

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

PAULA MAURI BERNARDES

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA, MOLECULAR E FITOQUÍMICA DE
ESPÉCIES DO GÊNERO *Passiflora***

ALEGRE - ES

2018

PAULA MAURI BERNARDES

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA, MOLECULAR E FITOQUÍMICA DE
ESPÉCIES DO GÊNERO *Passiflora***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Produção Vegetal, na área de concentração em Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira.

ALEGRE, ES

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial Sul, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

B521c Bernardes, Paula Mauri, 1987-
Caracterização agrônômica, molecular e fitoquímica de espécies do
gênero Passiflora / Paula Mauri Bernardes. – 2018.
141 f. : il.

Orientador: Marcia Flores da Silva Ferreira.
Coorientadores: Adesio Ferreira ; Rodrigo Sobreira Alexandre.
Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do
Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Passiflora. 2. Marcadores biológicos. 3. Frutas – Cultivo. I.
Ferreira, Marcia Flores da Silva. II. Ferreira, Adesio. III. Alexandre,
Rodrigo Sobreira. IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
de Ciências Agrárias e Engenharias. V. Título.

CDU: 63

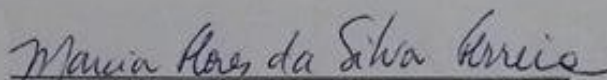
Bibliotecária: Lizzie de Almeida Chaves – CRB-6 ES-000871/O

**CARACTERIZAÇÃO AGRONÔMICA, MOLECULAR E FITOQUÍMICA DE
ESPÉCIES DO GÊNERO *Passiflora***

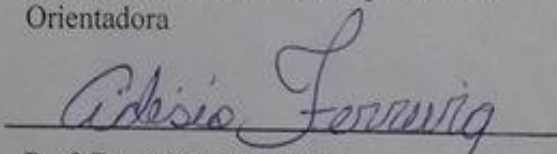
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Produção Vegetal.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2018.

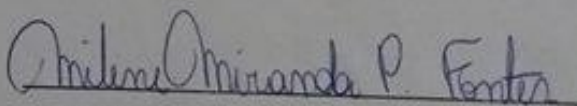
COMISSÃO EXAMINADORA



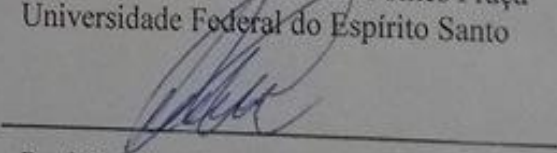
Prof.^a Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora



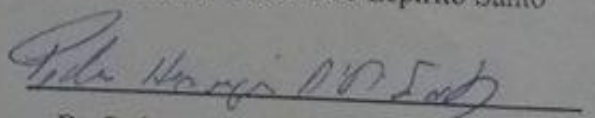
Prof. Dr. Adésio Ferreira
Universidade Federal do Espírito Santo
Coorientador



Prof.^a Dra. Milene Miranda Fontes Praça
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. José Carlos Lopes
Universidade Federal do Espírito Santo



Dr. Pedro Henrique Araújo Diniz Santos
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Dedico este trabalho a mim mesma, por todo esforço e força de vontade em continuar o doutorado. Dedico à minha mãe por toda paciência e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, saúde e por me dar sabedoria para enfrentar as dificuldades, principalmente me mostrando as saídas, que eu não conseguia enxergar;

A minha mãe e meu irmão, pela dedicação e por me apoiarem nessa caminhada, principalmente, me sustentando nos momentos mais difíceis, aguentando o meu estresse;

Ao meu pai pelo apoio em continuar meus estudos e pelo apoio financeiro quando necessitei para viagens devido ao meu trabalho de tese;

Aos meus familiares por sempre apoiarem meus estudos, fase muito importante em minha vida. Em especial à minha vó Tereza que transmite uma força de vontade de viver imensa e muita fé;

À minha orientadora, Marcia Flores da Silva Ferreira pelos ensinamentos e contribuições feitas durante essa jornada de trabalho. Aprendi e cresci muito, profissionalmente e pessoalmente, convivendo com ela;

Ao Prof. Adésio Ferreira, por sempre me ajudar nos momentos que necessitei, principalmente na estatística e por todo ensinamento e contribuições durante esses anos de convívio;

Ao Prof. José Carlos Lopes sempre disposto a ajudar no que era preciso e sempre com um incentivo, que nos motiva a continuar a caminhada;

À Prof. Milene M. Fontes Praça por aceitar a participar da minha banca e por estar sempre disposta a ajudar e repassar seu conhecimento. E, a Thammyres por toda ajuda no preparo e na montagem do experimento, como na avaliação, com muito boa vontade de ajudar;

Ao Pós-doutorando Pedro Henrique Araújo Diniz Santos por aceitar participar da banca e repassar suas sugestões;

Ao Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal;

Aos colegas do Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas e do Laboratório de Biometria, por todos os momentos de alegria compartilhados. Em especial: a José Henrique, Tiago Souza, Lucas, Hiago, Cintia, Bia, Catariny, Sephora, Soninha e ao Ramon por terem ajudado na implementação do experimento, nas avaliações do experimento e nas análises laboratoriais;

Aos meus amigos Abel, Sara, Sebastião Vinicius, Lucimara, Carol, Marjorie, Lucas, Marlla, Vitão, Ariany, Paulo, Micheli e Kelly, que foram feitos durante o período mais

estressante e alegre da minha vida, por compartilhar comigo momentos de alegria e descontração;

Ao CNPq pela concessão da bolsa durante esses quatro anos de doutorado.

“Toda pessoa deve ser aplaudida de pé
pelo menos uma vez na vida, porque
todos nós vencemos o mundo”

Extraordinário

RESUMO

O gênero *Passiflora* é composto por 17 gêneros e 630 espécies aproximadamente, com potencial farmacológico, ornamental, industrial e alimentício. A cultura do maracujá vem ganhando mercado no setor da fruticultura, por apresentar rápida produção, retorno econômico e renda aos agricultores. Além das espécies cultivadas, existem as espécies silvestres, que vêm ganhando enfoque por possuir características desejáveis para programas de melhoramento. O conhecimento da diversidade genética entre as espécies de maracujá pode ser realizado de forma multidisciplinar envolvendo técnicas moleculares, agronômicas, citogenéticas, taxonômicas e químicas. Objetivou-se neste trabalho caracterizar as espécies silvestres e comerciais do gênero *Passiflora* utilizando caracteres agronômicos, moleculares e fitoquímicos, gerando informações que agreguem conhecimento e orientem estudos de melhoramento, conservação, identificação e utilização. Com relação ao desempenho vegetativo e reprodutivo das espécies, foram realizados dois experimentos em delineamento em blocos casualizados para 38 espécies, e foram avaliadas as características de crescimento vegetativo e físico-química dos frutos. Na análise de transferibilidade foi usado 44 microssatélites desenvolvidos para *P. edulis* e *P. alata*, em 26 espécies de *Passiflora* pertencentes a Mata Atlântica colhidas no Espírito Santo. Na análise de diversidade genética foram usados nove microssatélites em 150 indivíduos, e foi calculado os valores de PIC: conteúdo de informação polimórfico; H₀: heterozigosidade observada; FM: frequência máxima; NA: número de alelo; %A: porcentagem de perda de alelos. Na caracterização fitoquímica foram utilizados extratos aquoso e clorofórmico de dez espécies de *Passiflora* e realizada ressonância magnética nuclear (RMN) usando o Espectro Bruker Avance III de 500 MHz. Para os testes macroscópicos e microscópicos foram colocadas para germinar 30 sementes de *Lactuca sativa* em contato com as infusões nas concentrações: C4: 100mg/mL; C3: 50 mg/mL-1; C2: 25 mg/mL-1; C1: 12,5 mg/mL-1, e como controle negativo (Co⁻) água destilada e controle positivo (Co⁺) o Picloram. O resultado demonstrou que o híbrido BRS gigante amarelo apresentou as maiores médias para diâmetro do ramo ortotrópico, largura da folha para os ramos ortotrópico e plagiotrópico e não diferiu estatisticamente de BRS Rubi do cerrado, BRS Pérola do cerrado e de *P. alata* para comprimento de entre nó. No experimento II as espécies não diferiram para as variáveis comprimento dos ramos ortotrópico e plagiotrópico; diâmetro do ramo ortotrópico e número de ramos plagiotrópicos. As espécies dentro e entre experimentos apresentaram similaridades no comportamento de crescimento acumulado, no período de florescimento e frutificação. Para as características de peso do fruto, peso da polpa e diâmetro transversal houve diferenças significativas entre as espécies, e não houve diferença entre as espécies para acidez titulável e vitamina C. O agrupamento formado pelos dados de transferibilidade para as 26 espécies permitiu a formação de grupos de acordo com as espécies pertencentes aos subgêneros. A árvore de regressão multivariada demonstrou que são necessários 14 *loci* microssatélites para identificar as 26 espécies do gênero. Os locus PE88, PA05 e PA08 foram os mais conservados para as espécies. Os valores médios de PIC variaram de 0.10 a 0.69; H₀: 0.12 a 0.73; FM: 0.39 a 0.89; NA: 1.33 a 7. A técnica de RMN permitiu identificar glicose, frutose, sacarose, sacarose, colina, alanina, glicina, triptofano, asparagina, treonina e compostos fenólicos para o extrato aquoso. No extrato clorofórmico verificou a presença de flavonoides, alcaloides, taninos, lactonas, saponinas, ácidos graxos e compostos do grupo aldeído. No teste macroscópico e microscópico as infusões causaram danos nas maiores concentrações para germinação, crescimento radicular e índice mitótico, quando comparados ao controle negativo. E, houve um aumento das alterações cromossômicas e nucleares nas maiores concentrações. Observou-se que as

espécies estudadas apresentam características químicas e físicas desejáveis para o mercado consumidor e estão de acordo com a legislação brasileira, e houve diversidade genética entre elas. Os dados de transferibilidade usando microssatélites permitiram separar as espécies de acordo com os subgêneros, isto demonstra a existência de marcadores conservados nas espécies de *Passiflora*. E, este marcador também permitiu verificar diversidade genética existente entre as espécies estudadas. O espectro do extrato aquoso demonstrou três regiões principais: açúcares, aminoácidos e dos compostos fenólicos. Os flavonóides e ácidos graxos foram encontrados em todas as espécies, e o alcalóide apenas em BRS gigante amarelo de acordo com os espectros do extrato clorofórmico. As infusões das dez espécies causaram efeitos fitotóxicos, citotóxicos e genotóxicos nas raízes de *Lactuca sativa* nas análises macro e microscópicas, sendo mais frequentes nas maiores concentrações. Essas alterações podem estar relacionadas com a presença de compostos fenólicos. Assim, conclui-se que as análises usadas permitiram diferenciar as espécies de acordo com as características agronômicas, moleculares e fitoquímicas. Isto permite que essas espécies possam ser usadas nas áreas de melhoramento vegetal, de conservação e na farmacêutica por conter compostos que possuem efeitos terapêuticos.

Palavra-chaves: Passifloracea, marcador molecular, caracterização vegetativa; toxicidade.

Abstract

The genus *Passiflora* is composed of 17 genera and 630 species approximately, with pharmacological, ornamental, industrial and alimentary potential. The passion fruit culture has been gaining market in the sector of the fruit cultivation, because of its fast production, economic return and income to the farmers. In addition to the cultivated species, there are wild species, which have gained focus because they have desirable characteristics for breeding programs. The knowledge of genetic diversity among passion fruit species can be carried out in a multidisciplinary way involving molecular, agronomic, cytogenetic, taxonomic and chemical techniques. The objective of this work was to characterize the wild and commercial species of the *Passiflora* genus using agronomic, molecular and phytochemical characters, generating information that aggregates knowledge and guide studies of breeding, conservation, identification and utilization. Regarding the vegetative and reproductive performance of the species, two experiments were carried out in a randomized block design for 38 species, and the vegetative growth and physicochemical characteristics of the fruits were evaluated. In the transferability analysis, 44 microsatellites developed for *P. edulis* and *P. alata* were used in 26 *Passiflora* species belonging to the Atlantic Forest harvested in Espírito Santo. In the analysis of genetic diversity, nine microsatellites were used in 150 individuals, and the values of PIC were calculated: polymorphic information content; H₀: observed heterozygosity; FM: maximum frequency; NA: allele number; %A: percentage of allele loss. In the phytochemical characterization, aqueous and chloroform extracts of ten *Passiflora* species were used and nuclear magnetic resonance (NMR) was performed using the 500 MHz Bruker Avance III Spectrum. For macroscopic and microscopic tests, 30 seeds of *Lactuca sativa* were germinated in contact with infusions at concentrations: C4: 100mg / mL; C3: 50 mg / mL⁻¹; C2: 25 mg / mL⁻¹; C1: 12.5 mg / mL⁻¹, and as negative control (Co⁻), distilled water, and positive control (Co⁺), Picloram. The results showed that the yellow giant BRS hybrid presented the highest averages for diameter of the orthotropic branch, leaf width for the orthotropic and plagiotropic branches and did not differ statistically from BRS Rubi from cerrado, BRS Pérola from cerrado and from *P. alata* for plant internode length. In experiment II the species did not differ for the variables length of the orthotropic and plagiotropic branches; diameter of the orthotropic branch and number of plagiotropic branches. The species inside and between experiments showed similarities in the behavior of accumulated growth, in the period of flowering and fruiting. For fruit weight, pulp weight and transverse diameter characteristics, there were significant differences between species, and there was no difference between the species for titratable acidity and vitamin C. The grouping formed by the transferability data for the 26 species allowed the formation of groups according to the species belonging to the subgenera. The multivariate regression tree demonstrated that 14 microsatellite loci are required to identify the 26 species of the genus. The PE88, PA05 and PA08 locus were the most conserved for the species. Average values of PIC ranged from 0.10 to 0.69; H₀: 0.12 to 0.73; FM: 0.39 to 0.89; NA: 1.33 to 7. The NMR technique allowed the identification of glucose, fructose, sucrose, choline, alanine, glycine, tryptophan, asparagine, threonine and phenolic compounds for the aqueous extract. In the chloroform extract, the presence of flavonoids, alkaloids, tannins, lactones, saponins, fatty acids and aldehyde compounds were detected. In the macroscopic and microscopic test the infusions caused damages in the highest concentrations for germination, root growth and mitotic index, when compared to the negative control. And, there was an increase in chromosomal and nuclear changes at the highest concentrations. It was observed that the species studied present desirable chemical and physical characteristics for the consumer market and are in accordance with the Brazilian

legislation, and there was genetic diversity among them. The transferability data using microsatellites allowed to separate the species according to the subgenus, this shows the existence of conserved markers in the species of *Passiflora*. And, this marker also allowed to verify existing genetic diversity among the studied species. The spectrum of the aqueous extract showed three major regions: sugars, amino acids and phenolic compounds. Flavonoids and fatty acids were found in all species, and the alkaloid only in yellow giant BRS according to the spectra of the chloroform extract. The infusions of the ten species caused phytotoxic, cytotoxic and genotoxic effects on the roots of *Lactuca sativa* in the macro and microscopic analyzes, being more frequent in higher concentrations. These changes may be related to the presence of phenolic compounds. Thus, it was concluded that the analyzes used allowed to differentiate the species according to the agronomic, molecular and phytochemical characteristics. This allows these species to be used in the plant breeding, conservation and pharmaceutical areas because they contain compounds that have therapeutic effects.

Key words: Passifloracea, molecular marker, vegetative characterization; toxicity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - Desempenho vegetativo e reprodutivo de espécies do gênero <i>Passiflora</i>	35
Figura 1. Curva de crescimento vegetativo acumulado do ramo ortotrópico até a data da poda (A e B), e período de florescimento (FL) e frutificação (FR) durante um ano (B; D) dos híbridos comerciais (BRS Gigante Amarelo; BRS Rubi do Cerrado; BRS Pérola do Cerrado) e espécies silvestres (<i>P. suberosa</i> ; <i>P. alata</i> ; <i>P. maliformis</i> ; <i>P. foetida</i> ; <i>P. cincinnata</i> ; <i>P. quadrangularis</i> ; <i>P. mucronata</i>)	50
Figura 2. Agrupamentos de três espécies comerciais e silvestres do gênero <i>Passiflora</i> quanto ao período de florescimento e frutificação	51
Figura 3. Número total de frutos (A) para <i>Passiflora suberosa</i> ; <i>Passiflora alata</i> ; BRS Gigante Amarelo; BRS Rubi do Cerrado; BRS Pérola do Cerrado; Número total de frutos (B) para <i>P. maliformis</i> ; <i>P. foetida</i> ; <i>P. mucronata</i> e BRS Rubi do Cerrado. Peso dos frutos para as espécies (C) para <i>Passiflora suberosa</i> ; <i>Passiflora alata</i> ; BRS Gigante Amarelo; BRS Rubi do Cerrado; Peso dos frutos (D) para <i>P. maliformis</i> ; <i>P. foetida</i> ; <i>P. mucronata</i>	52
Figura 4. Agrupamento UPGMA obtido a partir da análise de dez microssatélites das espécies comerciais (BRS Gigante Amarelo, Rubi do Cerrado e <i>P. setacea</i>) e silvestres (<i>P. suberosa</i> , <i>P. alata</i> , <i>P. maliformis</i> , <i>P. foetida</i> , <i>P. cincinnata</i> , <i>P. quadrangularis</i> , <i>P. mucronata</i>) do gênero <i>Passiflora</i>	53
CAPÍTULO 2: Diversidade genética de espécies do gênero <i>Passiflora</i>	71
Figura 1. Mapa de ocorrência das espécies de <i>Passiflora</i> e <i>Mitostemma</i> no Estado do Espírito Santo	74
Figura 2. Heatmap gerado a partir de 44 SSR em 26 espécies de <i>Passiflora</i> . Preenchimento em vermelho é amplificação e em verde, não amplificação.	82
Figura 3. Árvore de regressão multivariada de 26 espécies do gênero <i>Passiflora</i> dos dados de transferibilidade. As espécies são representadas por cap: <i>P. capsularis</i> ; por: <i>P. porophylla</i> ; con: <i>P. contracta</i> ; sp4: <i>P. sp4</i> ; muc: <i>P. mucronata</i> ; med: <i>P. mediterrânea</i> ; ame: <i>P. amethystina</i> ; spe: <i>P. speciosa</i> ; mis: <i>P. misera</i> ; speb: <i>P. speciosa b</i> ; sp17: <i>P. sp17</i> ; jun: <i>P. junqueirae</i> ; sid: <i>P. sidifolia</i> ; rha: <i>P. rhamnifolia</i> ; sub: <i>P. suberosa</i> ; porb: <i>P. porophylla b</i> ; sp1: <i>P. sp1</i> ; sp8: <i>P. sp8</i> ; ala: <i>P. alata</i> ; sp19: <i>P. sp19</i> ; vel: <i>P. velozii</i> ; rac: <i>P. racemosa</i> ; ker: <i>P. kermesina</i> ; edu: <i>P. edulis</i>	84
CAPÍTULO 3: <i>Fingerprint</i> de extratos de folhas de <i>Passifloras</i> e toxicidade de infusões em <i>Lactuca sativa</i> L	100
Figura 1. Identificação da sacarose para espécie <i>P. setacea</i> . P1: sacarose; P2: sacarose; P3: água e P4: glicose	110
Figura 2. Espectro de 1HRMN da espécie BRS gigante amarelo da região pertencente dos alcaloides e flavonoide (1 e 2) e ácidos graxos insaturados (3)	111
Figura 3. Espectro de ¹ HRMN da espécie <i>P. suberosa</i> da região pertencentes aos compostos com função de aldeído	111
Figura 4. Alterações microscópicas observadas em células meristemáticas de raízes de	115

Lactuca sativa tratadas com extratos aquosos de folhas das espécies do gênero *Passiflora*, com quatro concentrações cada, e controles negativo (Co⁻: água destilada) e positivo (Co⁺: picloran)

Figura 5. Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* tratadas com extratos aquosos de folhas de espécies do gênero *Passiflora*, com quatro concentrações cada, e controles negativo (Co⁻: água destilada) e positivo (Co⁺: picloran) 116

