-0,01
24	0,05	0,04	-0,27	0,00	0,07	0,15	-0,22	0,01	-0,07	-0,25	0,02	0,08	0,23	0,14	0,15
25	-0,24	-0,10	-0,31	-0,04	0,24	0,12	0,17	0,18	0,08	-0,01	0,18	0,02	-0,23	0,08	-0,06
26	0,30	-0,14	-0,03	-0,54	0,13	-0,06	-0,20	-0,00	-0,29	-0,14	-0,03	-0,07	0,05	0,16	0,39
27	0,30	-0,03	-0,04	0,04	0,46	0,27	-0,02	-0,11	-0,01	-0,08	0,10	0,29	0,14	-0,04	-0,22
28	-0,35	0,16	-0,14	-0,28	0,21	0,16	-0,37	0,17	0,05	0,10	-0,02	-0,21	0,06	-0,27	-0,07
29	0,04	-0,08	-0,31	0,04	-0,40	0,15	-0,00	0,00	-0,09	-0,11	0,15	0,08	0,19	-0,19	0,06
30	-0,03	0,43	0,22	0,08	0,02	0,05	0,07	-0,13	-0,22	-0,10	-0,07	0,14	0,23	0,34	-0,04

Comprimento da flor (FF); Diâmetro da flor (DFF); Comprimento do tubo floral (TFF); Comprimento do diâmetro da corona (DCF); Comprimento do androginóforo (CAF); Comprimento do pedúnculo da flor (TPF); Comprimento dos filamentos da corona (FCO); Comprimento do ovário (CO), Largura do ovário (LOF); Comprimento da pétala (CPF); Largura da pétala (LPF); Comprimento da sépala (CSF); Largura da sépala (LSF); Comprimento da bráctea (CBF); Largura da bráctea (LBF); Comprimento da antera (CAF); Largura da antera da flor (LAF); Comprimento do filete (CFIL); Comprimento do estigma; (CEF); Largura do estigma (LEF); Comprimento do estilete (CSF); Comprimento do fruto (CFU); largura do fruto (LFU), Espessura do fruto (EFF); Peso fresco do fruto (PFF); Peso da polpa (PPF), Peso das sementes (PFS); Número de sementes; Espessura da casca; Teor de sólidos solúveis (BRIX).

O grupo I formou 2 subgrupos, sendo que o grupo IA é constituído pelo genótipo 4 e o grupo IB pelos genótipos 10 e 14. No grupo III observou-se a formação de três subgrupos, sendo o grupo III A constituído pelo genótipo 11, grupo III B os genótipos 6, 7 e 8 e no grupo III C os genótipos 14, 15,12. Enquanto, que no grupo IV, ocorreu a formação de dois subgrupos sendo grupo IV A com o genótipo 9 e no grupo IV B com os genótipos 1, 2 e 3.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5, o genótipo que apresentou maior divergência genética com base nos caracteres avaliados foi o genótipo 5, pertencente ao Grupo II. Quando foi realizado o corte de 80% de dissimilaridade nos grupos pode-se identificar que os genótipos 4, 9 e 11 também se divergiram geneticamente. Desta forma, estes genótipos apresentam características promissoras, o que pode aumentar a eficiência nos futuros programas de melhoramento e de conservação genética de *P. cristalina.*

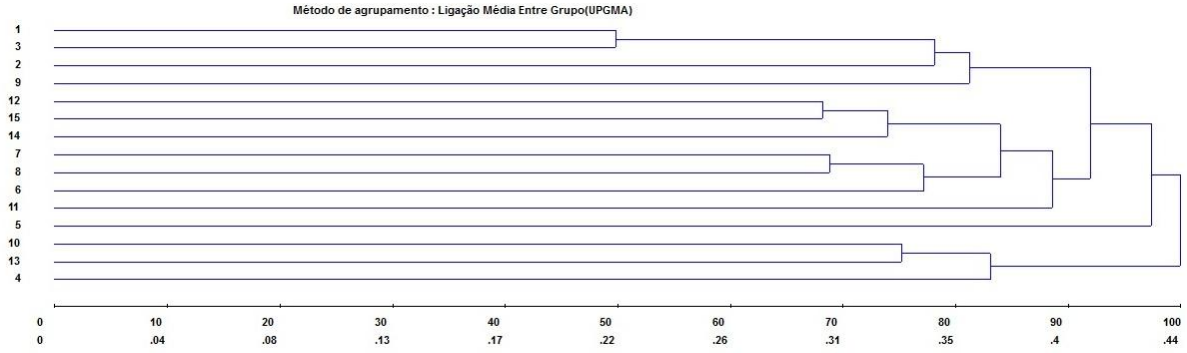

FIGURA 5: Dendrograma representativo dos genótipos de *P. cristalina* obtido a partir de características quantitativas pelo método UPGMA.

No dendrograma obtido, os 15 genótipos são extremamente divergentes, uma vez que todos os genótipos se agruparam acima de 50%, o que pode estar correlacionado com a grande variação dos caracteres fenotípicos, provavelmente associados à variabilidade genética existente em *P. cristalina*. Este percentual de agrupamento pode ser devido ao sistema de autocompatibilidade das plantas de cruzamento, especialmente as espécies não domesticadas como é o caso da espécie em estudo. De acordo com Cunha et al., (2004) estas características favorecem a seleção em programas de melhoramento genético e na conservação de muitas espécies, uma vez que permitem descrever e diferenciar acessos, identificar

genótipos contrastantes a fim de realizar cruzamentos promissores (Cruz e Carneiro, 2006).

CONCLUSÕES

Os caracteres de maior contribuição para a variabilidade genética dos genótipos estudados são: peso fresco do fruto, comprimento do estigma, comprimento dos filamentos da corona, largura do fruto, largura da pétala e peso da polpa. Portanto, estes caracteres são considerados os mais responsivos para a seleção de genótipos da espécie em estudo.

Há uma grande divergência genética entre os genótipos analisados, e os indivíduos 4, 9 e 11 são os mais indicados para cruzamentos em futuros programas de melhoramento e de conservação genética da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R.M.; GARCIA, A.A.G.F; CRUZ, E.D.; FILGUEIRA, A.Seleção de descritores botânicos- agronômicos para a caracterização de germoplasma de cupuçuazeiro**.** Brasília. **Pesquisa agropecuária brasileira**. 38:807-818. 2003.

ARRIEL, E.F.; PAULA, R.C.; BAKKE, O.A; ARRIEL,N.H.C.Divergência genética entre clones de cupuaçuzeiro (Theobromaglandiflorum Wild ex Spreng. Schum). Lavras, Minas Gerais.**Ciência e Agrotecnologia**.26:13-21, 2002.

BELLON. G.; FALEIRO, G. F.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA N. T. V.; FONSCECA, K. G.; BRAGA, M. F. Variabilidade genética de acessos obtidos de populações cultivadas e silvestres de maracujazeiro-doce com base em marcadores RAPD. São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**. 31:197-202. 2009.

BELO, G.O. **Análises morfológicas e genéticas em Progênie hibrida F_1 do cruzamento de *Passiflora gardneri* Mast. x *Passiflora gibertii* N.E.Brown**. Universidade Estadual de Santa Cruz. 2010. 66p. (Dissertação- Mestrado em Produção Vegetal).

BLEICH, M. E.; ROBOREDO, D.; SILVA, E. P.; BERGAMASCO, S. M. P. P. Caracterização limnológica de riachos de cabeceira em Alta Floresta-MT: subsídios para avaliação da eficácia de ações de recuperação de áreas ripárias degradadas. In: Simpósio processos ecológicos, eestauração e ecovaloração em Zonas Ripárias. **Anais.** Brasília, AQUARIPÁRIA/UnB/EMBRAPA.Versão eletrônica. 2012. 35p.