Figura 6. Alterações nucleares observadas em células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* tratadas com infusões aquosas de folhas de espécies do gênero *Passiflora*, com quatro concentrações cada, e controles negativo (Co⁻: água destilada) e positivo (Co⁺: picloran) 116

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - Desempenho vegetativo e reprodutivo de espécies do gênero <i>Passiflora</i>	34
Tabela 1. Descrição da montagem dos experimentos I e II com as espécies, época de plantio e avaliação, delineamento experimental	40
Tabela 2. Descrição das espécies comerciais e silvestres do gênero <i>Passiflora</i>	43
Tabela 3. Média das variáveis de crescimento vegetativo de espécies silvestres e dos híbridos comerciais do gênero <i>Passiflora</i> , realizado na cidade de Alegre - ES na área experimental do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo, no ano de 2016 a 2017	46
Tabela 4. Médias da caracterização física e química dos frutos das espécies nativas e comerciais do gênero <i>Passiflora</i> , realizadas na cidade de Alegre - ES na área experimental do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo, no ano de 2016 a 2017	53
CAPÍTULO 2: Diversidade genética de espécies do gênero <i>Passiflora</i>	70
Tabela 1. Espécies de <i>Passiflora</i> pertencentes a cada subgênero com seus respectivos números cromossômicos e quantidade de indivíduos por local de coleta no Espírito Santo	77
Tabela 2. Análise descritiva para os 150 indivíduos de 19 espécies do gênero <i>Passiflora</i>	84
Tabela 3. Análise descritiva para os subgêneros <i>Passiflora</i> , <i>Decaloba</i> e <i>Astrophea</i> . O número de indivíduos e as espécies pertencentes a cada subgênero encontra-se na Tabela 1	86
Tabela 4. Análise descritiva para duas populações das espécies <i>P. alata</i> , <i>P. amethystina</i> , <i>P. kermesina</i> , <i>P. porophylla</i> e <i>P. speciosa</i>	88
CAPÍTULO 3: <i>Fingerprint</i> de extratos de folhas de Passifloras e toxicidade em <i>Lactuca sativa</i> L	99
Tabela 1. <i>Fingerprints</i> dos extratos aquoso e clorofórmicos das dez espécies do gênero <i>Passiflora</i>	108
Tabela 2. Quantidade (mg do composto mg ⁻¹ da amostra) de metabolitos primários encontrados nas espécies de <i>Passiflora</i>	109
Tabela 3. Parâmetros fitotóxicos avaliados em sementes de <i>Lactuca sativa</i> tratadas com extratos aquoso de espécies do gênero <i>Passiflora</i> , com quatro concentrações cada, e controles negativo (água destilada) e positivo (picloran)	113

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	18
OBJETIVO GERAL.....	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
REFERÊNCIA.....	27
CAPÍTULO 1: Desempenho vegetativo e reprodutivo de espécies do gênero <i>Passiflora</i>.....	35
INTRODUÇÃO.....	39
MATERIAL E MÉTODOS.....	41
RESULTADOS.....	46
DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIA.....	63
CAPÍTULO 2: Diversidade genética de espécies do gênero <i>Passiflora</i>.....	71
INTRODUÇÃO.....	73
MATERIAL E MÉTODOS.....	77
ÁREA DE ESTUDO.....	77
ANÁLISE MOLECULAR.....	77
ANÁLISE DE TRANSFERIBILIDADE.....	77
ANÁLISE DE GENÉTICA DE POPULAÇÕES.....	77
EXTRAÇÃO DE DNA E PCR.....	79
ARVORE DE REGRESSÃO MULTIVARIADA.....	79
ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	80
RESULTADOS.....	81
TRANSFERIBILIDADE.....	81
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES VIA MICROSSATÉLITES.....	83
ANÁLISE DE LOCI MICROSSATELITE CONSERVADO ENTRE ESPÉCIE E SUBGÊNERO.....	85
ANÁLISE ENTRE E DENTRO POPULAÇÕES DE UMA ESPÉCIE.....	88
DISCUSSÃO.....	90
CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIA.....	95
CAPÍTULO 3: Fingerprint de extratos de folhas de <i>Passifloras</i> e toxicidade de infusões em <i>Lactuca sativa</i> L.....	100
INTRODUÇÃO.....	102

MATERIAL E MÉTODOS.....	105
MATERIAL VEGETAL.....	105
RESSONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DOS EXTRATOS AQUOSO E CLOROFÓRMICO DAS FOLHAS DAS ESPÉCIES DE PASSIFLORA.....	105
PREPARO DAS INFUSÕES DAS FOLHAS DAS ESPÉCIES DE <i>Passiflora</i> PARA AVALIAÇÃO FITOTOXICA.....	106
TESTE MACROSCÓPICO.....	106
TESTE MICROSCÓPICO.....	106
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	107
RESULTADOS.....	107
FINGERPRINT DOS EXTRATOS AQUOSO E CLOROFORMICO DAS FOLHA DE <i>Passiflora</i> PELA ANÁLISE DE RMN...	107
ANÁLISES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS.....	111
DISCUSSÃO.....	117
FINGERPRINT DOS EXTRATOS AQUOSO E CLOROFORMICO DAS FOLHA DE <i>Passiflora</i> PELA ANÁLISE DE RMN...	117
ANÁLISES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS.....	119
CONCLUSÃO.....	122
REFERÊNCIA.....	123
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	130
ANEXO I.....	131
ANEXO II.....	134
APÊNDICE I.....	137
APÊNDICE II.....	138
APÊNDICE III.....	140

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Importância das espécies do gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* L. pertence à família Passifloraceae, sendo considerado como o maior representante em número de espécies, além de apresentar uma grande variação nas formas morfológicas. (FREITAS, 2011). No entanto, o Brasil contém uma vasta distribuição geográfica das espécies da família, apresentando cerca de 150 espécies conhecidas, distribuídas em quatro gêneros: *Ancistrothyrsus* Harms, *Dilkea* Mast, *Mitostemma* Mast e *Passiflora*. (BERNACCI et al. 2014). Um total de 141 espécies pertencem ao gênero *Passiflora*, das quais 82 são endêmicas no bioma Floresta Atlântica (Flora do Brasil 2020 em construção). Algumas dessas espécies possuem frutos comestíveis e podem ser consumidas *in natura*, em forma de farinhas de casca e sementes, chás e suco da polpa. Sendo que, as espécies que possuem maior interesse econômico são *P. edulis* fo. *flavicarpa* O. Deg., *P. alata* Curtis e *P. edulis* fo. *Edulis*. (RUGGIERO, 1987).

A fruticultura brasileira é um dos segmentos da economia que vem se destacando e crescendo nos últimos anos, e ainda assim continua em expansão, tanto em relação à produção de frutas para consumo *in natura* como na industrialização, que representa mais de 47% do consumo de frutas. (IBRAF 2016). Além do mais, a fruticultura também tem papel importante nos aspectos socioeconômicos, por gerar emprego e renda, devido à necessidade de mão de obra nessa área. (SILVA, 2016).

A cultura do maracujá é uma dentre as frutíferas que se destaca no país, por ser considerada como uma alternativa agrícola para produtores de agricultura familiar pelo rápido retorno econômico. (MELETTI, 2011). Entretanto, o maracujazeiro também se destaca pela qualidade de seus frutos, e estes serem ricos em vitaminas (A e C), sais minerais e apresentar propriedades farmacológicas. (LIMA, 2002).

O Brasil é o maior produtor de maracujá, com uma produção de 838.244 toneladas na safra 2013/2014, em uma área colhida de 57.277 hectares, com produtividade média de 14,63 t ha⁻¹. As principais regiões produtoras de maracujá no Brasil são Nordeste e Sudeste, sendo a região Nordeste responsável por mais de 74% da produção nacional, com destaque para os estados da Bahia e Ceará. (IBGE, 2014). O avanço na cultura do maracujazeiro, está relacionado com a melhoria nas lavouras, isso é devido ao avanço tecnológico como melhoria no sistema de produção, melhoria na genética de materiais

cultivados que proporcionaram maiores ganhos na produtividade e desempenho agrônômico. (FALEIRO et al., 2011).

A expansão da cultura proporcionou aumento de doenças, as quais prejudicam a qualidade do fruto, produtividade e longevidade, reduzindo o valor comercial (FALEIRO et al., 2011), e essas doenças são causadas por fungos, bactérias e vírus. Além das doenças a cultura também sofre com veranicos e excesso de precipitação, que comprometem o seu rendimento. (KRAUSE et al., 2010). Devido a esses problemas, é necessário manter genótipos resistentes para serem usados em programas de melhoramento. Desta forma, pode-se destacar o uso de espécies silvestres que possuem as seguintes características: resistências a doenças, longevidade, autocompatibilidade, melhor adaptação em condições climáticas adversas, maior período de florescimento, androginóforo mais curto e maior quantidade de compostos químicos. (MELETTI et al. 2005; JUNQUEIRA et al. 2005).

As espécies silvestres apresentam grande potencial para serem usadas em programas de melhoramento e como porta-enxertos (JUNQUEIRA et al., 2005), bem como podem ser usadas para melhorar as características físico-químicas da polpa, para que possam ser comercializadas como novas opções no mercado, para fruta exótica ou para melhorar as características funcionais (FALEIRO et al., 2015) desse gênero. Para que se possa aproveitar o potencial dessas espécies, que são de grande importância, são necessários estudos de caracterização, domesticação, melhoramento genético, documentação, divulgação e marketing. (FALEIRO et al., 2011).

As espécies silvestres vêm apresentando grande importância em diversas áreas como farmacêutica, industrial, medicinal e em programas de melhoramento. Assim, torna-se necessário um maior conhecimento sobre estas espécies e indicação de seus potenciais para as diversas áreas. (BERNARDES et al., 2016). Dentre as espécies silvestres existentes e que são usadas para melhorar as características das espécies comerciais, destacam-se: *Passiflora cincinnata*; *Passiflora foetida*; *Passiflora maliformis*; *Passiflora mucronata*; *Passiflora quadrangularis*; *Passiflora suberosa*.

Passiflora cincinnata é conhecida como maracujá-mochila ou maracujá-do-mato, apresenta uma vasta distribuição geográfica podendo ser encontrada em Goiás, Minas Gerais, Bahia (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2010) e na região semiárida do Nordeste (CORREIA et al., 2010). O fruto dessa espécie é comercializado na entressafra do maracujá-amarelo na região Nordeste, sendo uma ótima opção para os agricultores por ser

nativa da região (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2010). No entanto, contém apenas 21 acessos guardados em bancos de germoplasma no país. (FERREIRA, 2005).

Passiflora foetida tem uma grande distribuição geográfica, sendo encontrada em Porto Rico, Jamaica, Antilhas e em toda a América do Sul, inclusive no Brasil. (BERNACCI, 2003). É conhecida como canapú-fedorento, maracujá-de-estalo ou maracujá-do-mato. (FARIA; STEHMANN, 2010). Essa espécie é a única do gênero que possui glândulas de resina (tricomos secretores), que têm uma elevada atividade de proteases, fosfatases ácidas e apresentam compostos como passifloricinas, inseticida alfa-pironas e diversos compostos que são capazes de impedir a atividade de metaloproteases que estão envolvidas na invasão tumoral, metástase e angiogênese. (ROSA; DORNELAS, 2012).

Passiflora maliformis é uma espécie de ocorrência na América Central até o norte da América do Sul, e seu nome popular é maracujá cabaça doce, maracujá maçã e maracujá de osso. (SOUZA; MELETTI, 1997). Os frutos dessa espécie possuem polpa de cor alaranjada, suculenta e doce (BRAGA; JUNQUEIRA, 2000), sendo consumida na forma de suco (TEIXEIRA, 1994).

Passiflora mucronata é conhecida popularmente como maracujá-de-restinga ou sururu. (LORENZI et al., 2006). É natural da Mata Atlântica, e ocorre desde o litoral sul da Bahia até o litoral norte de São Paulo. (BERNACCI et al., 2003). Apresenta um amplo período de florescimento, quando comparada às outras espécies de *Passiflora*, florescendo de fevereiro a novembro, e o seu florescimento cessa em períodos mais chuvosos, principalmente em dezembro e janeiro. (MELETTI et al., 2011).

Passiflora quadrangularis é cultivada em regiões com altitudes abaixo de 2500 m. (KILLIP, 1938). No Brasil encontra-se descrita nos estados de Amazonas e Maranhão e seu nome popular é maracujá-açu. (CERVI, 1997). Outro local de ocorrência dessa espécie é na Colômbia (GAZOLA et al., 2015), onde é conhecida como badea (HERNÁNDEZ; BERNAL, 2000), sendo consumida na forma de suco (GAZOLA et al., 2015), por sua polpa ser pouco ácida e açucarada (BRAGA; JUNQUEIRA, 2000).

Passiflora suberosa é uma espécie tropical, encontrada nas Índias Ocidentais e em parte do México, América Central e do Sul. (ULMER et al., 2004). É usada como ornamental (VANDERPLANK, 1996), na medicina popular em tratamentos de hipertensão, sedativo, diabetes e doenças de pele (MILLER, 1998; ULMER et al., 2004). É

importante para o melhoramento de plantas, por apresentar um elevado teor de vitamina C e tolerância à Murcha de *Fusarium* e à verrugose. (MACHADO et al., 2015). Todavia, tem-se uma preocupação por ela ocorrer em regiões que sofrem ação antrópica, isso pode causar o desaparecimento dos genótipos que poderiam ser utilizados. (BERNACCI et al., 2005).

Para que se possa ter um maior conhecimento sobre as espécies silvestres e dos híbridos comerciais de maracujá que necessitam de informações em relação à produtividade e à qualidade dos frutos, é necessário usar metodologias que contribuam para sua caracterização agrônômica, molecular, citogenética e botânica, assim, irão auxiliar em programas de melhoramento genético das espécies. (FALEIRO et al., 2011; SOARES et al., 2011; FREITAS et al., 2012; SOUSA et al., 2012).

1.2. Caracterização morfológica e físico-química de maracujá

O uso da caracterização morfológica (número de folhas, diâmetro e comprimento de ramos) (ANTUNES et al., 2014), juntamente com parâmetros genéticos são importantes para selecionar, gerenciar e certificar as variedades obtidas por programas de melhoramento (CRUZ; CARNEIRO, 2006; FONSECA et al., 2009; SANTOS et al., 2012). Esta caracterização permite inferir as diferenças entre acessos de banco de germoplasma a partir de traços descritivos. (RABBANI et al., 1998). As variáveis biométricas estão relacionadas com altura de planta, diâmetro de caule e área foliar, que são usadas no monitoramento do crescimento das plantas, e estão diretamente relacionadas aos rendimentos da mesma. (COELHO; SIMÕES, 2010).

Outra caracterização que deve ser feita é a físico-química, pois no mercado o maracujá tem maior valor comercial quando apresenta características de qualidades internas (sólidos solúveis, acidez, rendimento de suco) e externas (cor, tamanho, peso e ausência de defeitos), de acordo com os padrões de qualidade do mercado. (OCAMPO et al. 2013).

A caracterização físico-química tem grande importância no melhoramento genético por verificar as propriedades organolépticas (JUNQUEIRA et al., 2010), e também está sendo realizada em bancos de germoplasma para obter informações sobre a descrição e classificação dos acessos, para identificar indivíduos com caracteres adequados (JUNQUEIRA et al., 2005), para que possam atender ao mercado consumidor e industrial.

A caracterização química é importante, pois os frutos de maracujá são climatéricos, e em seu período de amadurecimento passa por diversas mudanças. (SILVA et al., 2014). Assim, deve-se levar em consideração o índice de maturação, que compreende a coloração da casca ou alterações químicas (SS, AT, SST/AT, Vit C), em seu processo de amadurecimento (COELHO, 2010), pois esses índices são importantes para a análise da qualidade dos frutos pós-colheita (SILVA et al., 2014). No consumo do fruto na forma *in natura*, o consumidor verifica as características externas, e a indústria leva em consideração acidez, que deve ser entre 3,2 e 4,5%, sólidos solúveis entre 15 a 16% e rendimento de polpa superior a 40%. (FOLEGATTI, MATSUURA, 2002).

Uma variedade é considerada desenvolvida para atender o mercado *in natura* quando possui as seguintes características: frutos grandes e ovais, resistente ao transporte, não perder sua qualidade no período de armazenamento, ter uma cavidade interna com bastante polpa. (ABREU et al., 2009). E, para ser utilizada na indústria deve apresentar casca mais fina, alto rendimento de suco, cor amarelo-dourada, cavidade interna com grande quantidade de polpa, teor de sólidos solúveis acima de 13 °Brix. (BRUCKNER, 2002).

Com isso, verifica-se a importância em caracterizar os híbridos que são desenvolvidos e lançados no mercado, como os híbridos BRS Gigante Amarelo (*P. edulis* flavicarpa x *P. edulis* flavicarpa), BRS Rubi do Cerrado (*P. edulis* azedo-roxo x *P. alata* x *P. edulis* azedo-amarelo) e BRS Pérola do Cerrado (*Passiflora setacea*) que foram lançados pela EMBRAPA para obter cultivares mais produtivas e resistentes a diversas doenças. (FALEIRO et al., 2008). No entanto, estes híbridos estão sendo cultivados em diferentes regiões do país, sendo necessárias maiores informações sobre o seu comportamento nesses ambientes de produção. (SANTOS et al., 2013).

Desta forma, é interessante obter estudos mais aprofundados sobre características agrônomicas de cultivares comerciais para se ter um melhor conhecimento, para auxiliar a escolha de genitores e cruzamento entre espécies nos programas de melhoramento. (SOUZA et al., 2012).

1.3. Caracterização molecular de espécies de *Passiflora*

As espécies do gênero *Passiflora* despertaram interesse em diversas instituições de pesquisa em diferentes países devido a sua diversidade de espécies e desenvolvimento

econômico, sendo realizado a caracterização e avaliação de populações nativas e cultivadas (CERQUEIRA-SILVA et al., 2016), promovendo o desenvolvimento de estratégias de conservação e melhoria dos recursos genéticos (PÉREZ; D'EECKENBRUGGE, 2017).

Uma das metodologias que está sendo usada para averiguar os recursos genéticos disponíveis em *Passiflora* são os marcadores moleculares. Estes permitem verificar um alto grau de polimorfismo sem a influência ambiental e também podem ser usados em qualquer estágio da planta ou até mesmo em cultura de tecido ou célula (FALEIRO, 2007), em maior velocidade e qualidade (VARSHNEY et al., 2005).

Estudos que envolvem marcadores moleculares para averiguar a variabilidade auxiliam na conservação e utilização de germoplasmas selvagens, pois permitem escolher estratégias melhores para a manutenção de germoplasma. (VIANA et al., 2010). Mas, também, são usados para verificar a diversidade genética existente entre espécies, sendo usados desde a caracterização do germoplasma até as etapas finais de seleção das plantas melhoradas. (FALEIRO et al., 2005).

Existem diversos tipos de marcadores, dentre os quais pode-se destacar os microssatélites ou SSR (Sequências Simples Repetidas), em estudo de diversidade. (PAIVA, 2013). Estes marcadores são amplamente usados por serem codominantes, multialélicos, polimórficos e reproduzíveis (SCHLÖTTERER, 2004), essas características fazem com que esses marcadores sejam eficientes em verificar e estimar diferenças alélicas e a variabilidade existente entre genótipos (PAIVA, 2013). E, também pode ser usado em diversos estudos como mapa de ligação, mapeamento de QTL, seleção assistida por marcadores, análise de parentesco, estudo de diversidade genética, estudo de fluxo gênico e de evolução. (CAVAGNARO et al., 2010; ZHU et al., 2011).

Os marcadores microssatélites são específicos para a espécie, a qual é desenvolvida, e isso demanda um elevado custo por precisar de equipamentos e tempo. (LIU et al., 2011). Para contornar essa questão, está sendo realizada a transferibilidade entre espécies, ou seja, a transferência de *primers* microssatélites entre espécies estreitamente relacionadas para reduzir a necessidade de desenvolvimento de novos *primers*. (BARBARA et al., 2007). Por esta razão, há maior interesse nos marcadores microssatélites que amplificam em espécies mais próximas. (LIU et al., 2011). Com isso, estudos vêm sendo realizados usando a amplificação cruzada em diversas espécies, como realizado por Oliveira et al. (2013), Cerqueira-Silva et al. (2014), Silva et al. (2014), para

espécies do gênero *Passiflora*; Siju et al. (2010), para a espécie *Curcuma longa* L.; Somta et al. (2009), para a *Vigna radiata*; Peterman et al. (2012), para o gênero *Ambystoma* e Lin et al. (2011), para seis espécies de *Poaceae*.