CUNHA, M. A. P., BARBOSA, L. V., G. A.; LIMA A. de; CUNHA, M; A. P. **Maracujá: Produção e Qualidade na Passicultura**. Botânica.2004.p.13-36.

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

CRUZ, C.D.; **Programa Genes**: diversidade genética. Viçosa: UFV. 2008.278p.

CRUZ, C.D., Carneiro, P.C.S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético.** 2ª ed.Viçosa: UFV. 2006.585p.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** Viçosa: UFV. 2004. 480p.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Viçosa: UFV.2003. 585 p

CRUZ, C.D.;Regazzi, AJ. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 2. ed. Viçosa, UFV. 2001. 390 p.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa, MG: Imprensa Universitária.1997. 390 p.

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

GODOY, R.C.B. de; LEDO C.A.S.; SANTOS A.P. de; MATOS, E.L.S.; LIMA A.A.; WASZCZYNSKYJ, N. Diversidade genética entre acessos de maracujazeiro amarelo avaliada pelas características físico-químicas dos frutos. São Paulo. **Revista Ceres**. 54: 541-547. 2007.

IBGE INSTITUTO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Manual técnico da vegetação brasileira.** 2. ed. Rio de Janeiro: Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais/IBGE.2012. 271p.

JUNQUEIRA, N.T.V., Lage, D.A.C., Braga, M.D., Peixoto, J.R., Borges, T.A., Andrade, S.R.M. Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas herbáceas de passiflora silvestre. **Revista Brasileira Fruticultura**.Jaboticabal,São Paulo 28:97-100. 2006 .

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de Passiflora. 2008.

MANICA, I. Fruticultura tropical: maracujá - São Paulo: **Agronômica Ceres**. 1981. 160p.

MELETTI, L.M.M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira Fruticultura**. Jaboticabal, São Paulo. 33: 83-91. 2011.

MORRISON, D. F. Multivariat estatistical methods. 2 ed . Tokyo, **Mc Graw Hill**.1981. 415p.

RAPOSO, A.; MARTINS, K.; CIAMPI, A. Y.; WADT, L. H. O.; VEASEY, E. A. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. 42: 1291-1298. 2007.

SEPLAN. **Zoneamento sócio-econômico-ecológico do Estado de Mato Grosso.** Cuiabá: Secretaria do Planejamento, 2000. 300p.

4.3 CAPÍTULO 3

Biologia floral, viabilidade polinica e receptividade estigmática de *Passiflora cristalina* Vanderpl. & Zappi

RESUMO

Passiflora cristalina Vanderpl. & Zappi. é uma espécie nativa da região Amazônica com ocorrência natural no municipio de Alta Floresta, norte do estado de Mato Grosso. O presente estudo objetivou avaliar o desenvolvimento floral em campo de *Passiflora cristalina*, bem como estimar a viabilidade polínica e a receptividade estigmática em diferentes horários durante a antese floral. Para a avaliação da receptividade e viabilidade, os estigmas e os grãos de polens foram coletados em intervalos de três em três horas, sendo os horários de coleta: 01h (inicio de abertura da flor), 04h, 07h, 10h e 13h. A viabilidade foi estimada por meio dos seguintes testes colorimétricos: solução tripla de Alexander, carmim acético e lugol. A receptividade estigmática foi avaliada com o uso de peróxido de hidrogênio a 3% (H_2O_2). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com o programa estatístico GENES. A espécie *P. cristalina* inicia a abertura floral por volta da 01h da manhã e o processo de senescência por volta das 13h do mesmo dia tendo, portanto, uma antese com duração aproximada de 12h. A análise de variância revelou diferença significativa a 1% de probabilidade para a viabilidade polínica entre os horários em cada um dos testes colorimétricos avaliados. Independente do corante utilizado, foi obtida uma alta viabilidade polínica, com percentual médio de 92,85% para solução tripla de Alexander, 95,55% para lugol e de 94,73% para carmim acético. A maior viabilidade polínica foi encontrada no horário da 01h, porém este horário não diferiu estaticamente dos horários das 04h, 07h e 10h, e o menor percentual de viabilidade do pólen foi obtido às 13h. Os estigmas apresentaram-se altamente receptivos, desde a abertura da flor até a senescência floral; entretanto o horário de maior receptividade foi das 07h às 10h, e o menor às 13h com 68,33 %. Observou-se que a viabilidade polínica tende a diminuir após a abertura da flor, enquanto que o estigma mantém-se receptivo durante todo o período em que a flor encontra-se aberta. Com base nos resultados de viabilidade polínica e receptividade do estigma, recomenda-se que as polinizações manuais na espécie sejam realizadas entre as 07h e 10h.

Palavras-chave: Maracujá silvestre, Recursos vegetais e Melhoramento vegetal.

Floral biology, pollen viability and stigmatic receptivity *Passiflora cristalina* Vanderpl. & Zappi

ABSTRACT

Passiflora cristalina Vanderpl. & Zappi. Is a native species from the Amazon region with a natural occurrence in Alta Floresta municipal district MT, north of Mato Grosso state. This study aimed to evaluate the Passiflora cristalina floral development, and estimate the pollen viability and the stigmatic receptivity at different hours during the floral anthesis. To evaluate the receptivity and the viability, the stigmas and the pollen grains were collected in intervals of every three hours, being the collecting time: 1h (start of flower opening), 4h, 7h, 10h and 13. The viability was estimated using the following colorimetric tests: Alexander triple solution, acetic carmine and lugol. The stigmatic receptivity was evaluated with the use of hydrogen peroxide at 3% (H_2O_2). Data were submitted to the analysis of variance and the averages were compared by the Tukey test at 5% of probability, through the GENES statistical program. The *Passiflora cristalina* starts the floral opening at around 1h and the senescence process at around 13h on the same day, thus an anthesis lasting approximately 12 hours. The analysis of variance revealed a significant difference at 1% of probability for the pollen viability between the hours in each of the evaluated colorimetric tests. Regardless the dye used, a high pollen viability was obtained, with an average percentage of 92,85% for the Alexander triple solution, 95,55% to the lugol and 94,73% for the acetic carmine. The greatest pollen viability was found at 1h, but this time did not differ statistically from the hours of 4h, 7h and 10h. The lowest pollen viability rate was obtained at 13h. The stigmas were highly receptive from the flower opening to the floral senescence, however the greater receptivity time was from 7h to 10h, and the lowest at 13h, with a 68,33% percentage. It was observed that the pollen viability tends to decrease after the flower opening while the the stigma remains receptive during the entire period that the flower is open. Based on the results of the pollen viability and stigma receptivity, it is recommended that the manual species pollination should be performed between 7h and 10h.

Keywords: Wild passion fruit, Plant Resource; Plant Breeding.

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* é o mais importante da família Passifloraceae (Ulmer & McDougal, 2004), apresenta ocorrência pantropical com distribuição descontínua nos trópicos e subtrópicos (Ocampo et al. 2007). Aproximadamente 139 espécies de *Passifloras* são originárias do Brasil (Bernacci et al., 2014), sendo considerado um dos mais importantes centros de diversidade genética (Ferreira, 1994).

As espécies do gênero *Passiflora* caracterizam-se por serem plantas de cruzamento em virtude, principalmente, da morfologia floral (Akamine & Girolami, 1959). As flores do maracujá têm um colorido atraente, são vistosas, aromáticas e com abundância de néctar, causando forte atração aos polinizadores, fator que favorece a polinização cruzada principalmente por insetos (Hoffmann, 1997). A forma de reprodução de espécies de *Passiflora* são reforçadas pela autoincompatibilidade do tipo homomórfica e esporofítica (Bruckner et al. 1995), embora seja possível encontrar plantas autocompatíveis (Menzel et al. 1989).

Em função do potencial econômico elevado, o maracujá está entre as principais espécies frutíferas cultivadas do país (Vasconcelos et al., 1994). As flores de *Passiflora* despertam interesse pela sua beleza exótica com formatos e cores ímpares (Abreu et al. 2009). Portanto, cruzamentos interespecíficos têm sido realizados a fim de obter flores com formato e cores peculiares, sendo destinadas para a utilização na linha do agronegócio de plantas ornamentais (Santos et al. 2011).

Informações sobre morfologia floral, horário de abertura plena (antese), horário de receptividade do estigma e viabilidade dos grãos de pólen fornecem direcionamento e conferem segurança a cruzamentos, aumentando a eficiência na identificação de gametas masculinos com potencial para serem utilizados em hibridações (Krishnakumar et al. 1992; Silva et al. 2006).

Considerando que a manifestação do genótipo de um indivíduo é o resultado da contribuição trazida pelos gametas masculinos e femininos, quanto maior a viabilidade polínica, maior a possibilidade de formação de diferentes combinações entre alelos, e em última análise, de variabilidade genética (Souza et al. 2002). A taxa de fertilização e o sucesso de polinização também podem ser influenciados pela receptividade do estigma (Souza et al. 2004). Normalmente, o estigma receptivo produz substância viscosa que facilita a aderência do pólen, garantindo a

fertilização, e consequentemente, a formação de frutos e sementes (Maués e Couturier, 2002). Deste modo, estudos sobre o estádio floral em que o estigma apresenta-se receptivo pode estar atrelado ao sucesso ou fracasso da polinização artificial (Dafni e Maues, 1998).

Neste contexto, o trabalho tem por objetivo avaliar o desenvolvimento floral em campo de *Passiflora cristalina* bem como estimar a viabilidade polínica e a receptividade estigmática em diferentes horários, durante a antese floral, visando gerar informações que possam auxiliar em polinizações artificiais e futuros programas de melhoramento.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado em um fragmento florestal, denominado Parque C&E, localizado no perímetro urbano do município de Alta Floresta, Mato Grosso (Figura 01).

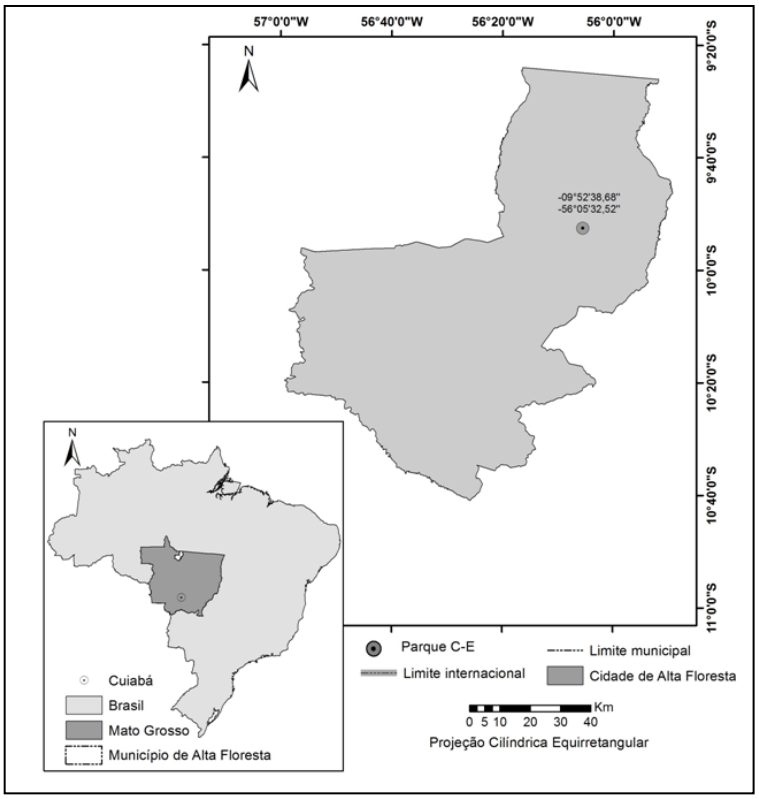

FIGURA 1: M M M M M M Sr M M M M M M

e localiza-se ao norte do estado de Mato Grosso (Figura 01), está a 283 m de altitude, o clima é equatorial quente e úmido com temperatura média anual de 24ºC, e máxima de 40ºC (Bleich e Silva, 2013). Na região, predomina a vegetação do tipo Floresta Ombrófila Aberta (IBGE, 2012), latossolos, solos podzólicos, solos litólicos distróficos, solos indiscriminados concrecionários, e ao longo dos rios ocorrem solos do tipo gley pouco húmico, e areias quartzosas (Seplan, 2000).

Material Vegetal

No período do florescimento da espécie no final de julho a novembro de 2014, foram coletados botões florais e flores abertas para análise da receptividade dos estigmas e da viabilidade polínica. As coletas foram realizadas em cinco horários em intervalos de três em três horas: às 01h, 04h, 07h, 10h e às 13h.

Biologia Floral

Foi observado em campo o desenvolvimento floral, desde a pré-antese até a senescência floral. Durante o período de coleta, entre 01h-13h, foram determinados quatro estádios de desenvolvimento floral, tendo como base a abertura da flor de *P. cristalina*: estádio I (01h) - início da antese floral; estádio II (04h) - pétalas e sépalas parcialmente abertas; estádio III (07h) e (10h) - pétalas e sépalas totalmente abertas, e estádio IV- início da senescência floral (13h), conforme está apresentado na Figura 02. As flores de *P. cristalina* foram descritas conforme o Manual de Organografia de Vidal e Vidal (2000).

Viabilidade Polínica

Para a avaliação da viabilidade polínica foram coletadas anteras de cinco flores em cada um dos horários estabelecidos acima. Posteriormente, o material coletado foi fixado em solução carnoy (etanol: ácido acético, na proporção 3:1), mantidos em temperatura ambiente por 24 horas e transferidos para freezer até o preparo das lâminas.

A estimativa da viabilidade do pólen foi realizada com o corante carmim acético 2%, Solução tripla de Alexander (Orange G, fucsina básica, verde malaquita)

e Lugol. O carmim acético indica a viabilidade do pólen pela coloração vermelha (Kearns e Inouye, 1993); o lugol indica a viabilidade pela coloração marrom (Dafni, 1992); na solução tripla de Alexander, indica a viabilidade pela presença da cor vermelha ou púrpura no protoplasma (Alexander, 1980).

Foram preparadas cinco lâminas para cada horário de coleta, sendo contabilizados pelo método de varredura sob microscópio fotômico binocular com lente objetiva de 40x (BEL Fhotonics e Primo Star Zeiss), 250 grãos de pólen por lâmina, totalizando 1.250 grãos de pólen por horário avaliado para cada corante.Os grãos de polen foram classificados como normais/ viáveis (N/V) e anormais/ inviáveis (A/I) de acordo com a reação de coloração. Com os dados obtidos em cada horário, calculou-se a porcentagem de pólens viáveis.

Para o preparo das lâminas utilizou-se técnica de esmagamento das anteras (Guerra e Souza, 2002), onde foi adicionada uma gota de corante sobre o material contido na lâmina, posteriormente coberto com uma lamínula, e em seguida, as lâminas foram vedadas. As imagens de interesse foram obtidas por meio do capturador de imagens acoplado ao fotomicroscópio Leica DMLB com o auxílio do programa Leica IM50.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do Intervalo de confiança, análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a nível 5% de probabilidade com auxílio do Programa GENES (Cruz, 2008).