1.4. Caracterização fitoquímica de *Passiflora*

O uso de plantas para fins medicinais é uma antiga tradição de várias populações e ainda é um recurso alternativo aceito. (GOMES et al., 2017). Pois, produtos naturais derivados de plantas, como os flavonoides, terpenos e alcaloides, receberam atenção nos últimos anos por apresentarem propriedades farmacológicas, como atividades anti-inflamatórias, antipiréticas e analgésicas. (SASIKALA et al., 2011). Dentre as diversas plantas que são usadas como medicinais destacam-se as espécies de maracujá, sendo utilizadas principalmente na cultura americana, asiática e europeia (GOMES et al., 2017), como, por exemplo, em países da América do Sul, que usam espécies de *Passiflora* em preparações farmacêuticas como componente ativo (COSTA et al., 2016). Na Colômbia, utiliza-se de folhas de *P. tripartita* var. *molíssima* por apresentar propriedades sedativas (INVIMA, 2006); e no Brasil, as espécies de *P. alata* e *P. edulis* estão incluídas na versão mais nova da Farmacopeia Brasileira (2010). As folhas das espécies são mais utilizadas por apresentarem propriedades farmacológicas como antioxidantes, anti-inflamatórias, analgésicas, antiasmáticas e sedativa. (DHAWAN et al., 2004).

A composição química das espécies de *Passiflora* ainda não está bem definida, no entanto, tem-se desenvolvido estudos sobre as diferenças dos efeitos sedativos que são ocasionados pela presença de alcaloides e flavonoides. (TIWARI et al., 2016). Dentre os flavonoides presentes nas espécies, o que é mais relatado são os flavonoides C-glicosilados, que são os mais descritos e considerado o principal componente. (ULUBELEN et al., 1982; LI et al., 2011; ZUCOLOTTI et al., 2012). Estes compostos foram associados a diversos efeitos farmacológicos observados em diferentes espécies. (COLETA et al., 2006; Santos et al., 2006; Sena et al., 2009; Zucolotto et al., 2009; Gazola et al., 2015). Além dessas substâncias, as espécies também são ricas em ácidos fórmico, butírico, linoleico, linolênico, málico, oleico e palmítico; compostos fenólicos; aminoácidos como alanina; éster; açúcares (d-frutose, d-glicose e rafinose) e enzimas (catalase, pectina metil-esterase, fenolase). (TIWARI et al., 2016). Diversos estudos já foram realizados para verificar as propriedades terapêuticas de algumas espécies de

Passiflora como realizado por Braga et al. (2013); Colomeu et al. (2014); Wasicky et al. (2015); Wasicky et al. (2015); Vargas et al. (2007); Zeraik et al. (2011); Siebra et al. (2016); Cazarin et al. (2015); Deng et al. (2010); Benincá et al. (2007); Ayres et al. (2015); Asadujjaman et al. (2014); Movafegh et al. (2008); Singh et al. (2012).

Estes estudos relatam os efeitos terapêuticos dos diversos extratos de diferentes partes de *Passiflora*, mas, também levam em consideração os subprodutos gerados das espécies. (CORRÊA et al., 2016). Estes subprodutos são promissoras fontes de moléculas bioativas para o desenvolvimento de medicamentos antidiabéticos, antimicrobianos, anti-inflamatórios e antiproliferativos (CORRÊA et al., 2016), e essas possuem efeitos farmacológicos em diferentes órgãos como cérebro, sangue, sistemas cardiovascular e nervoso, processos bioquímicos e funções fisiológicas, incluindo proteossíntese, capacidade de trabalho, reprodução e função sexual (TIWARI et al., 2016).

Desta maneira, verifica-se que o maracujá é de importância econômica e social no país, pois é considerado como o segundo em diversidade de espécies silvestres no mundo. Assim, gera um contexto favorável para o conhecimento e utilização dessas espécies de forma sustentável. As espécies silvestres vêm ganhando importância em diversas áreas como farmacêutica, industrial, medicinal e em programas de melhoramento genético, sendo necessário um maior conhecimento sobre estas espécies e indicação de seus potenciais para as diversas áreas.

2. OBJETIVO GREAL

Caracterizar por caracteres agronômicos, moleculares e fitoquímicos espécies silvestres e comerciais do gênero *Passiflora* gerando informações que agreguem conhecimento e orientem estudos de melhoramento, conservação, identificação e utilização.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar de forma agronômica e físico-química as espécies *Passiflora suberosa*, *Passiflora alata*; *Passiflora maliformis*; *Passiflora quadrangularis*; *Passiflora foetida*; *Passiflora mucronata*; *Passiflora cincinnata* para averiguar o potencial dessas espécies para serem usadas em programas de melhoramento genético;
- 2) Caracterizar os híbridos BRS Rubi do Cerrado; BRS Gigante Amarelo e BRS Pérola do Cerrado em relação ao seu desenvolvimento e qualidade dos frutos no Estado do Espírito Santo na cidade de Alegre.

3. REFERÊNCIAS

- ABREU, S. D. P. M.; PEIXOTO, J. R.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SOUSA, M. A. D. F. Características físico-químicas de cinco genótipos de maracujazeiro-azedo cultivados no distrito federal. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 31, n. 2, p. 487-491, 2009.
- AGRA, M. de F.; FREITAS, P. F. de; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- ALZATE-MARIN, A. L.; CERVIGNI, G. D. L.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. 333-342, 2005.
- ANTUNES, Rafael de Oliveira et al. Seleção com base em características morfológicas no maracujazeiro azedo. 2014. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) -Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- ASADUJJAMAN, M.; MISHUK, A. U.; HOSSAIN, M. A.; KARMAKAR, U. K. Medicinal potential of *Passiflora foetida* L. plant extracts: Biological and pharmacological activities. *Journal of Integrative Medicine*, v. 12, p. 121-126, 2014.
- AYRES, A. S.; DE ARAÚJO, L. L.; SOARES, T. C.; COSTA, G. M.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; et al. Comparative central effects of the aqueous leaf extract of two populations of *Passiflora edulis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 499-505, 2015.
- BERNACCI, L. C., MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (*Passifloraceae*). *Rev. Bras. Frutic.*, v. 25, n. 2, p. 355-356, 2003.
- 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., 2014. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil>.
- BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PASSOS, I. R. S. (2005) *Maracujá Germoplasma e Melhoramento Genético*. Embrapa, Brasil, p 676.
- BERNACCI, L.C. (Coord.) *Passifloraceae*. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T.S. (Ed.) *Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo*. São Paulo: RiMa/FAPESP, 2003. v.3, p. 247-274.
- BERNARDES, P. M.; BORGES, K. F.; PRAÇA-FONTES, M. M.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M.; FERREIRA, M. F. da S. *Passifloras do Espírito Santo: usos e potenciais*. In: FERREIRA, A.; LOPES, J. C.; FERREIRA, M. F. DA S.; SOARES, T. C. B. *Tópicos especiais em Produção Vegetal VI*. 1. ed. – Alegre, ES: CAUFES, 2016. p. 553.
- BRAGA, A.; STEIN, A. C.; STOLZ, E. D.; DALLEGRAVE, E.; BUFFON, A.; DO REGO, J. C.; et al. Repeated administration of an aqueous spray-dried extract of the leaves

of *Passiflora alata* Curtis (Passifloraceae) inhibits body weight gain without altering mice behavior. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 145, p. 59-66, (2013).

BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V. Uso potencial de outras espécies do gênero *Passiflora*. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, v. 21, n. 206, p. 72-75, 2000.

CASTELLEN, M. S.; CERVI, A. C.; AMARAL, W. A. N. O gênero *Passiflora* L. nos

CAZARIN, C. B. B.; DA SILVA, J. K.; COLOMEU, T. C.; BATISTA, A. G.; MELETTI, L. M. M.; PASCHOAL, J. A. R.; et al. Intake of *Passiflora edulis* leaf extract improves antioxidant and anti-inflammatory status in rats with 2, 4, 6-trinitrobenzenesulphonic acid induced colitis. *Journal of Functional Foods*, v. 17, p. 575-586, 2015.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; FALEIRO, F. G.; JESUS, O. N.; SANTOS, E. S. L.; SOUZA, A. P. 2016. The genetic diversity, conservation, and use of passion fruit (*Passiflora* spp.). In: Ahuja MR, Jain SM (eds) Genetic diversity and erosion in plants, sustainable development and biodiversity 8. Springer, Switzerland.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SANTOS, E. S. L.; VIEIRA, J. G. P.; MORI, G. M.; JESUS, O. N.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. New Microsatellite Markers for Wild and Commercial Species of *Passiflora* (Passifloraceae) and Cross-Amplification. *Applications in Plant Sciences*, v. 2, n. 2, p. 1-5, 2014.

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

COELHO, E. F.; SIMÕES, W. L. Produtividade do mamoeiro, cultivar Tainung n°1, sob diferentes manejos de irrigação nos tabuleiros costeiros do Nordeste. *Magistra*, v. 22, n. 1, p. 35-40, 2010.

COLETA, M.; BATISTA, M. T.; CAMPOS, M. G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M. D.; LIMA, T. C.; CUNHA, A. P. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. *Phyther. Res.*, v. 20, p. 1067-1073, 2006.

COLOMEU, T. C.; FIGUEIREDO, D.; CAZARIN, C. B. B.; SCHUMACHER, N. S. G.; MAR_OSTICA, M. R.; MELETTI, L. M. M.; et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NODmice). *International Immunopharmacology*, v. 18, p. 106-115, 2014.

CORRÊA, R. C. G.; PERALTA, R. M.; HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; BRACHT, A.; FERREIRA, I. C. F. R. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (passion fruit). *Trends in Food Science & Technology*, v. 58, p. 79-95, 2016.

CORREIA, R. C.; ARAUJO, F. P. DE; ARAÚJO, J. L. P. MARACUJÁ (*Passiflora cincinnata*) – Alternativa para o incremento da fruticultura de sequeiro no semiárido brasileiro. *Embrapa Semiárido*, p. 2-5, 2011.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais – estado da arte. In: Faleiro, F. G.; Junqueira, N. T. V.; Braga, M. F. (Eds.) Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 475-506, 2005.

DENG, J.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H.; LI, L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis f. flavicarpa*. Journal of Ethnopharmacology, v. 128, p. 148-153, 2010.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora: a review update. Journal Ethnopharmacol, v. 94, p. 1–12, 2004.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; OLIVEIRA, E. J.; PEIXOTO, J. R.; COSTA, A. M. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – histórico e perspectivas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados (Documentos/ Embrapa Cerrados, 307) 36p, 2011.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; OLIVEIRA, E. J. DE.; PEIXOTO, J. R.; COSTA, A. M. Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro – histórico e perspectivas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Caracterização de Germoplasma e Melhoramento Genético do Maracujazeiro Assistidos por Marcadores Moleculares: resultados da pesquisa 2005-2008. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008. 58p.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; COSTA, A. M. Ações de pesquisa e desenvolvimento para o uso diversificado de espécies comerciais e silvestres de maracujá (*Passiflora* spp.). Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 26p, 2015.

FALEIRO, F. Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 102 p, 2007.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Pesquisa e desenvolvimento do maracujá no Brasil. In: SILVA, A.G.; LBUQUERQUE, A.C.S.; MANZANO, N.T.; SILVA, R.C.; RUSSELL, N.C. (Ed.). Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. Brasília: Embrapa, 2008.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. 2005. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 187-209.

FARIA F. S.; STEHMANN, J. R. Biologia reprodutiva de *Passiflora capsularis* L. e *P. pohlii* Mast. (Decaloba, Passifloraceae.). Acta Botanica Brasilica, v.24, n.1, p. 262-269, 2010.

FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de Passiflora. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 2, p. 41-50, 2005.

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

FISCHER, I. H.; ALMEIDA, A. D.; FILETI, M. D. S.; BERTANI, R. D. A.; ARRUDA, M. D.; BUENO, C. J. Avaliação de passifloraceas, fungicidas e Trichoderma para o manejo da podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por Nectria haematococca. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 32, n. 3, p. 709-717, 2010.

FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U. Maracujá. Pós-colheita. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 51p, 2002.

FREITAS, J. P. X.; OLIVEIRA, E. J.; JESUS, O. N.; CRUZ NETO, A. J.; SANTOS, L. R. Formação de população base para seleção recorrente em maracujazeiro-amarelo com uso de índices de seleção. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.47, p.393-401, 2012.

FREITAS, L. B. História evolutiva das espécies de Passiflora L. de ocorrência no Rio Grande do Sul: aspectos genéticos, estrutura populacional e filogenia molecular. Revista Brasileira de Biociências, v. 9, n.1, 2011.

GANGA, R. M. D.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E. G. M.; GRILI, G. V. G.; GONÇALVES, M. M.; CHAGAS, E. A.; WICKERT, E. Diversidade genética em maracujazeiro amarelo utilizando marcadores moleculares AFLP. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 26, n. 3, p. 494-498, 2004.

GAZOLA, A. C.; COSTA, G. M.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F. A.; REGINATTO, F. H.; DE LIMA, T. C.; SCHENKEL, E. P. Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from Passiflora quadrangularis pericarp. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 25, n. 2, p. 158-163, 2015.

HERNANDEZ, A.; BERNAL, R. 2000. Lista de espécies de Passifloraceae de Colombia. Biota Colombiana 1, 320–335.

IBGE. Produção Agrícola Municipal, v. 41, 2014.

IBRAF: Instituto Brasileiro de Frutas, 2016. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/detalhe.aspx?id=1>. Acesso em 15/02/2016.

JUNG, M.S.; VIEIRA, A.; BRANCKER, A.; NODARI, R.O. Capacidade geral e específica de combinação de caracteres do fruto do maracujazeiro doce (*Passiflora alata* Curtis). Ciência Rural, v.37, n.4, p.963-969, 2007.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestre de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 4, p. 81-108, 2005.

JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; BRAGA, M. F. Características físico-químicas e produtividade de acessos

de *Passiflora nitida* Kunth procedentes do Centro-Norte do Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 32, p. 791-797, 2010.

KILLIP, E.P. The American Species of Passifloraceae. v.XIX. Part II. Botanical Series, Field Museum of Natural History, Chicago.1938.

KRAUSE, W.; NASCIMENTO, T. A. F.; SANTI, A.; MACHADO, J. R. de A.; AZEVEDO, V. H. de. Rendimento do maracujazeiro amarelo sob diferentes espaçamentos de plantio. Magistra, Cruz das Almas, v. 22, n. 2, p. 122-127, 2010.

LI, H.; ZHOU, P.; YANG, Q.; SHEN, Y.; DENG, J.; LI, L.; ZHAO, D. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. J. Ethnopharmacol, v.133, p. 1085–1090, 2011.

LIMA, A. A. Introdução. In: Lima AA (Ed.) Maracujá Produção: aspectos técnicos. Brasília: EMBRAPA. (Frutas do Brasil, 15). p. 9, 2002.

MACHADO, C. DE F.; JESUS, F. N. DE.; LEDO, C. A. DA S. Genetic divergence of the accessions of passion fruit using quantitative and qualitative descriptors. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 37, n. 2, p. 442-449, 2015.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 33, n. SPE1, p. 83-91, 2011.

MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C.; SOARES-SCOTT, M. D.; AZEVEDO FILHO, J. D.; MARTINS, A. L. M. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). Revista Brasileira de Fruticultura, v. 25, n. 2, p. 275-278, 2003.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, 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: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 3, p. 55-78, 2005.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; ALVARES, V.; DE AZEVEDO FILHO, J. A. Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam.: nova alternativa de maracujá ornamental. Ornamental Horticulture, v. 17, n. 1, p. 87-95, 2011.

MILLER, L. G. Herbal medicinalselected Clinical Considerations Focusing on nown or Potential Drug-Herb Interactions. Archives of Internal Medicine, v. 158, p. 2200-2211, 1998.

OCAMPO, J.; URREA, R.; WYCKHUYS, W.; SALAZAR, M. Exploración de la variabilidad genética del maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) como base para un programa de fitomejoramiento en Colombia. Acta Agronómica, v. 62, p. 352-360, 2013.

OLIVEIRA JÚNIOR, M.; SÃO JOSÉ, A.; REBOUÇAS, T.; MORAIS, O.; DOURADO, F. Superação de dormência de maracujá-do-mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). Rev. Bras. Frutic, v. 32, n. 2, p. 584-590, 2010.

- OLIVEIRA, J.C. de; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In.: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, 5, 1998, Jaboticabal, Anais... Jaboticabal: FUNEP, 1998. p.292- 302.
- PAIVA, C. L. 2013. Descritores morfológicos e marcadores microssatélites na caracterização de germoplasma de *Passiflora* spp. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. 73p.
- PEREZ, J. O.; D'EECKENBRUGGE, G. C. Morphological characterization in the genus *Passiflora* L.: an approach to understanding its complex variability. *Plant Systematics and Evolution*, v. 303, n.4, p. 531–558, 2017.
- RAMAIYA, S. D.; BUJANG, J. S.; ZAKARIA, M. H. Assessment of total phenolic, antioxidant, and antibacterial activities of *Passiflora* species. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 2014.
- ROSA, Y. B. J.; DORNELAS, M. C. *In vitro* plant regeneration and de novo differentiation of secretory trichomes in *Passiflora foetida* L. (Passifloraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 108, n. 1, p. 91-99, 2012.
- RUGGIERO, C. 1987. *Cultura do maracujazeiro*. Ribeirão Preto: Legis Summa.
- SALLA, M. F. S.; RUAS, C. F.; RUAS, P. M.; CARPENTIERI-PÍPOLO, V. Uso de marcadores moleculares na análise da variabilidade genética em acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 24, n. 1, p. 015-022, 2002.
- SANTOS, J. L.; RESENDE, E. D.; MARTINS, D. R.; GRAVINA, G. D. A.; CENCI, S. A.; MALDONADO, J. F. Determinação do ponto de colheita de diferentes cultivares de maracujá. *Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 17, p. 750-755, 2013.
- SANTOS, R. I.; MARLISE, A.; SCHENKEL, E. P. Analysis of the plant drug *Wibbrandia ebracteata*. *Int. J. Pharmacogn.*, v. 34, p. 300–330, 1996.
- SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nat. Rev. Genet.*, v. 5, p. 63-69, 2004.
- SEAFORTH, C. E.; ADAMS, C. D.; SYLVESTER, Y. *A Guide For The Medicinal Plants Of Trinidad & Tobago*. Commonwealth Secreteriate, Marlborough House, Pall Mall, London, 1983.
- SENA, L. M.; ZUCOLOTTO, S. M.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; DE LIMA, T. C. M. Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids. *Exp. Biol. Med.*, v. 234, p. 967–975, 2009.
- SIEBRA, A. L. A.; OLIVEIRA, L. R.; MARTINS, A. O.; SIEBRA, D. C.; ALBUQUERQUE, R. S.; LEMOS, I. C. S.; et al. Potentiation of antibiotic activity by *Passiflora cincinnata* Mast. front of strains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 25, n. 1, p. 37-43, 2016.

SILVA, F. M.; CORREA, L. D. S.; BOLIANI, A. C.; SANTOS, P. D. Enxertia de mesa de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. sobre *Passiflora alata* Curtis, em ambiente de nebulização intermitente. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 27, n. 1, p. 98, 2005.

SINGH, B.; SINGH, D.; GOEL, R. K. Dual protective effect of *Passiflora incarnata* in epilepsy and associated post-ictal depression. Journal of Ethnopharmacology, v. 139, p. 273-279, 2012.

SOUSA, L.; SILVA, E. M.; GOMES, R. L. F.; LOPES, A.; SILVA, I. Caracterização e divergência genética de acessos de *Passiflora edulis* e *P. cincinnata* com base em características físicas e químicas de frutos. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 34, n. 3, p. 832-839, 2012.

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

Tabuleiros Costeiros. In: SILVA JUNIOR, J. F. (Org.). Recursos Genéticos dos Tabuleiros e seus Ecossistemas Associados – Fruteiras. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2005. 32 p.

TEIXEIRA, C. G.; CASTRO, J. V.; TOCCHINI, R.P.; NISIDA, A.L.A.C.; HASHIZUME, T.; MEDINA, J.C.; TURATTI, J.M.; LEITE, R.S.S.F.; BLISKA, F.M.M.; GARCIA, A.E.B. Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. 2.ed. Campinas: ITAL, 267p, 1994.

TIWARI, S.; SINGH, S.; TRIPATHI, S.; KUMAR, S. A pharmacological review: passiflora species. International Journal of Pharmacognosy, v. 3, n. 1, p. 10-18, 2016.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. Passiflora: passionflower of the world. 1.ed. Cambridge: Timber Press, 2004.

ULMER, T.; ULMER, B.; MACDOUGAL, J. M. *Passiflora - Passionflowers of the World*. Timber Press, Portland, 2004.

ULUBELEN, A.; OKSUZ, S.; MABRY, T. J.; DELLAMONICA, G.; CHOPIN, J. Cglycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P. alata*, *P. ambigua* and *Adenia manii*. J. Nat. Prod., v. 45, n. 6, p. 783-783, 1982.

VANDERPLANK, J. *Passion Flowers*. MIT Press, Massachusetts, 1996.

VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; et al. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. Fitoterapia, v. 78, p. 112-119, 2007.

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

VIANA, A. J. C.; SOUZA, M. M.; ARAÚJO, I. S.; CORRÊA, R. X.; AHNERT, D. Genetic diversity in *Passiflora* species determined by morphological and molecular characteristics. Biologia Plantarum, v. 54, n. 3, p. 535-538, 2010.

WASICKY, A., HERNANDES, L. S., VETORE-NETO, A., MORENO, P. R., BACCHI, E. M., KATO, E. T. M., et al. Evaluation of gastroprotective activity of *Passiflora alata*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 407-412, 2015.

ZERAIK, M. L.; SERTEYN, D.; DEBY-DUPONT, G.; WAUTERS, J. N.; TITS, M.; YARIWAKE, J. H.; et al. Evaluation of the antioxidant activity of passion fruit (*Passiflora edulis* and *Passiflora alata*) extracts on stimulated neutrophils and myeloperoxidase activity assays. *Food Chemistry*, v. 128, p. 259-265, 2011.

ZUCOLOTTO, S. M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E. P. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochem. Anal.*, v. 23, p. 232-239, 2012.

ZUCOLOTTO, S. M.; GOULART, S.; MONTANHER, A. B.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory C-glycosylflavones from *Passiflora edulis*. *Planta Med.*, v. 75, p. 1-6, 2009.

CAPÍTULO 1

DESEMPENHO VEGETATIVO E REPRODUTIVO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Passiflora*

Resumo

A cultura do maracujazeiro vem ganhando mercado no setor da fruticultura, por apresentar rápido retorno econômico aos agricultores. As espécies cultivadas comercialmente são *Passiflora edulis*, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* e *Passiflora alata*. No entanto, espécies de ocorrência natural estão ganhando maior enfoque por seus caracteres agrônômicos, genéticos e químicos desejáveis, como resistência a fitopatógenos, qualidade de frutos e adaptabilidade. Além da importância de caracterizar espécies silvestres, também é necessário obter informações sobre o comportamento produtivo e a qualidade dos frutos dos híbridos que são lançados no mercado em diferentes regiões do país. Objetivou-se neste trabalho caracterizar de forma agrônômica, fenológica e físico-química as espécies *Passiflora suberosa*, *Passiflora alata*; *Passiflora maliformis*; *Passiflora quadrangularis*; *Passiflora foetida*; *Passiflora mucronata*; *Passiflora cincinnata* para averiguar o potencial dessas espécies para serem usadas em programas de melhoramento genético; e caracterizar os híbridos BRS Rubi do Cerrado; BRS Gigante Amarelo e BRS Pérola do Cerrado em relação ao seu desenvolvimento e qualidade dos frutos. Dois experimentos foram conduzidos por um ano na área experimental do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo, nos quais avaliou-se as características vegetativas: comprimento do ramo ortotrópico e do ramo plagiotrópico; diâmetro do ramo ortotrópico e plagiotrópico; comprimento entre nós; comprimento e largura da folha dos ramos ortotrópico e plagiotrópico; número de ramos plagiotrópicos. Os frutos foram avaliados quanto ao peso; peso da polpa com sementes; rendimento de polpa; número de sementes; diâmetro longitudinal e transversal; espessura e massa da casca. Dez marcadores microssatélites foram utilizados para a avaliação genética molecular das espécies. O híbrido BRS Gigante Amarelo apresentou as maiores médias para as características de diâmetro do ramo ortotrópico, largura da folha para os ramos ortotrópico e plagiotrópico e não diferiu estatisticamente de BRS Rubi do cerrado, BRS Pérola do cerrado e de *P. alata* para comprimento de entre nó. As espécies silvestres e o híbrido BRS Rubi do Cerrado não diferiram para as variáveis comprimento dos ramos ortotrópico e plagiotrópico; diâmetro do ramo ortotrópico e número de ramos plagiotrópicos. As espécies apresentaram similaridades no comportamento de crescimento acumulado, no período de florescimento e frutificação. Houve diferenças significativas entre as espécies para peso do fruto, peso da polpa e diâmetro transversal. As espécies *P. suberosa* e *P. foetida* apresentaram maiores quantidades de frutos, porém com menor peso, sendo diferente das demais espécies que apresentaram menores quantidades de frutos com peso maior e adequado para o mercado *in natura* e industrial. Os frutos de todas as espécies apresentaram características dentro do recomendado por legislação relativas a sólidos solúveis, pH e vitamina C. O agrupamento com base nos microssatélites permitiu verificar as espécies mais similares, sendo que algumas coincidem com os dados de floração e frutificação. O comprimento e largura da folha do ramo plagiotrópico demonstram variabilidade existente entre as espécies *P. suberosa*, *P. alata*, BRS Gigante amarelo, BRS Rubi do cerrado, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. cincinnata*, *P. quadrangularis* e *P. mucronata*. As espécies *P. suberosa*, *P. alata*, BRS Gigante amarelo, BRS Rubi do cerrado, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. cincinnata*, *P. quadrangularis* e *P. mucronata*

apresentaram maior período de florescimento e frutificação na primavera e no verão. As espécies apresentam características químicas adequadas para a comercialização, e potencial para serem usadas no mercado de fruta fresca. Dados moleculares demonstra similaridade genética entre as espécies *P. suberosa* e *P. foetida*; *P. maliformis* e *P. cincinnata*; *P. alata* e *P. quadrangularis*; BRS Gigante amarelo e BRS Pérola do cerrado, mesmo apresentando diferenças nas demais avaliações feitas.

Palavras - chaves: caracterização morfo-agronômica, SSR, espécies silvestres, Passifloraceae

Abstract

The passion fruit culture has been gaining market in the sector of the fruit cultivation, because it presents a fast-economic return to the farmers. The commercially grown species are *Passiflora edulis*, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* and *Passiflora alata*. However, there are naturally occurring species that are gaining greater focus because they present desirable morphological, genetic and chemical characters for breeding programs. Wild species show resistance to phytopathogens, higher fruit quality and greater adaptability. Besides the importance of characterizing the wild species, it is also necessary to obtain information about the productive behavior and the quality of the hybrids that are released on the market in different regions of the country. Thus, our objective was to characterize, in an agronomic, phenological and physicochemical manner, the species *Passiflora suberosa*, *Passiflora alata*; *Passiflora maliformis*; *Passiflora quadrangularis*; *Passiflora foetida*; *Passiflora mucronata*; *Passiflora cincinnata* to investigate the potential of these species for use in breeding programs; and characterize the hybrids, BRS Rubi do Cerrado; BRS Gigante Amarelo and BRS Pérola do Cerrado in relation to their development and fruit quality in the State of Espírito Santo in the city of Alegre. Experiments I and II were assembled in DBC in the period of December 2015 (I) and May 2016 (II) in the experimental area of the Center of Agrarian Sciences and Engineering of the Federal University of Espírito Santo. The following vegetative characteristics were assessed: length of the orthotropic branch up to the date of pruning (CRO); length of the plagiotropic branch (CRP); diameter of the orthotropic branch (DRO) and plagiotropic (DRP); length between nodes (CEN); length (CF) and leaf width (LF) of the orthotropic and plagiotropic branches; number of plagiotropic branches (NRP). For physical-chemical characterization the following characteristics were evaluated: fruit weight (g); weight of pulp with seeds (g); pulp yield (%): pulp weight / fruit weight * 100; number of seeds; longitudinal diameter (mm); transverse diameter (mm); thickness of the shell (mm) and shell mass (g). For the molecular data, ten microsatellite markers were analyzed, six developed for *Passiflora edulis* and four for *Passiflora alata*. The hybrid BRS Gigante Amarelo presented the highest averages for the diameter characteristics of the orthotropic branch, leaf width for the orthotropic and plagiotropic branches and did not differ statistically from BRS Rubi do cerrado, BRS Pérola do cerrado and from *P. alata* to length between nodes. In experiment II the wild species and the hybrid BRS Rubi do Cerrado did not differ for the variables length of the orthotropic and plagiotropic branches; diameter of the orthotropic branch and number of plagiotropic branches. The species inside and between experiments showed similarities in the behavior of accumulated growth, in the period of flowering and fruiting. For fruit weight, pulp weight and transverse diameter characteristics there were significant differences between the species. The species *P. suberosa* and *P. foetida* presented larger amounts of fruits, but lower weight, different from the other species that presented smaller quantities of fruits with greater weight and suitable for the fresh and industrial market. All species are in accordance with what is recommended by legislation for the following characteristics: soluble solids (SS), pH and vitamin C. The molecular clustering allowed to verify the junction of the most similar species, some of which coincide with the data of flowering and fruiting. The length and width of the leaf of the plagiotropic branch demonstrate the variability between the species *P. suberosa*, *P. alata*, BRS Gigante amarelo, BRS Rubi do cerrado, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. cincinnata*, *P. quadrangularis* and *P. mucronata*. The species *P. suberosa*, *P. alata*, BRS Gigante amarelo, BRS Rubi do cerrado, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. cincinnata*, *P. quadrangularis* and *P. mucronata* presented a longer period of flowering and fruiting in spring and

summer. The species present chemical characteristics suitable for commercialization, and potential to be used in the fresh fruit market. Molecular data shows genetic similarity between the species *P. suberosa* e *P. foetida*; *P. maliformis* e *P. cincinnata*; *P. alata* e *P. quadrangularis*; BRS Gigante amarelo and BRS Pérola do cerrado, even presenting differences in other assessments made.

Keywords: morpho-agronomic characterization, SSR, wild species, Passifloraceae

1. Introdução

O gênero *Passiflora* tem origem na América Tropical e Subtropical. No Brasil existem 144 táxons, dos quais 85 são endêmicos e o país é considerado centro de diversidade. (CERVI et al., 2010; BERNACCI et al. 2014). Apesar dessa quantidade de espécies existentes no país poucas são comerciais como *Passiflora edulis* Sims. (maracujazeiro-roxo), *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. (maracujazeiro-azedo) e a *Passiflora alata* Curtis (maracujazeiro-doce). (ATAÍDE et al., 2012).

A cultura do maracujazeiro apesar de ser crescente no país, é influenciada por diversos fatores que prejudicam o seu desenvolvimento, a produtividade e a qualidade dos frutos. (JUNQUEIRA, 1999). Assim, vem a importância do uso de espécies silvestres por apresentarem as características de: resistência a doenças e pragas, longevidade, autocompatibilidade, maior adaptação a condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, androginóforo mais curto, e maior concentração de componentes químicos que podem ser utilizados no melhoramento genético. (JUNQUEIRA et al., 2005; MELETTI et al., 2005).

Para obter maiores informações e caracterizar as espécies silvestres são utilizadas metodologias de caracterização agrônômica, molecular, citogenética e botânica. Estas espécies podem ser usadas em programas de melhoramento, intercâmbio de germoplasma, escolhas de genitores, planejamento de cruzamentos, moléculas e genes de interesse genético. (FALEIRO et al., 2011; SOARES et al., 2011; SOUSA et al., 2012). Apesar disso, os híbridos desenvolvidos em programas de melhoramento do maracujazeiro também necessitam de informações sobre o seu comportamento produtivo e da qualidade dos frutos (FREITAS et al., 2012), em diferentes regiões do país.

As características morfológicas ou variáveis biométricas, principalmente os caracteres estruturais como: número de folhas, diâmetro e comprimento dos ramos e altura da planta estão relacionados com a produtividade e rendimento. (COELHO, SIMÕES; 2010; ANTUNES, 2014). Desse modo, a utilização desses caracteres permite selecionar plantas vigorosas e com variabilidade desejada para o melhoramento. (LIMA et al., 2012). No entanto, informações sobre essas características ainda são escassas, sendo necessário estudos básicos com relação à caracterização e avaliação em germoplasmas de *Passiflora*. (FREITAS et al., 2011).

A caracterização fenológica de plantas de maracujá ainda é incipiente (SOUZA et al., 2012), esta análise é de suma importância para o melhoramento, principalmente em experimento de hibridação interespecífica, por gerar informações que facilitam a escolha de genitores em relação à época de florescimento (LAWINSCKI, 2010), o que permite fazer cruzamentos entre espécies que florescem no mesmo período do ano.

As análises físico-químicas também são importantes para caracterizar as espécies de *Passiflora*. Esta análise tem sido realizada para verificar as propriedades organolépticas dos frutos, possibilitando uma melhor classificação das coleções de germoplasmas para serem usadas em programas de melhoramento, garantindo a qualidade dos frutos para o mercado *in natura* ou indústria. (JUNQUEIRA et al., 2010). Esta característica tem importância, pois o consumidor avalia o fruto por sua aparência (KRAUSE et al., 2012), desta forma um fruto de qualidade deve apresentar características internas (sólidos solúveis, acidez e rendimento) e externas (cor da casca, tamanho, peso, ausência de defeitos dos frutos) boas para atender o mercado consumidor (OCAMPO et al., 2013).

Os marcadores moleculares estão sendo usados na caracterização de recursos genéticos (SOUZA, 2015), em estudos de diversidade genética, construção de mapas de ligação (KALENDAR et al., 2011), filogenético e sistemática, ecologia molecular, biologia de conservação, teste de paternidade (POCZAI et al., 2013). Dentre os marcadores existentes destaca-se os microssatélites ou SSR (Sequência Simples Repetida). Estes marcadores apresentam frequentemente níveis elevados de polimorfismo intra e interespecífico (ARIF et al., 2010), e possuem atributos desejáveis como hipervariabilidade, codominante, reprodutível e abundante no genoma (PARIDA et al., 2009).

Portanto, é importante caracterizar espécies silvestres e comerciais para que possa obter maiores informações em relação a seu crescimento, qualidade física e química de frutos para uso em programas de melhoramento genético. Dessa forma, objetivou-se caracterizar de forma agrônômica, fenológica e físico-química as espécies *Passiflora suberosa*, *Passiflora alata*; *Passiflora maliformis*; *Passiflora quadrangularis*; *Passiflora foetida*; *Passiflora mucronata*; *Passiflora cincinnata* para averiguar o potencial dessas espécies para serem usadas em programas de melhoramento genético. Caracterizar os híbridos BRS Rubi do Cerrado; BRS Gigante Amarelo e BRS Pérola do Cerrado em

relação ao seu desenvolvimento e qualidade dos frutos no Estado do Espírito Santo na cidade de Alegre.

2. Material e Métodos

A caracterização vegetativa e dos frutos das espécies foi realizada em quatro genótipos comerciais e seis espécies de maracujazeiros silvestres descritos na Tabela 2. Os experimentos I e II foram realizados na área experimental do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição da montagem dos experimentos I e II com as espécies, época de plantio e avaliação, delineamento experimental.

Experimento I			
Espécies	Época de plantio	Época de avaliação	Delineamento
<i>Passiflora suberosa</i>			
<i>Passiflora alata</i>			
BRS Rubi do Cerrado	Dezembro de 2015	12 meses (fevereiro de 2016 a 2017)	DBC (Blocos Casualizados) Com quatro blocos e com uma planta por parcela, totalizando 20 plantas
BRS Gigante Amarelo			
BRS Pérola do Cerrado			
Experimento II			
<i>Passiflora cincinnata</i>			
<i>Passiflora quadrangularis</i>			
<i>Passiflora maliformis</i>	Maio de 2016	12 meses (junho de 2016 a 2017)	DBC (Blocos Casualizados) Com três blocos e com uma planta por parcela, totalizando 21 plantas
<i>Passiflora foetida</i>			
<i>Passiflora mucronata</i>			
BRS Rubi do Cerrado			

As plantas foram conduzidas usando o sistema em espaldeira vertical, com fios de arame liso nº 12, com 2 m de altura em relação ao solo, sendo conduzido apenas um ramo principal de cada espécie. As mudas foram obtidas em casa de vegetação a partir de sementes obtidas da EMBRAPA (dos híbridos comerciais, *P. cincinnata* e *P. maliformis*).

Para as demais espécies as sementes foram oriundas de coletas realizadas em campo no estado do Espírito Santo. As sementes foram semeadas em bandejas de isopor, após 30 dias de germinadas foram transferidas para tubetes (120 cm³), e após 22 dias foram transplantadas para vasos (5 L), permanecendo por 20 dias e, posteriormente, transplantadas para vasos de 110 L, para ter um maior controle de irrigação, pragas e doenças do solo e adubação. As adubações foram feitas de acordo com a análise de solo para cada experimento, e ao longo da condução da cultura foram feitas adubações de acordo com a necessidade das plantas.

Foi realizada a poda do ramo ortotrópico (ramo secundário) para a formação dos ramos plagiotrópicos (ramo terciário), dos quais emitiram as flores e os frutos. A poda foi realizada quando o ramo ortotrópico atingiu em torno de 10 m, que foi após 210 dias nas espécies comerciais. A espécie *P. suberosa* não foi podada, por não atingir o tamanho. Nas espécies silvestres, a poda foi realizada entre 210 a 270 dias após a instalação do experimento, em decorrência das diferenças de crescimento entre espécies.

Os comportamentos vegetativos e reprodutivos foram analisados mensalmente após a instalação do experimento. As características vegetativas avaliadas foram: comprimento do ramo ortotrópico até a data da poda (CRO, m); comprimento do ramo plagiotrópico (CRP, m); diâmetro do ramo ortotrópico (DRO, mm) e plagiotrópico (DRP, mm); comprimento entre nós (CEN, cm); comprimento da folha (CF, cm); largura da folha (LF, cm) dos ramos ortotrópico e plagiotrópico; número de ramos plagiotrópicos (NRP). O número de frutos foi contabilizado durante o ano.

Os híbridos BRS Rubi do Cerrado, BRS Gigante Amarelo e BRS Pérola do Cerrado; as espécies *P. foetida*, *P. suberosa*, *P. alata*, *P. maliformis*, *P. mucronata* produziram frutos durante o ano de avaliação, e foi realizada a caracterização dos mesmos. As espécies *P. quadrangularis* e *P. cincinnata* não produziram frutos no período de avaliação. Foram avaliadas as características: peso do fruto (g); peso da polpa com sementes (g); rendimento de polpa (%): peso da polpa/peso do fruto * 100; números de sementes; diâmetro longitudinal (mm); diâmetro transversal (mm); espessura da casca (mm) e massa da casca (g). Para a análise química da polpa dos frutos foram utilizadas três repetições por amostra por espécie. Para cada amostra foi feita uma mistura de polpas oriundas de 3 a 10 frutos por planta individual, devido ao fato de algumas espécies não produzirem frutos na mesma quantidade. Também foram realizadas três replicatas por amostra. As variáveis mensuradas

na polpa foram: sólidos solúveis (SS), pH e vitamina C, avaliadas de acordo com AOAC (1998). A acidez titulável foi medida de acordo com o Instituto Adolfo Lutz. (IAL, 2008).

A presença ou ausência de flores e frutos foi observada do primeiro ao 12º mês de avaliação e anotada de forma binária nos dois experimentos sendo feita a codificação dos dados com presença (1) e ausência (0) de florescimento e de frutificação.