Receptividade estigmática

A receptividade estigmática foi avaliada nos cinco horários estabelecidos anteriormente (01h, 04h, 07h, 10h e às 13h) durante três dias consecutivos, sendo avaliadas em cada dia 25 flores de *P. cristalina* (cinco em cada horário), totalizando 75 flores. Os estigmas foram retirados e imersos em água oxigenada a 3% por três minutos para a observação da liberação de bolhas de ar, uma vez que a reação da água oxigenada com a enzima peroxidase, indica que o estigma está receptivo, segundo metodologia descrita por Zeisler (1938). A reação foi visualizada com o auxílio de uma lupa de mão (10x).

A receptividade foi estimada de acordo com a intensidade de formação de bolhas na superfície estigmática, sendo classificada em: 0, 25, 50, 75 e 100% de atividade da reação com a peroxidase (Figura 7) . Para obter resultados confiáveis,

estigmas danificados ou com pólen na superfície não foram utilizados, evitando-se obter resultado falso positivo. O efeito dos horários sob a receptividade do estigma foi observado com base no percentual médio em cada intervalo de observação e através da análise de regressão com a média geral das três avaliações. Os dados do gráfico de Regressão foram obtidos através do Programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2003), e o gráfico confeccionado no Programa Microsoft Office Excel 2007.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Biologia Floral

A espécie *P. cristalina* começa a abertura floral por volta da 01h da manhã (Figura 2B) e inicia o processo de senescência por volta das 13h do mesmo dia (Figura 2C), tendo a antese com duração aproximada de 12h. Às 04h, o perianto está parcialmente aberto, porém os órgãos reprodutivos florais, estigma e anteras já estão totalmente expostos (Figura 2C). As sépalas e as pétalas estão totalmente expandidas às 07h (Figura 2D), permanecendo assim até o início da senescência floral, por volta das 13h.

Resultados semelhantes foram obtidos por Sazima e Sazima (1978) ao estudar *P. mucronata*, observou que a espécie apresentou uma antese noturna que iniciou por volta da 01h às 02h, se estendendo até às 13h. Entretanto Britto (2013), ao estudar indivíduos de *P. cincinnata* registrou para a espécie o início da antese por volta de 5:15h, estando a flor totalmente aberta às 6:30h, com o fechamento das flores às 19h, horário semelhante ao relatado por Duarte et al., (2009) ao trabalhar com a mesma espécie.

Espécies do gênero *Passiflora* apresentam períodos de abertura floral diferentes, quase sempre curtos, dificilmente passando de oito horas, sendo geralmente o horário de antese e o fechamento das flores adaptadas aos períodos de atividade dos polinizadores (Costa et al., 2009). Entretanto, espécies silvestres de Passiflora apresentam um período de antese floral ampliado, como foi observado neste estudo para *P. cristalina* e em estudos realizados por Faria, (2010) ao trabalhar com *P. capsularis* L. e *P. pohlii* Mast., sendo que para ambas as espécies, o período de antese floral perdurou por volta de 12horas.

FIGURA 2: Estádios florais de *P. cristalina* determinados para as avaliações neste estudo. (A) botão em pré-antese; (B) Estádio I (01h) - Início da antese floral; (C) Estádio II (04h) - pétalas e sépalas parcialmente abertas com total exposição do estigma e anteras; (D e E) Estádio III (07h e 10h) - pétalas e sépalas totalmente abertas, e (F) Estádio IV- início da senescência floral (13h).

A flor de *P. cristalina* Vanderpl. & Zappi. é solitária, sustentada por um pedúnculo, hermafrodita, actnomorfa, cíclica e homoclamídea. Apresenta três brácteas com glândulas. O cálice é formado por cinco sépalas; dialissépala no tubo floral está localizada a câmara nectarífera, coberta pelo opérculo e limitada internamente pelo límen. A corola é pentâmera e dialipétala. A corona é constituída por duas séries de filamentos radiais, os estaminoides (Vanderplank e Zappi, 2011).

Os estames são sempre em número de cinco e estão unidas por suas bases, formando uma membrana aderente ao androginóforo junto à inserção do ovário, as anteras são dorsifixas com deiscência longitudinal extrorsa e diteca; gineceu com 3 estiletes que iniciam do centro do extremo superior do ovário e os estigmas são capitados. O gineceu quanto à soldadura é gamocarpelar, e quanto ao número de carpelos é tricarpelar, o ovário é elipsóide ou alongado; unilocular e com três placentas parietais (Vanderplank e Zappi, 2011).

Quanto à reprodução, *P. Cristalina* é uma espécie de cruzamento apta a autogamia (Freitas, 2010; Silveira, 2012). Embora a espécie em estudo apresente níveis de autogamia, a autopolinização é dificultada pela movimentação dos órgãos

reprodutivos, fazendo com que as flores sejam classificadas com comportamento feminino ou masculino, estabelecendo uma barreira temporal para a polinização em estigmas receptivos, mas não uma barreira fisiológica (Freitas, 2010).

Nas populações naturais de *P. cristalina* durante todo o período da antese, foram encontradas flores com posicionamento dos estiletes erguidos (Figura 3A), sendo estas funcionalmente masculinas, pois as abelhas ao visitarem as flores, tocam as anteras, aderindo ao seu corpo, porém dificilmente entrando em contato com os estigmas da mesma flor. Foram encontradas também flores com total curvatura dos estiletes (Figura 3B), sendo estas funcionalmente femininas, pois o posicionamento do estigma próximo às anteras facilita o contato dos dois órgãos reprodutivos das flores pelo visitante floral e a deposição do pólen da mesma flor no estigma, propiciando assim a autopolinização.

FIGURA 3: Detalhe do posicionamento dos órgãos reprodutivos na flor de *P. cristalina.* A) Flor com comportamento masculino. B) Flor com comportamento feminino.

Viabilidade polínica

Os polens viáveis de *P. cristalina* ao serem submetidos ao teste colorimétrico com solução tripa de Alexander apresentaram uma coloração roxa, e os polens inviáveis apresentaram a coloração esverdeada (Figura 4 A e B). O composto verde malaquita reage com a celulose da parede celular do pólen e a

fucsina ácida com o protoplasma, refletindo a coloração púrpura, enquanto que o Orange G é um intensificador da coloração (Alexander 1980; Kearns & Inouye 1993).

Nos testes colorimétricos com carmim acético, os grãos de pólen viáveis apresentaram uma coloração vermelha intenso, enquanto os grãos inviáveis mostram-se transparentes e não corados (Figura 4 C e D). Esta coloração ocorre devido à reação com o material genético existente no citoplasma como o DNA (Pagliarini e Pozzobon, 2004).

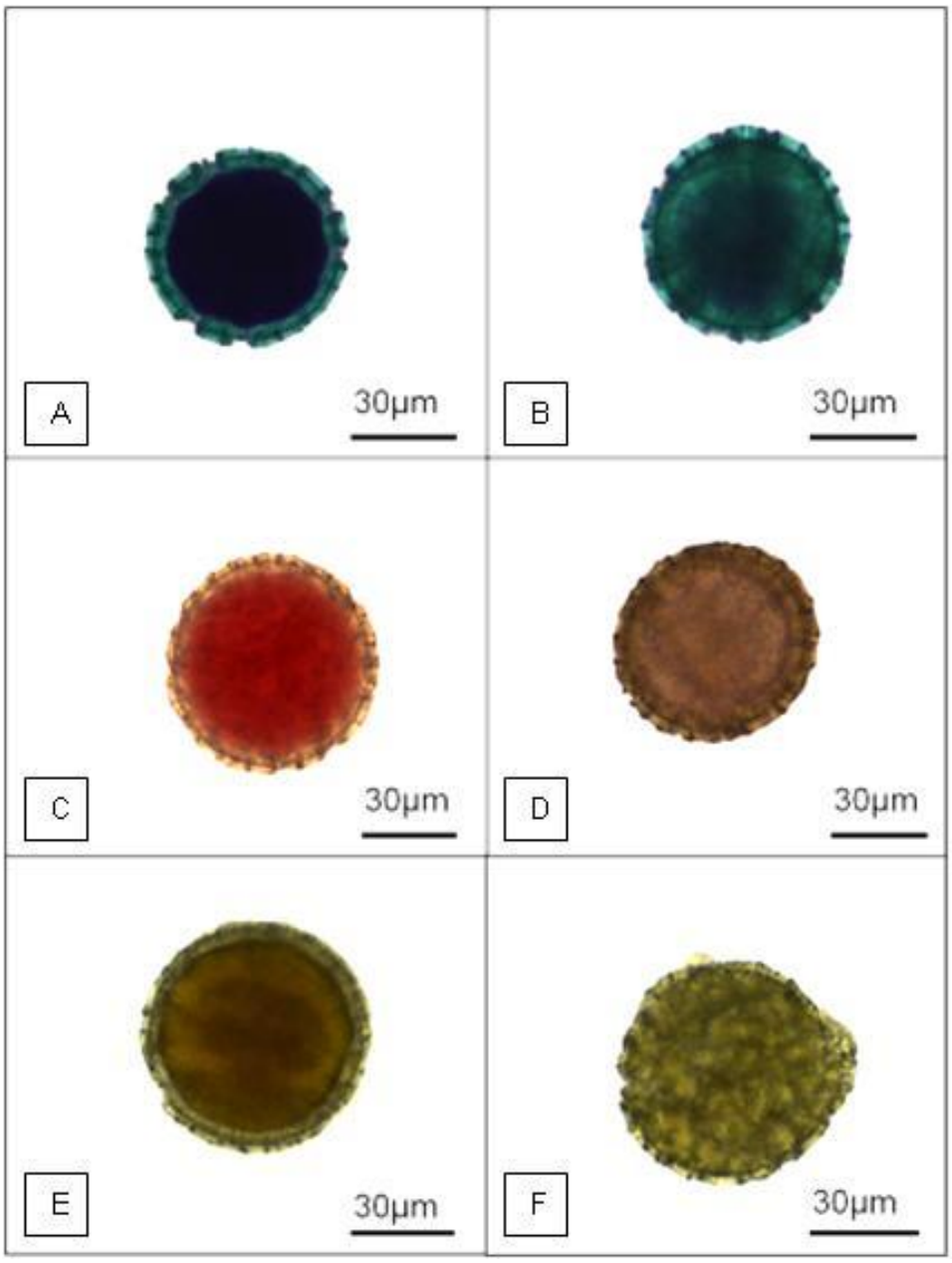

FIGURA 4: Testes colorimétricos em grãos de pólen de *P. cristalina*: Polens corados com a solução tripla de Alexander, pólen viável (A) e pólen inviável (B); Carmim acético, pólen viável (C) e inviável (D); Lugol, pólen viável (E) e inviável (F).

O corante lugol permitiu a distinção dos polens viáveis e inviáveis de *P. cristalina* (Figura 4 E e F), uma vez que essa coloração baseia-se em uma reação química entre o iodo e a molécula de amido, dando aos grãos de pólen viáveis uma coloração marrom e aos inviáveis, devido à ausência de amido, uma coloração amarela-clara, e são transparentes (Pagliarini e Pozzobon, 2004).

Os resultados da análise de variância revelaram que houve diferença entre os horários de coletas quanto à viabilidade polínica em ambos os corantes, a 1% de probabilidade (Tabela 1).

TABELA 1: Resumo da análise de variância de viabilidade polínica em função de diferentes horários de coletas do grão de pólen de *P. cristalina*.

FV		QM		
	GL	Alexander	Lugol	Carmim
Horários	2	723,69	59,23	99,79
F	-	21,87**	11,15**	16,92 **
Média	-	91,84	95,55	94,73

** Significativo a 1% de probabilidade**.**

Em todos os três testes colorimétricos utilizados, o horário que apresentou a menor viabilidade polínica foi o das 13h, período em que inicia-se a senescência floral (Tabela 2). O teste de média (Teste de Tukey) revelou diferenças estatísticas significativas a 5%, entre os horários de coletas para as estimativas de viabilidade polínica nos três corantes. Porém, todos os horários apresentaram percentual médio de viabilidade polínica acima de 70%, o que segundo Ruggiero et al. (1996) e Souza et al. (2002), pode ser considerado um percentual alto para espécies do gênero *Passiflora*.

Resultados semelhantes aos deste estudo foram obtidos por Souza et al. (2002), onde foi observado que o maracujazeiro amarelo apresentou um alto percentual de viabilidade polínica às 12h, mantendo um percentual médio até 19h. Já Brito (2013), ao avaliar *P. quadrangularis e P. Cincinnata* detectou uma alta viabilidade das 09:30h até 12:30h. Em ambos os estudos, foi observada uma redução do percentual de viabilidade polínica.

TABELA 2: Porcentagem de viabilidade polínica de *P. cristalina* por meio da coloração com Solução tripla de Alexander, Lugol, Carmim acético em diferentes horários de coleta.

Horários	Corantes		
	Alexander	**Lugol**	**Carmim**
01h	96,35 aB	97,39 aAB	97,71aA
04h	98,81 aA	94,67 abA	93,36 bcA
07h	95,79 aA	95,92 abA	95,57 abA
10h	93,68 aB	97,20 aA	95,97 abA
13h	79,60 bB	92,59 bA	91,04 cA
Média	92,85	95,55	94,73

As letras minúsculas comparam os horários dentro de cada corante e as letras maiúsculas comparam as médias no mesmo horário entre os corantes pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade.

Os resultados demonstraram que independente dos corantes utilizado neste estudo, foi obtida uma alta viabilidade polínica de *P. cristalina* Vanderpl. & Zappi, com um percentual médio de 92,85% para solução tripla de Alexander, 95,55 % para lugol e de 94,73% para o carmim acético. Souza et al., (2004) ao analisar a viabilidade polínica de *Passiflora* silvestres com auxílio do Lugol, observou um alto percentual de viabilidade polínica com 99,55%.

O corante reativo de Alexander revelou um menor percentual de viabilidade polínica (91,85%) e um maior intervalo de confiança a 95 % (Figura 5). Enquanto o corante carmim acético e o lugol apresentaram um maior percentual de viabilidade polínica 94,73% e 95,55%, respectivamente.

O estudo da viabilidade dos grãos de pólen é de primordial importância em trabalhos na área agrícola e na biotecnológica, avaliar anormalidades meióticas, e consequentemente, a infertilidade do pólen, auxiliar na seleção de materiais genéticos e fazer inferências sobre as direções dos possíveis cruzamentos (Techio, 2002). A relação entre o pólen e o estigma depende da viabilidade dos grãos de pólen, da receptividade do estigma e das alterações genéticas entre as partes (Bueno e Cavalcante, 2001).