A matriz de dissimilaridade foi obtida utilizando a distância de coincidência simples, gerada pelo programa Genes (CRUZ, 2016) e foi realizado o agrupamento Vizinho mais distante. O teste de Tukey e as análises gráficas foram realizados no ambiente R (2016), utilizando-se o pacote ExpDes.pt. A curva de crescimento foi realizada com o acumulado de um mês para o outro até a poda.

Para análise molecular foi realizada a extração do DNA das espécies de acordo com o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) com modificações. A qualidade e concentração de DNA foram verificadas por meio de leitura da absorbância a 260 e 280 nm, utilizando-se um espectrofotômetro. Foram analisados dez marcadores microssatélites, seis desenvolvidos para *Passiflora edulis* (PE74; PE64; PE18; PE15; PE75; PE88) e os outros quatro para *Passiflora alata* (PA 05; PA07; PA10; PA08). As condições de amplificação foram: 30 ng de DNA; master mix (500 µL PCR Go Taq Flexi; 200 µL dNTP (10 mM); 200 µL BSA (20 mg/mL); 62.5 µL Taq comercial); 1,16 µM de primer em um volume final de reação de 12,5 µL. A amplificação foi realizada utilizando-se em termociclador e programa com etapa de desnaturação a 94 °C por 4 min seguido de 8 ciclos, anelamento 55-65 °C (de acordo com cada primer) por 40 s, extensão a 72 °C por 50 s. Seguido de 28 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 58 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min; extensão final a 72 °C por 7 minutos. A matriz de dados moleculares foi obtida de acordo a codificação dos alelos presentes em cada *locus* por espécie dos 10 primers. A matriz de distância foi gerada pela distância euclidiana, e foi obtida por transformação de índice de complemento e o agrupamento utilizado foi o UPGMA. (CRUZ, 2016).

Tabela 2. Descrição das espécies comerciais e silvestres do gênero *Passiflora*.

Espécies/Subgênero	Potencial/Uso	Alógama/Autógama NC*	Referências
<i>P. suberosa</i> / Decaloba	Porta-enxerto, Medicinal, Resistência	Autógama NC: 24	Kidoy et al. (1997); Junqueira et al. (2005); Aguiar (2011); Gomes (2013);Gosmann et al. (2011)
<i>P. foetida</i> / Passiflora	Ornamental, Porta-enxerto, Medicinal, Resistência/Tolerância	Autógama NC: 20	Ingale; Hivrle (2010); Santos et al. (2011); Alexandre et al. (2013)
<i>P. alata</i> / Passiflora	Ornamental, Porta-enxerto, Medicinal, Resistência/ Tolerância, Potencial comercial	Alógama NC: 18	Meletti et al. (2003); Alexandre et al. (2013); Morgado et al. (2015); Santos et al. (2016)
<i>P. mucronata</i> Passiflora	Ornamental, Porta-enxerto, Resistência/Tolerância	Alógama NC: 18	Meletti et al. (2011); Alexandre et al. (2013); Hurtado-Salazar et al. (2015); Morgado et al. (2015); Ocampo et al. (2016)
<i>P. cincinnata</i> / Passiflora	Porta-enxerto, Medicinal, Resistência/Tolerância Potencial comercial	Alógama NC:18	Junqueira et al. (2005); Agra et al. (2007);
<i>P. maliformis</i> / Passiflora	Porta-enxerto, Medicinal, Resistência/Tolerância Potencial comercial	Alógama NC: 18	Fischer et al. (2010); Ramaiya et al. (2014)
<i>P. quadrangularis</i> / 	Porta-enxerto, Medicinal,	Alógama	Seaforth et al. (1983); Oliveira;

Passiflora	Resistência/Tolerância/Potencial comercial	NC: 18	Ruggiero (1998); Silva et al. (2005)
BRS Rubi do Cerrado (RC) (<i>P. edulis</i> azedo-roxo x <i>P. alata</i> x <i>P. edulis</i> azedo-amarelo)	Genótipo comercial obtido por seleção recorrente e avaliação de híbridos inter e intraespecíficos	Alógama NC: 18	EMBRAPA (2012)
BRS Gigante Amarelo (GA) (<i>P. edulis</i> flavicarpa x <i>P. edulis</i> flavicarpa)	Genótipo comercial obtido por seleção recorrente e avaliação de híbridos intraespecíficos	Alógama NC: 18	Braga et al. (2008)
BRS Pérola do Cerrado <i>Passiflora setacea</i>	Genótipo comercial obtido por seleção massal de população de acessos silvestres de diferentes origens	Alógama NC: 18	EMBRAPA (2013)

*NC: número cromossômico.

3.

Resultados

O híbrido intraespecífico BRS Gigante Amarelo (GA) apresentou as maiores médias para diâmetro do ramo ortotrópico largura de folhas no ramo plagiotrópico. (Tabela 3). O híbrido interespecífico BRS Rubi do Cerrado (RB) apresentou maiores CF e LF no ramo ortotrópico e maiores comprimentos dos ramos ortotrópico e plagiotrópico. *Passiflora alata* teve maior comprimento do ramo plagiotrópico, maior diâmetro do ramo plagiotrópico e maior CF para ramo ortotrópico e plagiotrópico. O híbrido BRS Pérola do Cerrado (*P. setacea*) apresentou menor CRO em relação aos demais genótipos comerciais, entretanto o CRP foi similar aos demais comerciais (*P. alata* e BRS Gigante Amarelo). A espécie *P. alata* e os híbridos BRS Rubi do Cerrado e BRS Pérola do Cerrado apresentaram tamanho similar do DRO, sugerindo utilização dos mesmos como porta-enxerto. A espécie silvestre *P. suberosa* apresentou as menores médias para todas as características vegetativas avaliadas, entretanto o crescimento dos ramos plagiotrópicos foi em torno de 20 vezes maior que o CRO, diferente das demais comerciais que apresentaram CRP em torno de oito vezes maior que CRO. As espécies comerciais apresentaram os comprimentos de entrenós (CEN) similares (em torno de 10 cm), superiores ao apresentado por *P. suberosa* (4,62 cm). A partir dos entrenós surgem os ramos produtivos (plagiotrópicos), porém o NRP não diferiu entre as espécies comerciais e a silvestre.

No experimento II as espécies *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. cincinnata*, *P. quadrangularis*, *P. mucronata* e o híbrido interespecífico BRS Rubi do Cerrado não diferiram para as variáveis CRO, CRP, DRO e NRP. A semelhança na característica DRO, sugere a utilização destas espécies como porta-enxerto. O híbrido comercial BRS Rubi do Cerrado apresentou as maiores médias para CF e LF para os ramos ortotrópico e plagiotrópico e CEN. As espécies silvestres apresentaram menores médias para CEN. *Passiflora quadrangularis* apresentou maiores valores para DRP e CF do ramo plagiotrópico. Os caracteres dos ramos plagiotrópicos DR, CF e LF permitiram verificar maior diferença entre as espécies.

Tabela 3. Média das variáveis de crescimento vegetativo de espécies silvestres e dos híbridos comerciais do gênero *Passiflora*, realizado na cidade de Alegre -ES na área experimental do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo, no ano de 2016 a 2017.

Espécies comerciais e silvestres	EXPERIMENTO I									
	CRO (m)	CRP (cm)	DRO (mm)	DRP (mm)	CEN_RO (cm)	CF_RO (cm)	LF_RO (cm)	CF_RP (cm)	LF_RP (cm)	NRP
<i>P. suberosa</i>	2,13 c ⁽¹⁾	40,57 b	4,82 c	1,25 c	4,62 b	7,52 b	8,45 b	7,69 c	6,65 c	32,50
<i>P. alata</i>	10,95 ab	82,95 a	16,80 b	4,52 a	11,25 a	17,1 a	12,45 b	12,8 a	8,51 bc	27,25
BRS Gigante Amarelo	12,91 a	63,75 ab	30,49 a	4,32 ab	11,62 a	19,8 a	30,62 a	11,04 ab	13,65 a	37,25
BRS Rubi do Cerrado	11,61 a	84,16 a	22,66 b	3,46 b	10,7 a	17,32 a	26,17 a	6,90 c	8,25 bc	29,00
BRS Pérola do Cerrado	8,51 b	63,91 ab	16,45 b	4,45 a	10,25 a	11,45 b	14,2 b	10,97 b	11,00 ab	30,12
EXPERIMENTO II										
<i>P. maliformis</i>	9,08 a	47,11 a	9,24 a	3,04 c	5,61 b	12,63 a	7,5 b	9,46 b	5,67 c	26,66
<i>P. foetida</i>	10,95 a	57,33 a	9,28 a	1,32 d	6,05 b	9,61 ab	11,37 ab	4,93 d	4,53 c	18,00
<i>P. cincinnata</i>	8,05 a	40,83 a	7,94 a	2,86 c	5,5 b	10,55 ab	14,6 ab	7,26 c	11,80 a	17,33
<i>P. quadrangulares</i>	5,91 a	42,88 a	9,72 a	4,80 a	5,72 b	10,37 ab	10,5 ab	12,23 a	9,57 b	16,33
<i>P. mucronata</i>	9,74 a	63,33 a	6,043 a	3,02 c	6,00 b	7,54 b	5,46 b	6,17 cd	4,29c	13,00
BRS Rubi do Cerrado	9,70 a	57,11 a	10,33 a	3,58 b	8,88 a	13,21 a	20,05 a	10,58 ab	11,89 a	27,00

Legenda: CRO: comprimento do ramo ortotrópico; CRP: comprimento do ramo plagiotrópico; DRO: diâmetro do ramo ortotrópico; DRP: diâmetro do ramo plagiotrópico; CEN: comprimento entrenó; CF_RO: comprimento da folha do ramo ortotrópico; LF_RO: largura da folha do ramo ortotrópico; CF_RP: comprimento da folha do ramo plagiotrópico; LF_RP: largura da folha do ramo plagiotrópico; NRP: número de ramos plagiotrópicos. ⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

A curva de crescimento vegetativo acumulado das espécies comerciais e silvestres está demonstrada na Figura 1 (1 e 1C). O crescimento acumulado para as espécies comerciais (Fig 1 A) foi semelhante para os híbridos BRS Gigante Amarelo e BRS Rubi do Cerrado. *Passiflora alata* apresentou crescimento linear até 180 dias e, posteriormente, apresentou declínio. O híbrido Pérola do Cerrado apresentou crescimento menor em relação aos demais comerciais. *Passiflora suberosa* cresceu somente até os 60 dias. No experimento II todas as espécies apresentaram curva linear de crescimento do ramo ortotrópico. (Fig. 1C). *Passiflora foetida* e *P. mucronata* apresentaram curva e crescimento similares, embora *P. foetida* tenha apresentado desenvolvimento mais rápido, sendo podada após 210 dias. *Passiflora maliformis* e o híbrido BRS Rubi do Cerrado apresentaram curva de crescimento acumulado intermediário, sendo que o híbrido cresceu mais rápido. *Passiflora cincinnata* e *P. quadrangularis* tiveram o menor incremento de crescimento. (Fig 1C).

As espécies comerciais apresentaram um período do ano sem flor e fruto em torno de quatro meses, no entanto, após a poda os híbridos intra e interespecíficos e *P. setacea* apresentaram aumento da floração e da frutificação. (Fig. 1B). *Passiflora suberosa* floresceu e frutificou o ano todo. No segundo experimento *Passiflora foetida* permaneceu em fase reprodutiva durante o ano todo, com flores e frutos. Da mesma forma *P. mucronata* apresentou flor e fruto durante 11 meses e dois meses com flores. *Passiflora maliformis* e o híbrido BRS Rubi do Cerrado apresentaram florescimento e frutificação em torno de seis meses do ano, principalmente na primavera e verão. *Passiflora cincinnata* e *P. quadrangularis* apresentaram maior período com flores, principalmente na primavera e com flores e frutos no verão e outono, sendo que *P. cincinnata* apresentou frutos só no outono. (Fig. 1D).

De acordo com o agrupamento verificou-se a formação de três grupos. O primeiro formado pelas espécies *P. alata*, *P. suberosa* e *P. foetida*, que apresentaram períodos semelhantes de florescimento e frutificação, sendo que *P. alata* coincide com *P. suberosa* entre o período de 180 a 360 dias, e em relação a *P. foetida* é de 60 a 270 dias após a implementação do experimento. O segundo foi formado pelas espécies comerciais o híbrido GA, híbrido RC, com período de maior semelhança entre 180 a 360 dias. O terceiro grupo formado por *P. setacea* e as silvestres *P. quadrangularis*, *P. mucronata*, *P. maliformis*, *P. cincinnata* e híbrido RC com período semelhante entre 120 a 360 dias após a implementação.

As espécies *P. suberosa* e *P. foetida* apresentaram o maior número de frutos e menor peso de frutos. Nos genótipos comerciais os híbridos BRS Gigante Amarelo e Rubi do Cerrado apresentaram maiores quantidades de frutos em relação aos demais, sendo que o Gigante e Rubi apresentaram maior peso de frutos com 244 e 207 g, respectivamente. (Figura 3).

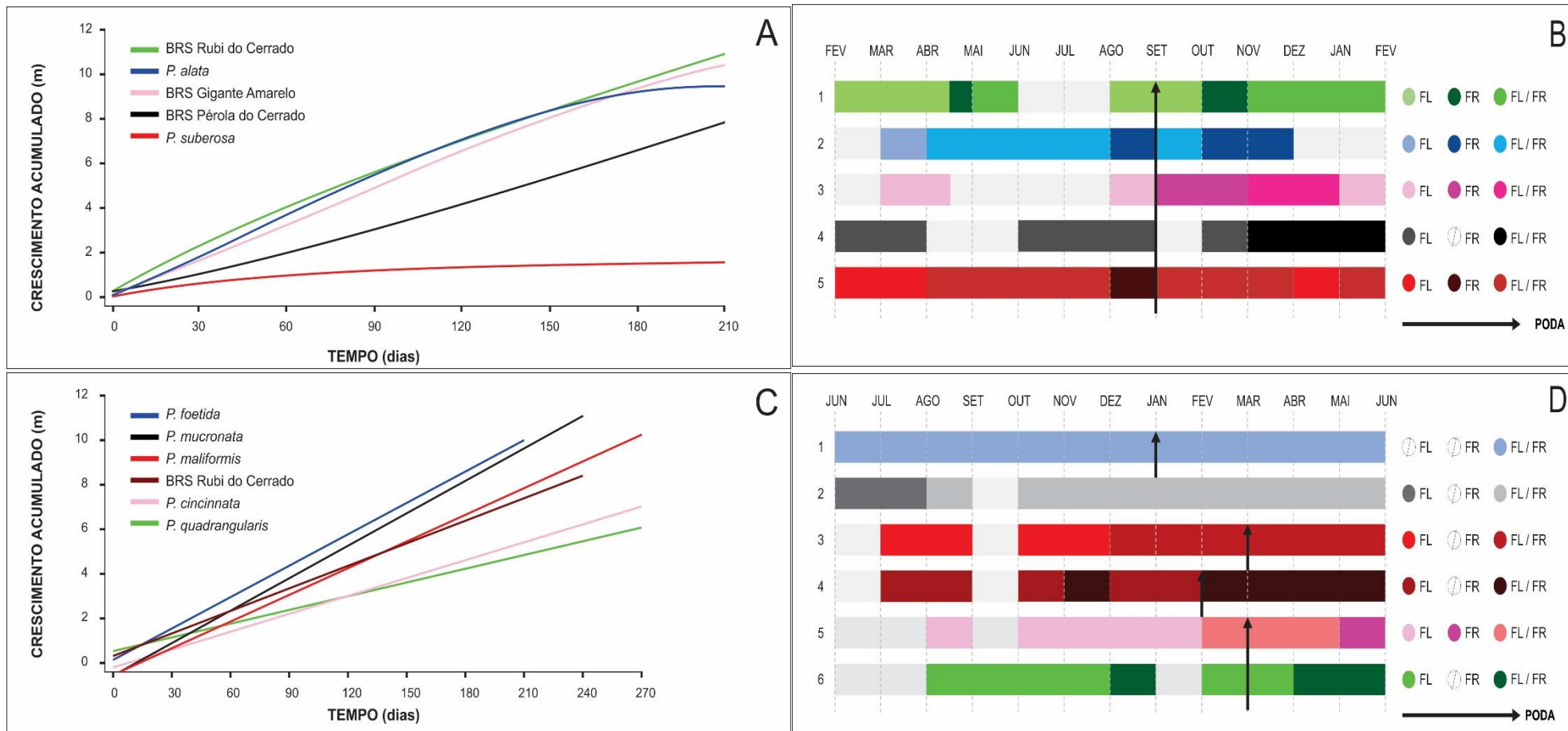


Figura 1. Curva de crescimento vegetativo acumulado do ramo ortotrópico até a data da poda (A e B), e período de florescimento (FL) e frutificação (FR) durante um ano (B; D) dos híbridos comerciais (BRS Gigante Amarelo; BRS Rubi do Cerrado; BRS Pérola do Cerrado) e espécies silvestres (*P. suberosa*; *P. alata*; *P. maliformis*; *P. foetida*; *P. cincinnata*; *P. quadrangularis*; *P. mucronata*). B: 1: BRS Rubi do Cerrado; 2: *Passiflora alata*; 3: BRS Gigante Amarelo; 4: BRS Pérola do Cerrado; 5: *Passiflora suberosa*, respectivamente) (D: 1: *P. foetida*; 2: *P. mucronata*; 3: *P. maliformis*; 4: BRS Rubi do Cerrado; 5: *P. cincinnata*; 6: *P. quadrangularis*, respectivamente.).

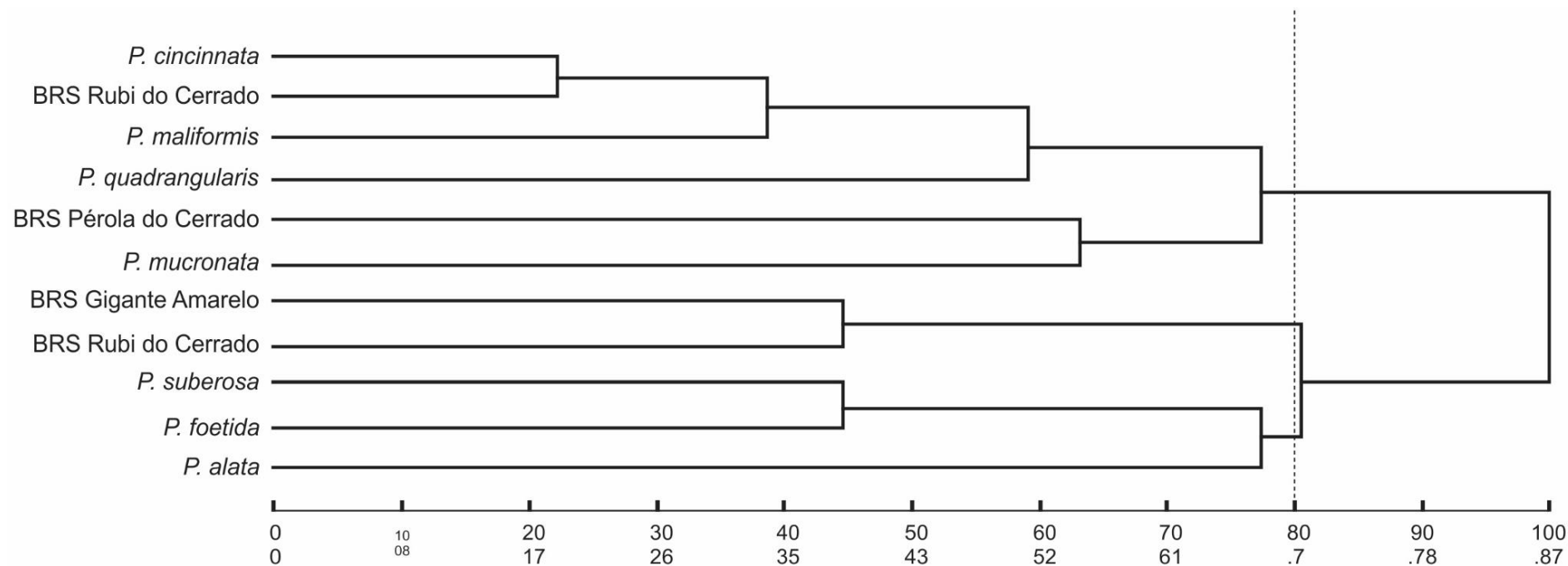


Figura 2. Agrupamentos das espécies comerciais e silvestres do gênero *Passiflora* quanto ao período de florescimento e frutificação. Utilizou-se a distância de coincidência simples, a matriz de distância foi por dissimilaridade e o agrupamento foi vizinho mais distante, usando o programa Genes (2016). O ponto de corte foi feito de acordo com o Mogená.

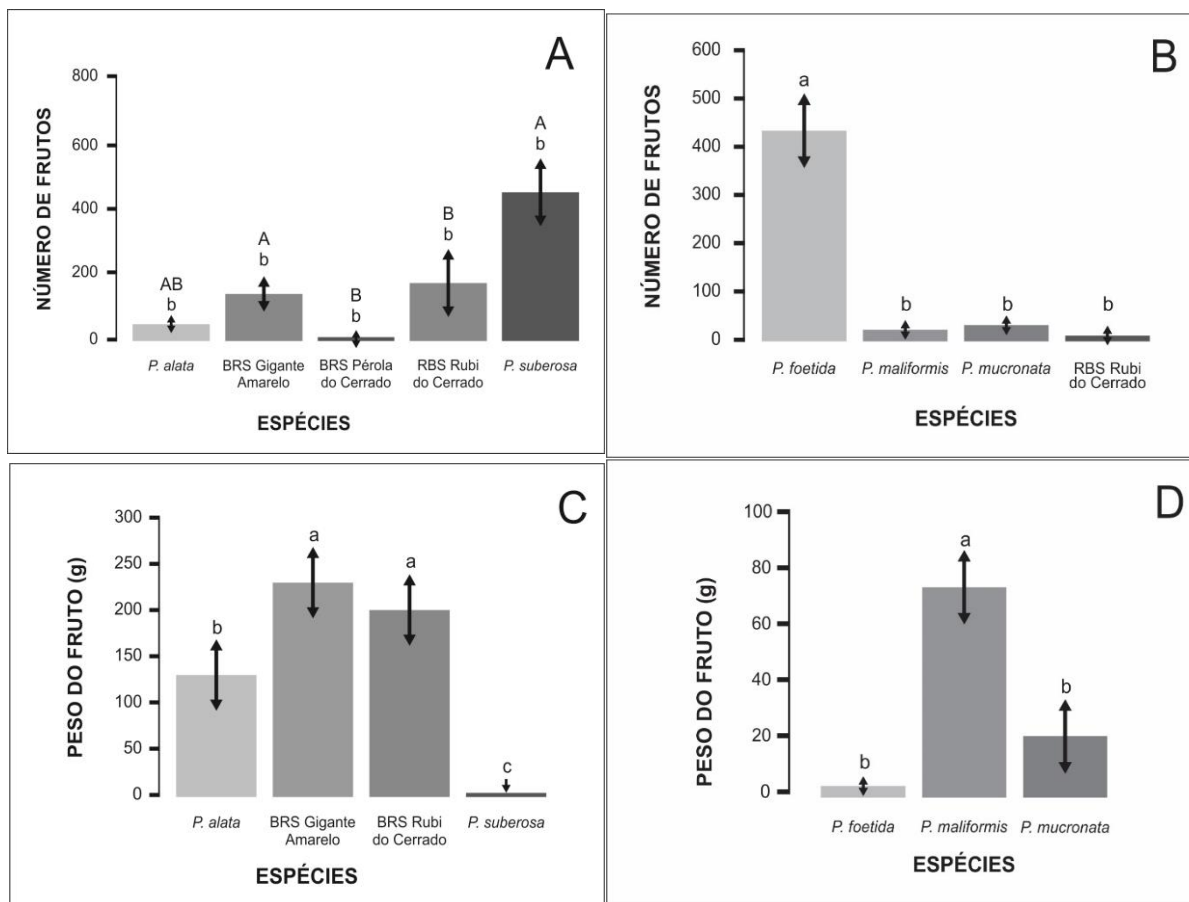


Figura 3. Número total de frutos (A) para *Passiflora suberosa*; *Passiflora alata*; BRS Gigante Amarelo; BRS Rubi do Cerrado; BRS Pérola do Cerrado; Número total de frutos (B) para *P. maliformis*; *P. foetida*; *P. mucronata* e BRS Rubi do Cerrado. Peso dos frutos para as espécies (C) para *Passiflora suberosa*; *Passiflora alata*; BRS Gigante Amarelo; BRS Rubi do Cerrado; Peso dos frutos (D) para *P. maliformis*; *P. foetida*; *P. mucronata*. As letras maiúsculas entre as espécies comerciais (A) diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey. E, as letras minúsculas entre as espécies comerciais e silvestres diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

As variáveis de caracterização dos frutos estão apresentadas na Tabela 4. Diferenças significativas foram detectadas entre as espécies quanto ao peso do fruto, peso da polpa e ao diâmetro transversal. No primeiro experimento a espécie *P. suberosa* diferiu-se das demais espécies comerciais em todos os caracteres físicos dos frutos.

Os híbridos GA e RC apresentaram maior PP e DT, respectivamente. No entanto, GA apresentou maior PF (244,57 g) e maior DL (97,54 mm). Com relação ao NS e MC não houve diferença significativa entre os genótipos GA, RC e *P. alata*. Para

o rendimento de polpa, a média geral foi de 43,39%, tendo uma variação de 29 a 63% entre as espécies.

Para as características SS e pH houve diferença significativa entre *P. alata* com os híbridos GA e RC, porém, os híbridos não diferiram entre si. As características AT e vit C não diferiram entre as espécies comerciais.

No segundo experimento, somente as espécies *P. maliformis*, *P. mucronata* e *P. foetida* apresentaram frutos durante o ano de avaliação. A variável DT diferiu em todas as espécies. *Passiflora maliformis* apresentou maiores valores para PF, PP, EC e MC e menor valor para rendimento da polpa (% PS). *Passiflora foetida* apresentou menores valores de NS, DL e DT. As espécies *P. foetida* e *P. mucronata* não diferiram quanto a PF, % PS, EC e MC. Enquanto *P. maliformis* e *P. mucronata* não diferiram quanto a NS e DL. O rendimento médio de polpa foi de 60,04% entre as três espécies. *Passiflora foetida* e *P. mucronata* não diferiram quanto às variáveis: SS, AT, Vit C e pH.

Quanto à análise com marcadores microssatélites verificou-se a formação de quatro grupos. (Figura 4). Um formado pelas espécies *P. suberosa* e *P. foetida*; outro pelas espécies *P. maliformis* e *P. cincinnata*; outro por *P. alata* e *P. quadrangulares*; e o último formado pelos comerciais (Híbridos intra e interespecíficos e *P. setacea*) e *P. mucronata*.

Tabela 4. Médias da caracterização física e química dos frutos das espécies nativas e comerciais do gênero *Passiflora*, realizadas na cidade de Alegre -ES na área experimental do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo, no ano de 2016 a 2017.

Espécies e/ ou híbridos	EXP I											
	PF (g)	PP (g)	-RP (%)	NS	DL (mm)	DT (mm)	EC (mm)	MC (g)	SST	AT	Vit C	pH
<i>P. suberosa</i>	0,50 c ⁽¹⁾	0,32 c	63.07 a	18.86 b	9.53 c	9.04 d	0.05 b	0.13 b	-----	-----	-----	-----
<i>P. alata</i>	137,36 b	38,62 b	29.68 c	221.68 a	82.97 b	64.64 c	9.40 a	98.22 a	22.55 a	0.3a	34.91 a	3.33 a
BRS GA	244,57 a	107,46 a	43.61 b	277.67 a	97.54 a	88.24 a	11.91 a	134.94 a	13.39 b	0.344 a	52.20 a	2.66 b
BRS RC	207,29 ab	83,29 a	37.02 bc	208.45 a	92.48 ab	76.86b	7.87 ab	123.28 a	14.72 b	0.33 a	59.25 a	2.73 b
EXP II												
<i>P. maliformis</i>	69.88 a	31.34 a	43.09 b	209.14 a	68.09 a	58.81 a	3.52 a	37.74 a	-----	-----	-----	-----
<i>P. foetida</i>	2.83 b	2.08 b	73.04 a	29.75 b	23.11 b	17.76 c	0.31 b	0.64 b	17.91 a	1.45 a	37.50 a	3.28 a
<i>P. mucronata</i>	20.32 b	13.10 ab	64.00 a	214.76 a	55.42 a	26.77 b	1.01 b	6.73 b	17.89 a	1.23 a	26.50 a	2.37 a

PF: peso do fruto; PP: peso da polpa com semente; PS: porcentagem de rendimento da polpa com semente; NS: número de sementes; DL: diâmetro longitudinal; DT: diâmetro transversal; EC: espessura da casca; MC: massa da casca; SS: sólidos solúveis (brix); AT: acidez titulável; Vit C: vitamina C. ⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

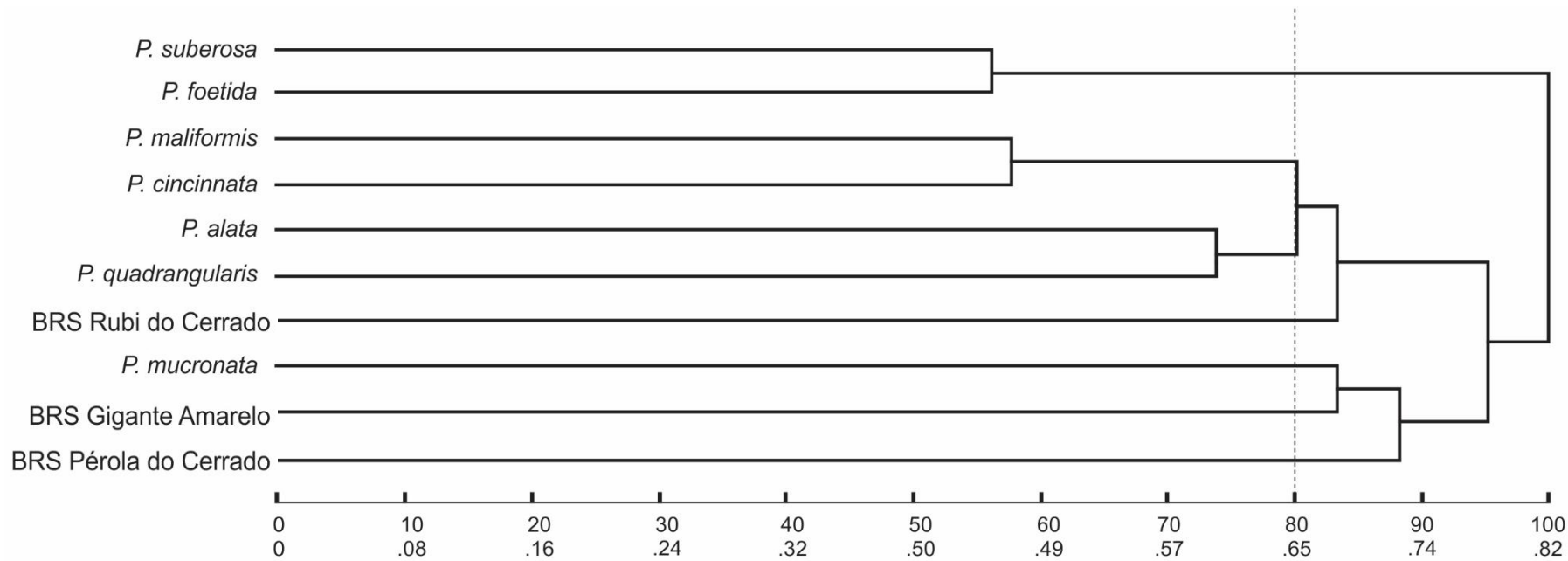


Figura 4. Agrupamento UPGMA obtido a partir da análise de dez microssatélites das espécies comerciais (BRS Gigante Amarelo, Rubi do Cerrado e *P. setacea*) e silvestres (*P. suberosa*, *P. alata*, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. cincinnata*, *P. quadrangularis*, *P. mucronata*) do gênero *Passiflora*. Utilizou-se a distância euclidiana, a matriz de distância foi por similaridade e o agrupamento foi UPGMA, usando o programa Genes (2016). O ponto de corte foi feito de acordo com o Mogená.

4. Discussão

Por meio da análise morfológica das plantas verificou-se variabilidade genética existente entre as espécies. As características de maior variabilidade entre espécies foram DRP, CF_RP e LF_RP para as espécies silvestres e comerciais. (Tabela 3). Esta variabilidade existente é passível de exploração para o melhoramento genético de *Passiflora*, como foi verificado em 113 acessos de maracujá-amarelo para as características de número de frutos, peso de frutos, comprimento de frutos, largura de frutos e espessura de casca. (GONÇALVES et al., 2007). Uma elevada variabilidade genética permite estabelecer estratégias de seleção, favorecendo alelos favoráveis na população, como foi verificado por Oliveira et al. (2008) entre e dentre progênes de meios-irmãos de maracujá-amarelo para as características peso de fruto, rendimento de polpa, comprimento dos frutos e número de frutos.

A característica DRO apresenta importância no melhoramento por permitir uso de espécies como porta-enxertos, e também ser considerada indicativo de vigor na planta. (MENEZES, 1990; KIMURA, 1994). Desta forma, o híbrido GA pode ser considerado uma planta vigorosa por ter apresentado maior diâmetro em relação às espécies comerciais. No entanto, *P. alata*, híbrido RC e *P. setacea* não diferiram nesta característica, bem como as espécies silvestres do experimento II também não diferiram. Assim, essas espécies podem ser usadas como porta-enxertos, uma vez que todas possuem relatos de resistência ou tolerância às doenças, como observado por Oliveira et al. (2013) em acessos de *P. alata* e *P. cincinnata* que foram resistentes a verrugose dos ramos. Oliari et al. (2016) observaram que a espécie *P. mucronata* pode ser utilizada como porta-enxerto por ser resistente a *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, conforme verificado por Machado et al. (2015). O diâmetro é considerado um indicativo de vigor da planta (CAVICHOLI et al., 2011), sendo importante para enxertia, principalmente porque pegamento entre porta-enxerto e enxerto depende da uniformidade dos diâmetros, que vai permitir maior equilíbrio na circulação de seiva, e consequentemente, um bom desempenho da planta enxertada (NOGUEIRA FILHO et al., 2010). Em estudo com minienxertia com diferentes enxertos e porta-enxertos Alexandre et al. (2013) observaram que a combinação *P. alata* x *P. edulis* f. *flavicarpa*, apresentou porcentagem de pegamento de 68%, devido à diferença do caule entre as

duas espécies, e entre *P. foetida* x *P. edulis* f. *flavicarpa*, foi de 90%, devido ao rápido estabelecimento entre os tecidos.

O maracujazeiro também necessita de outros fatores como intensa luminosidade para que possa ter um crescimento vegetativo vigoroso, maior taxa de florescimento, maior vingamento de frutos por ser uma planta tropical. (COSTA, 2005). A luminosidade pode ter influenciado o desenvolvimento do híbrido RC, que foi cultivado nos dois experimentos, em duas épocas distintas. No primeiro experimento, com implementação em dezembro (verão), estação do ano de maior período de luminosidade, este híbrido apresentou maior crescimento vegetativo. No segundo experimento implantado em maio (outono) este híbrido apresentou crescimento mais lento, o que pode estar relacionado à redução da luminosidade e, portanto, redução de atividade fotossintética e vigor. Quanto maior o período de horas de luz maior será a atividade fotossintética, assim a planta apresentará maior vigor. (BORGES et al., 2009).

Todas as espécies apresentaram amplo período de florescimento e frutificação. Algumas espécies floresceram e frutificaram nos mesmos períodos como *P. suberosa* e *P. foetida*, BRS GA e RC, *P. quadrangularis* e *P. cincinnata*. (Figuras 1 e 2). A maioria das espécies floresceu na época de primavera e verão. Esta similaridade pode estar relacionada com o período de maiores horas de luz e também a temperatura adequada para floração que é de 21 a 25 °C (BORGES et al., 2009), e no local de estudo variou de 21 a 27 °C, considerada como a faixa adequada para o florescimento e frutificação. Outro fator que pode ter influenciado na frutificação é a poda, pois após a realização desta, verificou-se um maior período de frutificação nas espécies (Figura 1).

No experimento I com espécies comerciais e silvestre (*P. suberosa*) verificou-se período de florescimento e frutificação semelhante por seis meses entre os meses de agosto a fevereiro. No segundo experimento, com as espécies silvestres, este período foi similar de outubro a junho (oito meses). Meletti et al. (2011) observaram que *P. mucronata* floresceu de fevereiro a novembro na região de Monte Alegre do Sul e teve seu florescimento paralisado nos períodos de chuvas (dezembro e janeiro). Assim, foi possível observar o florescimento de julho a setembro, novembro a junho e não ocorreu florescimento no mês de outubro, o que evidencia a importância de conhecer o período fenológico das espécies para que se possa fazer cruzamentos. Fato que pode estar associado às diferenças das regiões nas quais as espécies são cultivadas.

Na análise de agrupamento as espécies *P. suberosa* e *P. foetida* que florescem e frutificam durante o ano todo foram agrupadas, junto com *P. alata* que passou a maior parte do ano em estágio reprodutivo. Wagner et al. (1990) também relataram em seu estudo o mesmo comportamento em relação ao florescimento de *P. foetida*. Entretanto, *P. suberosa* cultivada no Rio Grande do Sul apresentou florescimento apenas nos períodos de primavera, verão e outono. (MONDIN et al., 2011). Para *P. alata* em fragmentos de mata de tabuleiro verificou florescimento na época chuvosa (BENEVIDES, 2009), essa variação no ciclo fenológico dependendo do lugar de cultivo, pode estar relacionado às condições climáticas de cada região. No segundo grande grupo formado com base nos caracteres de florescimento e frutificação, pode-se verificar subdivisões, nas quais os híbridos GA e RC foram mais próximos e por apresentarem período de florescimento e frutificação semelhantes. As demais espécies *P. cincinnata*, *P. maliformis* e híbrido RC também foram mais proximamente agrupadas em comparação às *P. mucronata* e *P. quadrangularis*. Períodos similares de florescimento entre espécies podem favorecer hibridações interespecíficas. No melhoramento este conhecimento é importante para a escolha de genitores que apresentam florescimento sincronizado. (LAWINSCKI, 2010).

A maioria das espécies de maracujazeiros é alógama (Tabela 2) e apresenta autoincompatibilidade do tipo homomórfico-esporofítico. (BRUCKNER et al., 1995). Assim, para a produção de frutos é necessário a polinização cruzada, portanto a presença de mais de uma planta com flores. Como verificado para a espécie *P. edulis* f. *flavicarpa*, se recomenda nove indivíduos com genética diferente (BRUCKNER, PICANÇO, 2001), para que se tenha produção de frutos. Isto é observado nas espécies comerciais e nas espécies *P. maliformis* e *P. mucronata* que produziram quantidades menores de frutos em relação às espécies *P. suberosa* e *P. foetida* (Figura 3).

As espécies autógamas, *P. suberosa* e *P. foetida*, apresentaram maior número de frutos, o que pode ser explicado por serem autocompatíveis e florescerem durante todo o ano, assim propiciando maior produção. Acioli (2003) reportou que *P. suberosa* frutifica o ano todo e é autocompatível, e este processo de autofecundação em algumas espécies de angiospermas está relacionado a fatores de evolução, permitindo que a planta se reproduza sem agentes externos.