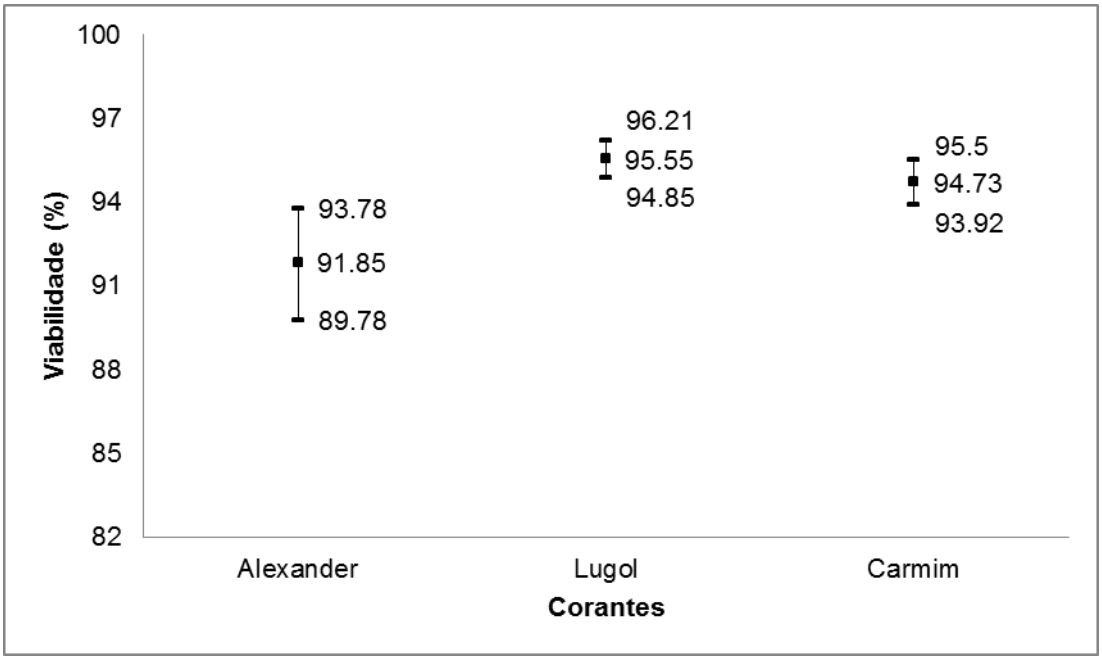

FIGURA 5: Intervalo de confiança a 95% obtidos através de testes colorimétricos com Carmim acético, solução tripla de Alexander e Lugol.

Através da avaliação da viabilidade polínica pode ser recomendada a coleta de pólen de *P. cristalina* em todo o período que a flor encontra-se aberta, com exceção das 13 h, período em que foram observadas as menores taxas de viabilidade polínica. Porém, um fator importante a ser considerado é a quantidade de grãos de pólen, pois alguns polinizadores ao visitarem a flor do maracujá entram em contato com as anteras e derrubam o pólen das flores, até mesmo a ação do vento pode ocasionar a redução dos grãos de pólen nas flores. Observa-se que, apesar da viabilidade ser alta em todo o período floral, recomenda-se que a coleta de pólen nas flores seja realizada logo nos primeiros horários da abertura da flor, entre 04h e 10h.

Receptividade estigmática

Os estigmas de *P. cristalina* apresentaram-se receptivos em todas as fases florais obtendo as maiores médias no horário das 07h com um percentual de 81,67% e às 10h de 86,67%, o menor percentual médio foi encontrado às 13h com 68,33%, como pode ser observado na Tabela 3 e Figura 6 e 7.

TABELA 3: Percentual médio da receptividade estigmática em flores de *P. cristalina* provenientes de diferentes estádios florais.

Receptividade estigmática				
Horários	1º avaliação (%)	2º avaliação (%)	3º avaliação (%)	Média (%)
01 h	55	75	85	71,67
04 h	90	90	55	78,33
07 h	60	90	95	81,67
10 h	85	90	85	86,67
13 h	50	65	90	68,33

Estudos realizados por Fonseca (2005) em diferentes horários ao estudar *P. morifolia,* observou que os melhores índices de receptividade foram obtidos entre 9 às 13 h, enquanto que, em *P. suberosa,* os melhores resultados foram os de 7 h.

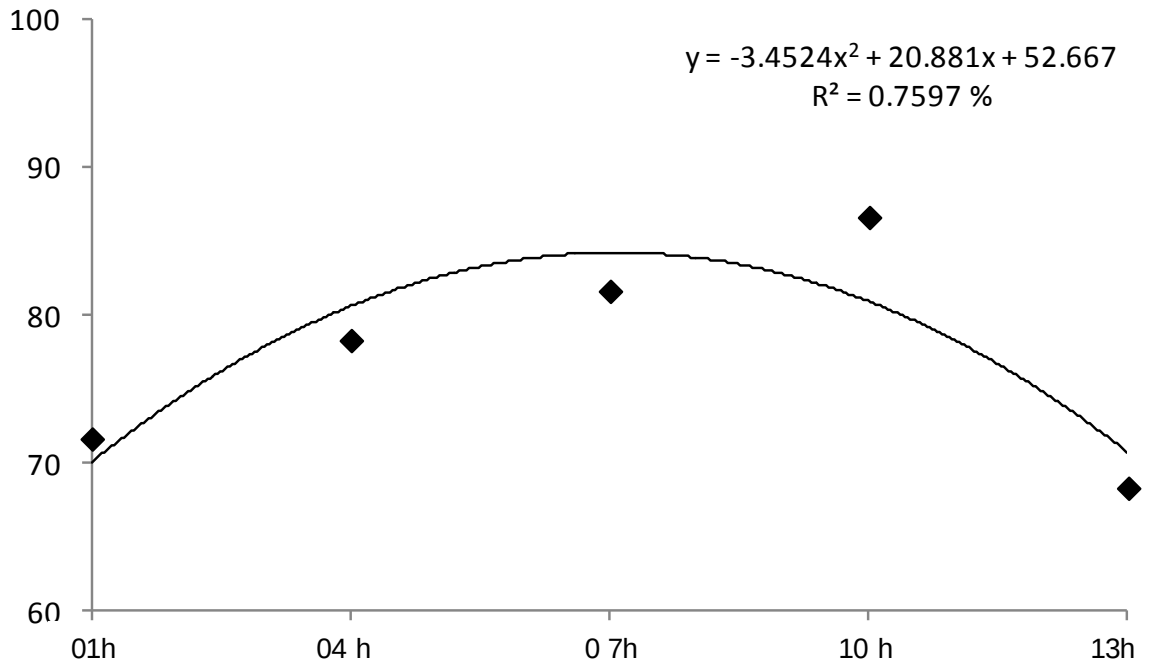

FIGURA 6: Receptividade estigmática de *P. cristalina* em cinco diferentes horários de coleta.