O fato de as espécies dependerem de um polinizador para a fecundação pode estar relacionado à quantidade de flores presentes nas plantas para atrair polinizadores, sendo necessário um grande número de flores de forma simultânea para se tornarem mais atraentes. (ACIOLI, 2003). Este pode ser um dos fatores que levaram a uma menor produção de frutos nas espécies estudadas, pois apesar de algumas apresentarem o mesmo período de florescimento, promovendo uma maior quantidade de flores no local e favorecendo a presença de polinizadores, em outras situações algumas plantas da mesma espécie apresentaram florescimento tardio, isso pode ter influenciado a polinização e a formação de frutos. Stephenson (1981) observou que o número de flores e a forma como elas estão agrupadas no tempo e no espaço alteram a atração dos polinizadores e o fluxo de pólen. Também foi observado por diversos autores que demonstraram que os insetos visitam mais flores, de forma sucessiva se os números de flores aumentarem (KLINKHAMER et al., 1993; HARDER; BARRETT, 1996; SNOW et al., 1996; UTELLI; ROY, 2000).

A caracterização física e química dos frutos indica se os frutos atendem o mercado consumidor, que exigem frutos de qualidade interna (sólidos solúveis, acidez, rendimento) e externa (tamanho, peso, cor da casca, ausência de defeitos). (OCAMPO et al., 2013). Quanto ao peso do fruto, as espécies comerciais apresentaram maior peso, com destaque para o híbrido GA, característica importante para os frutos destinados ao comércio de frutas frescas por apresentarem melhores preços. (NEVES et al., 2013). Frutos de maracujá para utilização *in natura* precisam ter peso médio acima de 180 g para garantir um bom valor comercial. (NEVES et al., 2013). Neste trabalho os híbridos apresentaram peso acima desse valor, e a espécie *P. alata* apresentou média próxima a esse valor, enquanto todas as silvestres apresentaram peso abaixo deste valor, portanto necessitando de melhoramento. Com relação às espécies silvestres os frutos de *P. maliformis* apresentaram potencial para comercialização e uso em melhoramento, por produzirem frutos com excelente qualidade de polpa e a casca rígida (SILVA, 2017) o que favorece o transporte.

Outra característica de fruto importante para o comércio *in natura* é o rendimento de suco, que é inversamente proporcional à espessura da casca. (FERREIRA et al., 2010). Os híbridos GA e RC apresentaram valores de rendimento de suco, semelhantes ao encontrado pela EMBRAPA, que foram de 40 e 35% para GA e

RC, respectivamente. Em relação às espécies silvestres *P. suberosa* e *P. foetida* apresentaram maior rendimento, no entanto com menores peso de fruto, o que não se enquadra como adequado ao mercado consumidor e para indústria. A espessura da casca também é importante, pois permite resistência ao transporte do fruto e podem ser usadas na indústria farmacêutica. Para o comércio é melhor frutos com cascas mais finas por terem maior rendimento em polpa, entretanto, frutos com maior espessura são mais resistentes ao transporte e às doenças de pós-colheita. (SANTOS et al., 2009).

O teor de SS pode ser considerado uma medida indireta da quantidade de açúcar presente na polpa. (GRECO et al., 2014). Todas as espécies apresentaram valores de SS acima de 11° Brix, este valor é o recomendado para frutos de maracujazeiro-amarelo para o comércio. (NEVES et al., 2013). Esta característica é importante para a indústria, porque para se produzir 1 Kg de suco concentrado a 50° Brix é necessário em torno de 11 kg de frutos com SST entre 11 e 12° Brix, então quanto maior o teor de SS menor será a quantidade de frutos necessários para concentrar o suco. (NASCIMENTO et al., 2003). Assim, houve variação entre 13,39 a 22,55° Brix para as espécies estudadas, sendo necessária uma menor quantidade de frutos para serem usados na produção de sucos concentrados. Os híbridos GA e RC apresentaram valores na faixa que foi encontrada pela EMBRAPA, sendo que, o recomendado é entre 13 a 15° Brix e o encontrado para o Gigante Amarelo foi de 13,39° Brix, e para Rubi do Cerrado foi de 14,72° Brix.

Para a AT todas as espécies apresentaram valor abaixo do mínimo recomendado que deve ser superior a 2,5. (MAPA, 2000). Este caráter é importante no processamento da fruta, pois a acidez adequada permite reduzir a adição de acidificantes no suco (NASCIMENTO et al., 1999), bem como a proliferação de microrganismos, favorecendo maior conservação do produto (NEGREIROS et al., 2008). Neste estudo verificou que todas as espécies apresentaram acidez baixa. Isto seria importante para mercado *in natura*, onde prefere frutos com acidez menor, ou seja, mais doce. (CAVICHOLI et al., 2008). A acidez dos frutos está relacionada com a presença de ácido cítrico, que tem influência das condições nutricionais e com a temperatura. (CAVICHOLI et al., 2008). Em relação à temperatura, quanto maior for a temperatura menor concentração de ácidos nos frutos. (RASMUSSEN et al., 1966; ALBRIGO, 1992). Então, pode-se verificar que a frutificação ocorreu em épocas com temperatura

média variando de 24 a 27 °C (primavera- verão), isto pode ter influenciado na acidez do fruto. Em estudo de caracterização físico-química de frutos de maracujazeiro amarelo verificaram que nos meses de maior temperatura (out-nov) teve uma menor quantidade de ácido cítrico, devido à alta taxa de transpiração dos frutos excedendo o ponto de compensação. (CAVICHOLI et al., 2008).

Com relação ao pH todas as espécies apresentaram valor adequado ao uso na industrialização de sucos, entre 2,5 e 3,5 (TOCCHINI et al., 1994), à exceção de *P. mucronata*. De acordo com a legislação brasileira, o pH deve estar dentro da faixa de 2,7 a 3,8 (MAPA, 2000), o que inclui os resultados das espécies de *P. foetida*, BRS Rubi do Cerrado e *P. alata*. Entretanto, o pH sofre influência dos fatores ambientais e da própria planta. (MEDEIROS et al., 2009).

O teor de vitamina C indica o valor nutritivo do fruto. Todas as espécies estudadas apresentaram teores elevados desta vitamina, entre 26,5 a 59,25 mg 100 g⁻¹. O maracujazeiro é considerado como boa fonte de vitamina C, apresentando de 15 a 40 mg 100g⁻¹.(GODOY et al., 2007). De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (NEPA, 2004), os valores encontrados foram acima do que é recomendado para *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, que é de 20mg 100g⁻¹.

O agrupamento para os dados de marcadores microssatélites, permitiu identificar similaridades genéticas entre as espécies *P. suberosa* e *P. foetida*, que também apresentaram comportamento similar quanto ao florescimento e à frutificação. Comportamento similar foi observado por Viana et al. (2003), em estudo de diversidade genética entre espécies nativas de *Passiflora* usando marcador RAPD, em que *P. foetida* e *P. suberosa* se agruparam. Em agrupamento com dados agromorfológicos de *Passiflora* spp. verificaram que *P. suberosa* e *P. foetida* também se agruparam mesmo apresentando alta divergência entre elas. (CROCHEMORE et al., 2003). As espécies *P. maliformis* e *P. cincinnata* também se agruparam e o mesmo foi observado no agrupamento de florescimento e frutificação onde as espécies apresentam períodos semelhantes e também características vegetativas onde já não diferem significativamente em todas as características, à exceção apenas no CF e LF do ramo plagiotrópico. O terceiro grupo formado por *P. alata* e *P. quadrangularis* não foi semelhante em todas as características avaliadas, no entanto, se agruparam com uso de marcador, demonstrando similariedade entre elas em nível de DNA. Em estudo de

relação genética entre espécies de *Passiflora* com marcadores AFLP verificou-se que no dendograma formado pelos acessos que *P. alata* e *P. quadrangularis* pertencem ao mesmo ramo do dendograma correspondente a Quadrangulares. (OCAMPO et al., 2004). O quarto grupo formado pelas comerciais e *P. mucronata*. Apesar de os híbridos serem bem distintos entre si, os híbridos GA e RC apresentaram semelhanças no período de floração e frutificação, nas características de crescimento vegetativo também foram semelhantes, apresentaram peso de frutos maiores e características químicas iguais. *P. setacea* e *P. mucronata* ficaram mais próximos no agrupamento de florescimento e frutificação e também na quantidade de frutos, demonstrando que *P. mucronata* apresenta maior similaridade genética em relação aos híbridos comerciais.

5. Conclusões

O comprimento e largura da folha do ramo plagiotrópico demonstram variabilidade existente entre as espécies *P. suberosa*, *P. alata*, BRS Gigante amarelo, BRS Rubi do cerrado, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. cincinnata*, *P. quadrangularis* e *P. mucronata*.

Os híbridos BRS Gigante Amarelo e Rubi do Cerrado podem ser plantados na região de Alegre - ES por apresentarem maiores peso de fruto, rendimento adequado, SS, pH e vitamina C dentro do que é recomendado por legislação.

As espécies apresentaram estímulo para a produção de frutos após a poda, à exceção de *P. foetida* e *P. suberosa*.

As espécies *P. suberosa*, *P. alata*, BRS Gigante amarelo, BRS Rubi do cerrado, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. cincinnata*, *P. quadrangularis* e *P. mucronata* apresentaram maior período de florescimento e frutificação na primavera e no verão. .

As espécies apresentam características químicas adequadas para a comercialização, e potencial para serem usadas no mercado de fruta fresca.

Dados moleculares demonstram similaridade genética entre as espécies *P. suberosa* e *P. foetida*; *P. maliformis* e *P. cincinnata*; *P. alata* e *P. quadrangularis*; BRS Gigante amarelo e BRS Pérola do cerrado, mesmo apresentando diferenças nas demais avaliações feitas.

6. Referências

- ACIOLI, M. F. Ecologia da polinização de *Passiflora suberosa* Linnaeus (Passifloraceae). 2003. 82f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*, v. 17, p.114-140, 2007.
- AGUIAR, A. V. M. de. Enxertia do maracujazeiro-amarelo sobre quatro porta-enxertos de *Passiflora* spp. 2011. 49f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2011.
- ALBRIGO, G. Influências ambientais no desenvolvimento de frutos cítricos. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE CITROS – FISILOGIA, 2., 1992, Bebedouro-SP. Anais... Campinas: Fundação Cargill, 1992. p.100-105.
- ALEXANDRE, R. S.; LOPES, J. C.; TIRADENTES, A. T.; BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. Metodologia de minienxertia em maracujazeiros. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 35, n. 1, p. 329-332, 2013.
- ANTUNES, R. de O. Seleção com base em características morfológicas no maracujazeiro azedo. 2014. 19 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Departamento de Produção Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, 2014.
- ARIF, I. A.; BAKIR, M. A.; KHAN, H. A.; AL FARHAN, A. H.; AL HOMAIDAN, A. A.; BAHKALI, A. H.; AL SADOON, M.; SHOBRAK, M. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 11, p. 2079-2096, 2010.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC international. 6. ed. Arlington: AOAC, 1998.
- ATAÍDE, E. M.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Florescimento e frutificação do maracujazeiro silvestre *Passiflora setacea* D. C. cultivado em Jaboticabal, SP. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, n. 2, p. 377-381, 2012.
- BRAGA, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BORGES, R. DE S.; COSTA, A. M.; *et al.* Híbrido de maracujazeiro-azedo de alta produtividade – BRS Gigante Amarelo. 2008.
- BENEVIDES, C. R.; GAGLIANONE, M. C.; HOFFMANN, M. Visitantes florais do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Passifloraceae) em áreas de cultivo com diferentes proximidades a fragmentos florestais na Região Norte Fluminense, RJ. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 53, p.415–421, 2009.
- 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, 2014. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil>.

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*, n. 370, p. 45-57, 1995.

BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. 1. ed. Porto Alegre: Cinco Continentes Editora, 2001. v. 1. 472p.

CAVICHIOLO, J. C.; CORREA, L. S.; BOLIANI A. C.; SNTOS P. C. Características físicas e químicas de frutos de maracujazeiro-amarelo enxertado em três porta-enxertos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.33, n.3, p. 906-914, 2011.

CAVICHIOLO, J. C.; RUGGIERO, C.; VOLPE, C. A. Caracterização físico-química de frutos de maracujazeiro-amarelo submetidos à iluminação artificial, irrigação e sombreamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 30, n. 3, p. 649-656, 2008.

CERVI, A. C.; RODRIGUES, W. A. Nomenclatura and taxonomic review of Passifloraceae species illustrated and described by Vellozo in Flora Fluminensis. *Acta Botanica Brasilica*. v.24, n.4, p.1109-1111, 2010.

COELHO, E. F.; SIMÕES, W. L. Produtividade do mamoeiro, cultivar Tainung n°1, sob diferentes manejos de irrigação nos tabuleiros costeiros do nordeste. *Magistra*, Cruz das Almas, v. 22, n. 1, p. 35-40, 2010.

COSTA, A. F. S.; ALVES, F. L.; COSTA, A. N. Plantio, formação e manejo da cultura do maracujá. In: COSTA, A.F.S.; COSTA, A.N. Tecnologias para produção de maracujá. Vitória, ES: Incaper, 2005. p.23-56.

CROCHEMORE, M. L.; MOLINARI, H. B.; STENZEL, N. M. C. Caracterização agromorfológica do maracujazeiro (*Passiflora* spp.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p.5-10, 2003.

Cruz, C. D. Genes Software - extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 38, n. 4, p. 547-552, 2016.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.

EMBRAPA. Caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro auxiliados por marcadores moleculares – fases I e II e Melhoramento genético do maracujazeiro (*Passiflora* spp.) visando a sua utilização diversificada e valoração da biodiversidade essencialmente brasileira. 2012. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/maracuja/inicio/>.

EMBRAPA. Caracterização e uso de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro auxiliados por marcadores moleculares’, ‘Melhoramento genético do maracujazeiro (*Passiflora* spp.) visando a sua utilização diversificada e valoração da biodiversidade essencialmente brasileira’ e ‘Desenvolvimento tecnológico de passifloras silvestres – PASSITEC’. 2013. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/maracuja/inicio/>.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; OLIVEIRA, E.J.; PEIXOTO, J.R., COSTA, A.M. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro: histórico e perspectivas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. 36 p. (Documentos/Embrapa Cerrados Nº 307).

FERREIRA, F. M.; NEVES, L. G.; BRUCKNER, C. H.; VIANA, A. P.; CRUZ, C. D.; BARELLI, M. A. A. Formação de super-caracteres para seleção de famílias de maracujazeiro amarelo. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 2, n. 32, p. 247-254, 2010.

FISCHER, I. H.; ALMEIDA, A. D.; FILETI, M. D. S.; BERTANI, R. D. A.; ARRUDA, M. D.; BUENO, C. J. Avaliação de Passifloraceas, fungicidas e *Trichoderma* para o manejo da Podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 32, n. 3, p. 709-717, 2010.

FREITAS, J. P. X.; DE OLIVEIRA, E. J.; DA CRUZ NETO, A. J.; DOS SANTOS, L. R. Avaliação de recursos genéticos de maracujazeiro-amarelo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, n. 9, p. 1013-1020, 2011.

FREITAS, J. P. X.; OLIVEIRA, E. J.; JESUS, O. N.; CRUZ NETO, A. J.; SANTOS, L. R. Formação de população base para seleção recorrente em maracujazeiro-amarelo com uso de índices de seleção. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.47, p.393-401, 2012.

GODOY, R. C. B. de; LEDO, C. A. da S.; SANTOS, A. P. dos; MATO S, E. L. S.; LIMA, A. de A.; WASZCZYNSKYJ, N. Diversidade genética entre acessos de maracujazeiro- amarelo avaliada pelas características físico-químicas dos frutos. *Revista Ceres*, v.54, n. 316, p.541-547, 2007.

GOMES, S. V. F. Aplicação do planejamento Box-Behnken na otimização de método de extração de flavonoides usando extração acelerada com solventes (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero *Passiflora*. 2013. 161f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Bahia – Salvador. 2013.

GONÇALVES, G. M.; VIANA, A. P.; BEZERRA NETO, F. V.; PEREIRA M. G.; PEREIRA T. N. S. Seleção e herdabilidade na predição de ganhos genéticos em maracujá-amarelo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, n.2, p.193-198. 2007.

GOSMANN, G.; PROVENSÍ, G.; COMUNELLO, L. N.; RATES, S. M. K. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora L.*(Passifloraceae). *Revista Brasileira de Biociências*, v. 9, n. S1, 2011.

GRECO, S. M. L.; PEIXOTO, J. R.; FERREIRA, L. M. Avaliação física, físico-química e estimativas de parâmetros genéticos de 32 genótipos de maracujazeiro azedo cultivados no distrito federal. *Bioscience Journal*, Uberlandia, v.30, n.1, p.360-370, 2014.

HARDER, L. D.; BARRETT, S. C. H. Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. In: Lloyd, D. G. & Barrett, S. C. H. (eds.) *Floral biology: studies on floral evolution in animal pollinated plants*. New York, Chapman & Hall, p. 140-190. 1996.

- HURTADO-SALAZAR, A.; SILVA, D. F. P. D.; SEDIYAMA, C. S.; BRUCKNER, C. H. Physical and chemical characterization of yellow passion fruit grafted onto wild species of genus *Passiflora* cultivated in greenhouse. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, n. 3, p. 635-643, 2015.
- INGALE, A. G.; HIVRALE, A. U. Pharmacological studies of *Passiflora* sp. and their bioactive compounds. *African Journal of Plant Science*, v. 4, n. 10, p. 417-426, 2010.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; ICUMA, I. M.; VERAS, M. C. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; DOS ANJOS, J. R. N. Cultura do maracujazeiro. In: Incentivo a fruticultura no Distrito Federal. Manual de Fruticultura. Brasília, COOLABORA, 1999. p. 42-52.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C.; JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; BRAGA, M. F. Características físico-químicas e produtividade de acessos de *Passiflora nitida* Kunth procedentes do Centro-Norte do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 32, p. 791-797, 2010.
- 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. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 4, p. 81-107.
- KALENDAR, R.; FLAVELL, A. J.; ELLIS, T. H. N.; SJAKSTE, T.; MOISY, C.; SCHULMAN, A. H. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. *Heredity*, v. 30, p. 106:520, 2011.
- KIDOY, L.; NYGARD, A. M.; ANDERSEN, O. M.; PEDERSEN, A. T.; AKSNES, D. W.; KIREMIRE, B. T. Anthocyanins in Fruits of *Passiflora edulis* and *P. suberosa*. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 10, n. 1, p. 49-54, 1997.
- KIMURA, A. Estudo da enxertia hipocotiledonar de plântulas em *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. 1994. 56 f. Monografia (Trabalho de graduação em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1994.
- KLINKHAMER, P. G. L.; de JONG, T. J. Attractiveness to pollinators: a plant's dilemma. *Oikos* 57: 180-184, 1993.
- KRAUSE, W.; NEVES, L. G.; VIANA, A. P.; ARAÚJO, C. A. T.; FALEIRO, F. G. Produtividade e qualidade de frutos de cultivares de maracujazeiro-amarelo com ou sem polinização artificial. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.47, n.12,p.1737-1742, 2012.
- LAWINSCKI P. R. Caracterização morfológica, reprodutiva e fenológica de *Passiflora alata* CURTIS e *Passiflora cincinnata* MAST. 2010. 134f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal, Universidade Estadual de Santa Cruz.

LIMA, D. T.; SANTOS, C. E. M.; ROCHA, M. R.; ROSADO, L. D. S.; ALVES, F. M. Divergência genética entre genótipos de maracujazeiro azedo com base em vigor, incidência de doenças e características de frutos. *Revista Magistra, Cruz das Almas*, v. 24, n. 4, p. 314-322, 2012.

MACHADO, C. De F.; JESUS, F. N. De.; LEDO, C. A. Da S. Genetic divergence of the accessions of passion fruit using quantitative and qualitative descriptors. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, n. 2, p. 442-449, 2015.

MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 01, DE 7 DE JANEIRO DE 2000. Disponível://http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:R92wUbtBQ5gJ:www2.agricultura.rs.gov.br/uploads/126989581629.03_enol_in_1_00_mapa.doc+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br//. Acesso: 10 de outubro de 2017.

MEDEIROS, S. A. F.; YAMANISHI, O. K.; PEIXOTO, J. R.; PIRES, M. C.; JUNQUEIRA, N. T. V.; RIBEIRO, J. G. B. L. Caracterização físicoquímica de progênies de maracujá-roxo e maracujá-azedo cultivados no Distrito Federal. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.31, p.492-499, 2009.