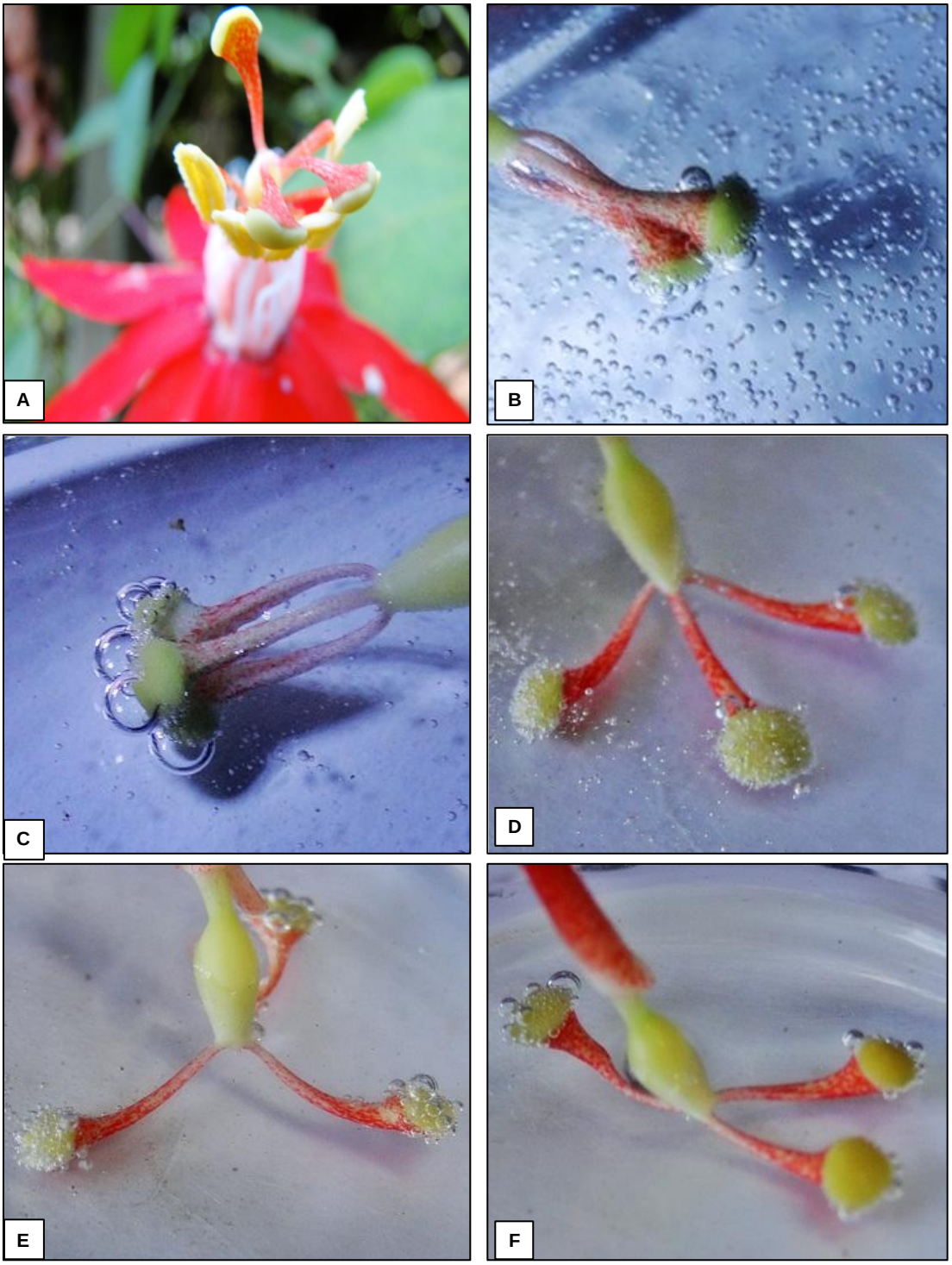

FIGURA 7: Receptividade do estigma. A) Flor de *P. cristalina*; B) 01h - 50% receptividade; C) 04h - 50%receptividade; D) 07h - 75% receptividade; E) 10h - 100% receptividade; F) 13h - 25% receptividade.

Os resultados deste estudo revelam que o melhor período para as polinizações manuais são entre 7-10 h. Sendo assim, conhecer o período que o estigma encontra-se receptivo ao grão de pólen, é fundamental para garantir o

sucesso em experimentos de hibridação e em todo e qualquer procedimento que ocorra polinização artificial (Bruckner et al., 1995).

A receptividade estigmática em *P. cristalina* tende aumentar a partir do inicio da antese floral, atingindo uma receptividade máxima às 10h com 86,67 % e após este horário ocorre uma redução na receptividade estigmática, atingindo o percentual de 68,33% às 13h (Figura 6).

CONCLUSÕES

A espécie *P. cristalina* inicia a abertura floral por volta da 01h da manhã e a senescência ocorre aproximadamente por volta das 13h do mesmo dia com uma duração da antese floral aproximada de 12h. As flores são hermafroditas, porém possuem comportamento feminino ou masculino, com base na movimentação e posicionamento dos estiletes. A espécie apresentou um alto percentual de viabilidade polínica e receptividade estigmática independente da fase floral avaliada, exceto para o horário da 13h, onde houve uma redução tanto na viabilidade polínica quanto na receptividade estigmática. Com base nos resultados de viabilidade polínica e receptividade do estigma, recomenda-se que as polinizações manuais na espécie sejam realizadas nos horários das 04h às 10h.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU,P. P.; SOUZA,M.M.; SANTOS,E.A.; PIRES,M.V. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil**. Euphytica**.166: 307-315. 2009.

AKAMINE, E.K.; GIROLAMI, D.G. **Pollination and fruit set in yellow passion fruit**. Havaí: **Hawaii Agric. Exp. Sta.** (Tech. Bull. nº 39). 1959. 44 p.

ALEXANDER, M.P. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. Baltimore. **Stain Technology**.55: 13-18. 1980.

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.A.; NUNES, T.S.; IMIG, D.C.; MEZZONATO, A.C. Passifloraceae in. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>. Acesso em: 11, dezembro, 2014.

BUENO, D. M.; CAVALCANTE, K. L. **Estudo da viabilidade de grãos de pólen de flores de melão (*Cucumis melo* L.).** Fortaleza, Ceará. 2001.

BLEICH, M. E.; ROBOREDO, D.; SILVA, E. P.; BERGAMASCO, S. M. P. P. Caracterização limnológica de riachos de cabeceira em Alta Floresta-MT: subsídios para avaliação da eficácia de ações de recuperação de áreas ripárias degradadas. In: Simpósio processos ecológicos, eestauração e ecovaloração em Zonas Ripárias. **Anais.** Brasília, AQUARIPÁRIA/UnB/EMBRAPA.Versão eletrônica. 2012. 35p.

BRITTO, F.F. **Progênies híbridas de maracujazeiros do cruzamento de *Passiflora cincinnata* Mast. X *Passiflora Quadrangularis* Linn.** Vitória da Conquista, Bahia**.** Universidade do Sudoeste da Bahia. 2013. 99p. (Dissertação-Mestrado em Agronomia).

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

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: diversidade genética. Viçosa: UFV. 2008. 278p.

DAFNI, A. **Pollination ecology: a pratical approach**. New York: Oxford University Press. 1992.250p.

DAFNI, A.; MAUÉS, M. M. A rapid and simple procedure to determine stigma receptivity. **Sexual Plant Reproduction**. 11:177-180. 1998.

DUARTE, M. O. ; ALVES, M. F. ; SILVA, L. O.; YAMAMOTO, M.; BARBOSA, A. A. A.; OLIVEIRA, P. E. A. M. DE; SANO, S. M. Biologia Reprodutiva de três espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) em Uberlândia, MG, Brasil. In**:** IX Congresso de Ecologia do Brasil, 9, São Lourenço (MG).**Anais .**São Lourenço, CD. 2009.

FARIA, F.S; STEHMANN, J.R. Biologia reprodutiva de Passiflora capsularis L. e Passiflora pohlii mast. (Decaloba, Passifloraceae). **Acta botânica brasileira**. 24: 262-269. 2010.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4.6 Sistema de Análises Estatísticas**. Lavras: UFLA, 2003.

FERREIRA, F. R. Germoplasma de *Passiflora* no Brasil. In: SÃO JOSE, A. R. (Ed.) **Maracujá: produção e mercado. Vitória da Conquista:** Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 1994. p. 24-26.

FONSECA, J. W. S.; BELO, G. de O.; ROZA, F. A.; CRUZ, T,V,. VIANA, A J. C.; SOUZA, M. M. Receptividade do estigma e polinização in vivo, associada ás características do fruto em espécies silvestres de P*assiflora* como subsídio para programas de hibridação. In:SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA DA UESC, Ilhéus, BA. **Resumo.** p.118-119. 2005.

FREITAS, E. J. **Reprodutiva e germinação de *Passiflora cristalina* Vanderpl. & Zappi em fragmentos florestais no perímetro urbano do município de Alta Floresta-MT**. Alta Floresta, Mato Grosso. Universidade do Estado de Mato Grosso. 2010. 73p.(Monografia-Graduação em Licenciatura plena em Ciências biológicas).

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos.** Ribeirão Preto: Ed. Funpec. 2002. 131p.

HOFFMANN, M. Polinização do maracujá amarelo *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. In: MANICA, I. (Ed.). **Maracujá:** temas selecionados.Porto Alegre: Cinco Continentes.1997. p. 58-70.

IBGE INSTITUTO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Manual técnico da vegetação brasileira.** 2. ed. Rio de Janeiro: Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais/IBGE.2012. 271p.

KEARNS, C. A.; INOUYE, D. W. **Techniques for pollination biologists.** Niwot, Colorado: University Press. 1993. 559p.

KÖPPEN,W. **Das geographische system der Klimate.** Handbuch de klimatologie, bortraeger, Berlim, 1938.44p.

KRISHNAKUMAR, M. P.; VALSALAKUMARI, P. K.; ARAVINDAKSHAN, M. Pollen production, fertility and viability in different nodes of the banana cultivars. **Agricultural Research**. 30:53-57. 1992.

LOUREIRO, R.L.; DIAS, A.A.; MAGNAGO, H. Vegetação. In: RADAMBRASIL. Levantamento de Recursos Naturais, Folha Sc. 21 Juruena - Rio de Janeiro MME. 1980. p.325- 376.

MAUÉS, M. M.; COUTURIER, G. Biologia floral e fenologia reprodutiva do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh, Myrtaceae) no Estado Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. 25: 441-448. 2002.

MENZEL, C.M.; WINKS, C.W.; SIMPSON, D.R. Passion fruit in Queensland.3. Orchard management. Brisbane.**Queensland Agricultural Journal**. 115:155-164. 1989.

OCAMPO, J.P.; COPPENS, D.G.; RESTREPO, M.; JARVIS, A; SALAZAR, M.; CAETANO, C. **Diversity of colombian Passifloraceae: biogeography and an updated list for conservation**. Biota Colombiana. 2007. p.1-45.

PAGLIARINI, M. S., POZZOBON, M. T. II **Curso de citogenética aplicada a recursos genéticos vegetais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Distrito Federal. 2004.

PREFEITURA MUNICIPAL DE ALTA FLORESTA. **Estado de Mato Grosso**. 2013. Disponível em: http://www.altafloresta.mt.gov.br/geografia/ Acesso em: 20 de dezembro de 2013.

RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A. R.; VOLPE, C. A.; OLIVEIRA, J. C.; DURIGAN, J. F.; BAUMGARTNER, J. G.; SILVA, J. R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M. E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V. P. **Maracujá para exportação:** aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA-SPI.1996.64p.

SANTOS, L.F., OLIVEIRA, E.J., SILVA, A.S., CARVALHO, F.M., COSTA, J.L., PÁDUA, J.G. ISSR markers as a tool for the assessment of genetic diversity in Passiflora. **Biochemical genetics**. 49: 540-554. 2011.

SAZIMA, I.; SAZIMA, M. Bat pollination of the passion flower, *Passiflora mucronata*, in southeastern Brazil. **Biotropica**. 10:100-109. 1978.

SEPLAN. **Zoneamento sócio-econômico-ecológico do Estado de Mato Grosso.** Cuiabá: Secretaria do Planejamento, 2000. 300p.

SILVA, L. M. M.;AGUIAR, I. B.; VIÉGAS, R. A.; MENDONÇA, I. F. C. Biologia Reprodutiva de *Cnidosculus juercifolius* Pax & K. Hoffm (Euphorbiceae**). Revista de biologia e ciências da terra**. 6: 1-10. 2006.

SILVEIRA, G. F.; **Sistema reprodutivo de duas espécies de *Passiflora* nativas da Amazônia Meridional**. Alta Floresta- Mato Grosso, Universidade do Estado de Mato Grosso. 2012.40p. (Monografia-Licenciatura em Ciências Biológicas).

SIQUEIRA, K. M. M.; KIILL; L. H. P.; C. F. M.; LEMOS; I. B.; MONTEIRO; S. P.; FEITOZA, E. de A.. Ecologia da polinização do maracujá-amarelo, na região do vale do submédio São Francisco. Jaboticabal.**Revista Brasileira de Fruticultura**. 31: 1-12. 2009.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* sims f. flavicarpa degener). Lavras.**Ciência e agrotecnologia**. 26:1209-1217. 2002.

SOUZA, M. M., PEREIRA, T. N. S., VIANA, A. P., PEREIRA, M. G., AMARAL JR., A. T. E MADUREIRA, H. C. Flower receptivity and fruit characteristics associated to time of pollination in the yellow passion fruit *Passiflora edulis* Sims f. flavicarpa Degener (Passifloraceae). **Scientia Horticulturae**.101:373-385. 2004.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. **Passiflora - Passion flowers of the world. Portland, Timber Press.** 2004.

TECHIO, V. H. **Meiose e análise genômica em *Pennisetum* spp. Lavras. Universidade Federal de Lavras**. 2002. 104p. (Tese-Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).

VANDERPLANK. J.; ZAPPI, D. *Passiflora cristalina*, a striking new species of Passiflora (Passifloraceae) from Mato Grosso, Brazil. **Kew Bulletin**. 66: 149-153 . 2011.

VASCONCELLOS, M.A.S.; CEREDA, E.; ANDRADE, J.M.B.; BRANDÃO FILHO, J.U.T. Desenvolvimento de frutos do maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Dryand), nas condições de Botucatu-SP. Cruz das Almas. **Revista Brasileira Fruticultura**. 15: 153-158.1994.

VARA PRASAD, P.V.; Craufurd, P.Q.; e Summerfield, R.J.; Fruit number in relation to pollen production and viability in Groundnut exposed to short episodes of heat stress. **Annals of Botany**. 84: 381-386.1999.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. **Botânica – Organografia**: Quadros sinóticos ilustrados de fanerógamos 4ª ed. UFV, 2000.

ZEISLER, M. Über die Abgrenzung der eigentlichen Narbenfläche mit Hilfe von Reaktionen. Cassel.**Beihefte zum Botanische Zentralblatt**. 58: 308-318, 1938.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Os marcadores SSR e os marcadores morfológicos foram eficientes no estudo da variabilidade genética dos genótipos de *P. cristalina*, com contribuição importante na caracterização da diversidade. A avaliação do potencial reprodutivo e diversidade genética desses genótipos em populações naturais contribuirá para a elaboração de ações que visem a conservação e o uso de forma mais eficiente deste recurso genético.

A diversidade genética de *P. cristalina* apresentou uma maior variabilidade genética a nível intrapopulacional do que interpopulacional, o que pode estar correlacionado com o sistema de reprodução da espécie.

As características morfológicas de maior contribuição para a variabilidade genética dos genótipos de *P. Cristalina* foram: peso fresco do fruto, comprimento do estigma, comprimento dos filamentos da corona, largura do fruto, largura da pétala e peso da polpa. Portanto, estes caracteres são considerados os mais responsivos para a seleção de genótipos da espécie em estudo.

A espécie apresentou um alto percentual de viabilidade polínica e receptividade estigmática independente da fase floral avaliada, exceto para o horário das 13h, onde houve um decréscimo tanto para a viabilidade polínica quanto para a receptividade estigmática. Com base nos resultados de viabilidade polínica e receptividade do estigma, recomenda-se que as polinizações manuais na espécie sejam realizadas entre as 04h e 10h.

Portanto, tais estudos são de extrema importância para a conservação, caracterização e prospecção da espécie, uma vez que a *P. Cristalina* é uma espécie ainda não domesticada, descrita recentemente e pouca estudada.