MELETTI, L. M. M.; BERNACCI, L. C.; SOARES-SCOTT, M. D.; AZEVEDO FILHO, J. D.; MARTINS, A. L. M. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agrônômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 25, n. 2, p. 275-278, 2003.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, 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: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. cap. 3, p. 55-78.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; ALVARES, V.; DE AZEVEDO FILHO, J. A. Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam.: nova alternativa de maracujá ornamental. *Ornamental Horticulture*, v. 17, n. 1, p. 87-95, 2011.

MENEZES, J.M.T. Seleção de porta-enxertos tolerantes à morte prematura de plantas para *P. edulis* Sims f. *fiavicarpa* Deg. e comportamento de *P. nitida* H.B.K, na região de Jaboticabal. 1990. 73f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1990.

MONDIN, C.; MOREIRA, G. R. P.; CERVI, A. Sinopse das espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae) do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 9, n. s.1, p. 3-27, 2011.

MORGADO, M. A. D. O.; BRUCKNER, C. H.; ROSADO, L. D. S.; SANTOS, C. E. Development of passion fruit grafted on *passiflora* wild species. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 37, n. 2, p. 471-479, 2015.

NASCIMENTO, T. B. do; RAMOS, J. D.; MENEZES, J. B. Características físicas do maracujá-amarelo produzido em diferentes épocas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.34, p.2353-2358, 1999.

NASCIMENTO, W. M. O.; TOMÉ, A. T.; OLIVEIRA, M. S. P. DE; MULLER, C. H.; CARVALHO, J. E. U. Seleção de progênies de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) quanto à qualidade de frutos. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 25, n.1, p.186-188, 2003.

NEGREIROS, J. R. da S.; ARAÚJO NETO, S. E. de; ÁLVARES, V. de S.; LIMA, V. A. de; OLIVEIRA, T. K. de. Caracterização de frutos de progênies de meios-irmãos de maracujazeiro-amarelo em Rio Branco – Acre. Revista Brasileira de Fruticultura, v.30, p.431-437, 2008.

NEPA. NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Campinas: UNICAMP, 2004.

NEVES, C. G.; NUNES, O. J.; LEDO, C. A. S.; OLIVEIRA, E. J. Avaliação agronômica de parentais e híbridos de maracujazeiro- amarelo. Revista Brasileira Fruticultura, v.35, p.191-198, 2013.

NOGUEIRA FILHO, G. C.; RONCATTO, G.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, J. C. de; MALHEIROS, E. B. Desenvolvimento e produção das plantas de maracujazeiro-amarelo produzidas por enxertia hipocotiledonar sobre seis porta-enxertos. Revista Brasileira de Fruticultura, v.32, n.2, p.535-543, 2010.

OCAMPO, J.; COPPENS D'EECKENBRUGGE G.; OLANO, C.; SCHNELL, R. AFLPs analysis for the study of genetic relationships among cultivated *Passiflora* species of the subgenera *Passiflora* and *Tacsonia*. Proc Interamer Soc Trop Hort, v.48, p.72–76, 2004.

OCAMPO, J.; URREA, R.; WYCKHUYS, W.; SALAZAR, M. Exploración de la variabilidad genética del maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener) como base para un programa de fitomejoramiento en Colombia. Acta Agronômica, v.62, p. 352-360, 2013.

OCAMPO, J.; ARIAS, J. C.; URREA, R. Interspecific hybridization between cultivated and wild species of genus *Passiflora* L. Euphytica, v. 209, n. 2, p. 395-408, 2016.

OLIARI, L. S.; GILES, J. A. D.; MAYRINCK, L. G.; DE OLIVEIRA, J. P. B.; LOPES, J. C.; OTONI, W. C.; SCHMILDT, E. R.; AOYAMA, E. M.; ALEXANDRE, R. Mini-grafting of adult *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. scions onto vegetatively propagated adult rootstocks of *P. mucronata* Lam. Australian Journal of Crop Science, v. 10, n. 4, p. 490-496, 2016.

OLIVEIRA, E. J.; SOARES, T. L.; BARBOSA, C. J.; SANTOS FILHO, H. P.; JESUS, O. N. Severidade de doenças em maracujazeiro para identificação de fontes de resistência em condições de campo. Revista Brasileira de Fruticultura, v.35, p. 485-492. 2013.

OLIVEIRA, E. J. de; SANTOS, V. da S.; LIMA, D. S. de; MACHADO, M. D.; LUCENA, R. S.; MOTTA, T. B. N.; CASTELLEN, M. da S. Seleção em progênies de maracujazeiro-amarelo com base em índices multivariados. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.43, p.1543-1549, 2008.

- OLIVEIRA, J. C. de; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJÁ, 5., 1998, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: FUNEP, 1998. p. 291-314.
- PARIDA, S. K.; KALIA, S. K.; SUNITA, K.; DALAL, V.; HEMAPRABHA, G.; SELVI, A.; PANDIT, A.; SINGH, A.; GAIKWAD, K.; SHARMA, T. R.; SRIVASTAVA, P. S.; SINGH, N. K.; MOHAPATRA, T. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theor Appl Genet*, v. 118, p. 327–338, 2009.
- POCZAI, P.; VARGA, I.; LAOS, M.; CSEH, A.; BELL, N.; VALKONEN, J. P. T.; HYVÖNEN, J. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods*, v. 9, p. 6, 2013.
- RAMAIYA, S. D.; BUJANG, J. S.; ZAKARIA, M. H. Assessment of total phenolic, antioxidant, and antibacterial activities of *Passiflora* species. *Scienc World Journal*, v. 2014, p.1–10, 2014.
- RASMUSSEN, G. K.; PEYNADO, A., R. HILGEMAN, J. R. FURR AND G. CAHOON. The organic acid content of Valencia oranges from four location in the United States. *Proceedings of the American Society Horticultural Science*, v.89, p.206-210, 1966.
- R, CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.
- SANTOS H, P.; VENUGOPL, R.; NILAKASH, A. S.; KUNJBIHARI, S.; MANGALA, L. Antidepressant activity of methanolic extract of *Passiflora foetida* leaves in mice. *Int J Pharm Pharm Sci*, v. 3, n. 1, p. 112-5, 2011.
- SANTOS, C. E. M.; BRUCKNER, C. H.; CRUZ, C. D.; SIQUEIRA, D. L. DE.; PIMENTEL, L. D. Características físicas do maracujá-azedo em função do genótipo e 122 massa do fruto. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 31, n. 4, p. 1110-1102, 2009.
- SANTOS, C. H. B.; DA CRUZ NETO, A. J.; SOARES, T. L.; DE OLIVEIRA, E. J.; DE JESUS, O. N.; GIRARDI, E. A. Porta-enxertos e fixadores de enxerto para enxertia hipocotiledonar de maracujazeiro azedo. *Ciência rural*, v. 46, n. 1, p. 30-35, 2016.
- SEAFORTH, C. E.; ADAMNS, C.D.; SYLVESTER, Y. A. *Guide for Medicinal Plants of Trinidad & Tobago*. London: Commonwealth Secretariat, Marlborough House, Pall Mall. 1983.
- SILVA, C. N. Fenologia de espécies silvestres de maracujazeiro e caracterização morfoagronômica e molecular de progênies de meio-irmãos de maracujá-maçã (*passiflora maliformis* L.). 99f. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Agronomia) – Departamento de Agronomia - UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 2017.
- SILVA, F.M.; CORRÊA, L.de S.; BOLIANI, A.C.; SANTOS, P.C. dos. Enxertia de mesa de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. sobre *Passiflora alata* Curtis, em ambiente de nebulização intermitente. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.27, n.1, p.98-101, 2005.

- SNOW, A. A.; SPIRA, T. P.; SIMPSON, R.; KLIPS, R. A. The ecology of geitonogamous pollination. In: Lloyd, D. G. & Barrett, S. C. H. (eds.) *Floral biology: studies on floral evolution in animal pollinated plants*. New York, Chapman & Hall, 1996. p. 191-216.
- SOARES, W. S.; RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BARROSO, P. A.; MEDEIROS, L. R. Caracterização de frutos e sementes em acessos de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.). *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, v. 13, n. spe, p. 569-573, 2011.
- SOUZA, L. B. D. E.; SILVA, E. M.; GOMES, R. L. F.; LOPES, Â. C. D. A.; VERAS SILVA, I. C. Caracterização e divergência genética de acessos de *Passiflora edulis* e *P. cincinnata* com base em características físicas e químicas de frutos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, p. 832-839, 2012.
- SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.17, n.3, p.495-503, 2015.
- STEPHENSON, A. G. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review Ecology and Systematics*, v.12, p 253-279, 1981.
- TOCCHINI, R.P.; NISIDA, L.A.C.; HASHIZUME, T.; MEDINA, J.C.; TURATTI, J.M. Processamento: produtos, caracterização e utilização. In: ITAL. Maracujá. 2 ed. Campinas: ITAL,1994. p.161-192.
- UTELLI, A. B.; ROY, B. A. Pollinator abundance and behavior on *Aconitum lycoctonum* (Ranunculaceae): an analysis of the quantity and quality components of pollination. *Oikos*, v.89, p. 461-470, 2000.
- VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; AMARAL JR, A. T. do; SOUZA, M. M.; MALDONADO, J. F. M. Diversidade genética entre genótipos comerciais de maracujazeiro-amarelo (*P. edulis f. flavicarpa*) e entre espécies de *Passifloras* nativas determinada por marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 25, n. 3, p.489-493, 2003.
- WAGNER WL, DR HERBST, SH SOHMER, Ed. *Manual of the flowering plants of Hawai 'i*. 2 vols. Univ. Hawaii Press & Bishop Museum Press, Honolulu. 1, 853, 1990.

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Passiflora*

Resumo

O gênero *Passiflora* é composto por quatro subgêneros: *Passiflora*, *Decaloba*, *Astrophea* e *Deidamioide*, cujas espécies silvestres pertencentes ao gênero apresentam grande importância nas áreas farmacêutica, medicinal, industrial e no melhoramento genético. Essas espécies apresentam grande variabilidade genética, tanto intra e interpopulacional. Uma das formas de averiguar essa variabilidade é por meio de marcadores moleculares, como os microssatélites. Estes marcadores também vêm sendo usados em estudos de transferibilidade entre espécies e gêneros mais próximos devido à presença de regiões flangeadoras. Sendo assim, objetivou-se avaliar a transferibilidade de *primers* desenvolvidos para *P. edulis* e *P. alata* em 26 espécies nativas da Mata Atlântica, e propor identificação de espécies por perfil de transferibilidade e identificar microssatélites conservados e polimórficos para análise genética. Para análise de transferibilidade foram usados 44 microssatélites desenvolvidos para *P. edulis* e *P. alata*, em 26 espécies de *Passiflora* pertencentes a Mata Atlântica colhidas no Espírito Santo. Na análise de diversidade genética foram usados nove microssatélites em 150 indivíduos e realizada a análise descritiva (PIC: conteúdo de informação polimórfico; H₀: heterozigosidade observada; FM: frequência máxima; NA: número de alelo; %A: porcentagem de perda de alelos). A árvore de regressão multivariada foi construída para identificar as espécies com base em marcador, utilizando os dados de transferibilidade para as 26 espécies e 32 *primers*. O agrupamento formado pelos dados de transferibilidade para as 26 espécies permitiu a formação de grupos de acordo com as espécies pertencentes aos subgêneros. A árvore de regressão multivariada demonstrou que são necessário 14 *loci* microssatélites para identificar as 26 espécies do gênero. Os locus PE88, PA05 E PA08 foram os mais conservados para as espécies. Os valores médios de PIC variou de 0.10 a 0.69; H₀: 0.12 a 0.73; FM: 0.39 a 0.89; NA: 1.33 a 7. Conclui-se, que os *primers* desenvolvidos para *P. edulis* e *P. alata* são eficazes e pode ser usado em estudos de diversidade de *Passiflora*, pois permite a distinção das espécies por meio da transferibilidade entre as espécies da Mata Atlântica. O perfil de amplificação dos microssatélites por meio da transferibilidade, permite separar as espécies em subgêneros estudos, sendo que há uma maior taxa de transferibilidade para espécies do subgênero *Passiflora*. Os dados de diversidade genética evidenciaram regiões que são conservadas nas espécies, e isto também é observado nos dados de transferibilidade.

Palavra-chaves: SSR; transferibilidade; variabilidade genética; espécies silvestres

Abstract

The genus *Passiflora* is composed by four subgenera: *Passiflora*, *Decaloba*, *Astrophea* and *Deidamioide*, whose wild species that belong to the genus have great importance in the pharmaceutical, medicinal, industrial and genetic breeding areas. These species present great genetic variability, both intra and interpopulational. One way to verify this variability is through molecular markers such as microsatellites. These markers have also been used in transferability studies between species and nearer genera due to the presence of flanking regions. The aim of this study was to evaluate the transferability of primers developed for *P. edulis* and *P. alata* in 26 native species of the Atlantic Forest, and to propose species identification by transferability profile and to identify conserved and polymorphic microsatellites for genetic analysis. For analysis of transferability, 44 microsatellites developed for *P. edulis* and *P. alata* were used in 26 *Passiflora* species belonging to Atlantic Forest harvested in Espírito Santo. In genetic diversity analysis, nine microsatellites were used in 150 individuals and the descriptive analysis was carried out (PIC: polymorphic information content, H₀: observed heterozygosity, FM: maximum frequency, NA: allele number, % A: allele loss percentage). The multivariate regression tree was constructed to identify the species regarding the marker, using the transferability data for the 26 species and 32 primers. The cluster formed by the transferability data for the 26 species allowed the formation of groups according to the species that belonged to the subgenera. The multivariate regression tree demonstrated that 14 microsatellite loci were necessary to identify the 26 species of the genus. The PE88, PA05 and PA08 locus were the most conserved for the species. The mean values of PIC ranged from 0.10 to 0.69; H₀: 0.12 to 0.73; FM: 0.39 to 0.89; NA: 1.33 to 7. We concluded that the primers developed for *P. edulis* and *P. alata* are effective and can be used in studies of *Passiflora* diversity, since it allows the species to be distinguished through transferability among the species of Atlantic Forest. The amplification profile of the microsatellites through the transferability, allows to separate the species in subgenus studies, knowing that there is a greater transferability rate for species of the *Passiflora* subgenus. The data of genetic diversity evidenced regions that are conserved in the species, and this is also observed in the transferability data.

Keywords: SSR; transferability; genetic variability; wild species

1. Introdução

O Brasil é considerado um dos centros de diversidade de espécies do gênero *Passiflora*, por abranger cerca de 200 espécies nativas, com propriedades medicinais, ornamentais e alimentícias (FALEIRO et al., 2005). As espécies que possuem maior importância econômica são *Passiflora edulis* Sims (maracujá-azedo) e *P. alata* Curtis (maracujá-doce). No entanto, as espécies silvestres apresentam interesse agrônomo como: longevidade, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes de interesses farmacológicos, adaptação a condições adversas de clima e resistência a pragas e doenças (JUNQUEIRA et al., 2005; EMBRAPA, 2010). Além da sua importância econômica, as espécies de *Passiflora* também apresentam importância ecológica, por ser fonte de néctar para os polinizadores e fornecer frutos como alimento para diversas espécies da fauna. Dessa forma, as espécies do gênero são consideradas potenciadoras da biodiversidade (FARIA; STEHMANN, 2010).

No Espírito Santo, a Mata Atlântica está restrita a 10,5% do território, que originalmente contava com 100% de sua superfície coberta pela floresta (Fundação SOS Mata Atlântica, 2015), resultante do corte de madeira, agricultura e plantação de eucalipto. Apesar de ter perdido mais de 90% do seu ecossistema, o Estado contém um número grande de unidades de conservação, comparado aos demais estados do país (MENDES; PADOVAN, 2000). A diversidade de passifloras no Espírito Santo é considerada alta em virtude do número de espécies ocorrentes, e não há muito conhecimento sobre a flora desse estado, assim é necessário estudos florísticos da família Passifloraceae s.s. (BORGES; MILWARD-DE-AZEVEDO, 2017), e esta família tem representatividade de dois gêneros (*Passiflora* e *Mitostemma*) e dos quatro subgêneros de *Passiflora* ocorrentes no Brasil (*Passiflora*, *Decaloba*, *Astrophea* e *Deidamioides*) (Figura 1).

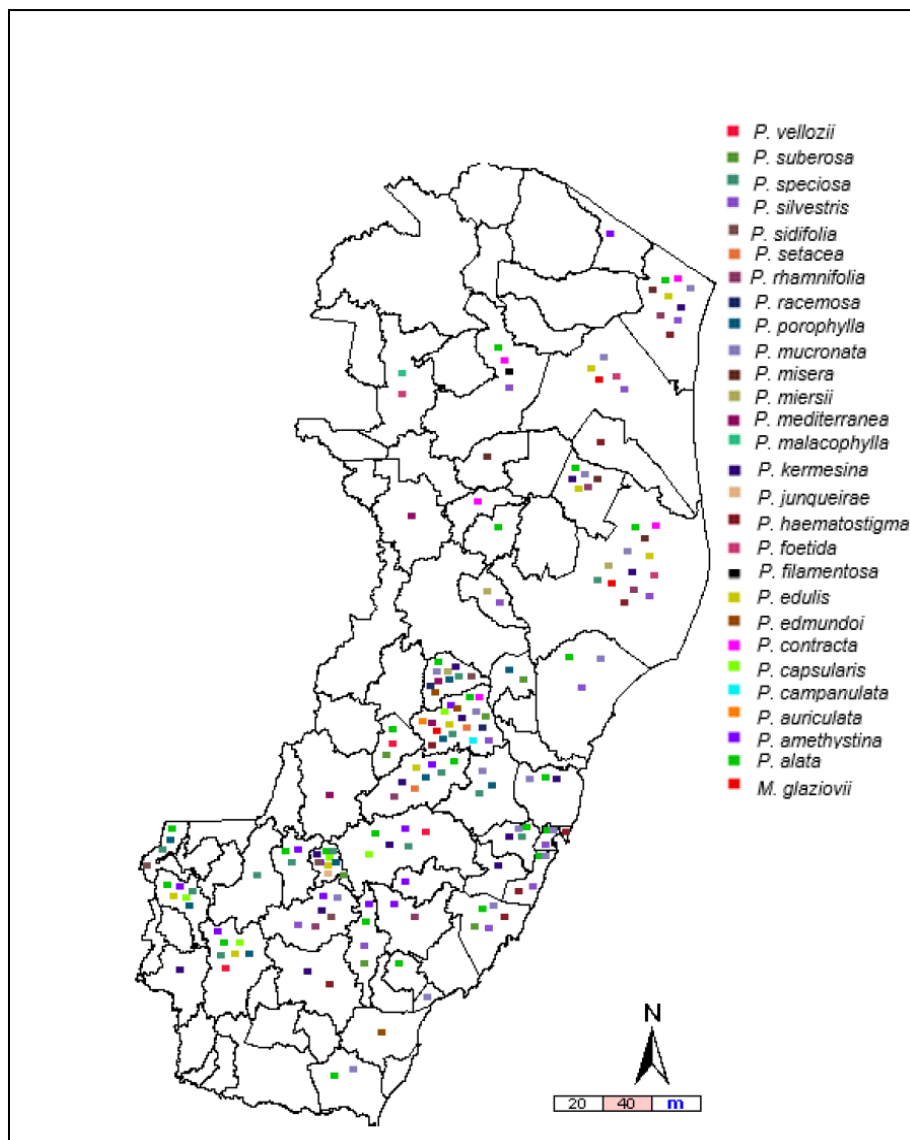


Figura 1. Mapa de ocorrência das espécies de *Passiflora* e *Mitostemma* no Estado do Espírito Santo (BORGES, 2016).

Estudos taxonômicos e filogenéticos, com auxílio de marcadores moleculares, sugeriram que o gênero *Passiflora* seja dividido em quatro subgêneros: *Astrophaea*, *Decaloba*, *Deidamiodes* e *Passiflora* (FEUILLET, MACDOUGAL, 2003; MUSCHNER et al, 2003; PÁDUA, 2005). Estes estudos contradizem com as hipóteses anteriores em que o gênero era composto em 22 (KILLIP, 1938) e 23 subgêneros (ESCOBAR, 1988). Estudos com base em análises de sequência genômicas como regiões plastidiais e mitocondriais indicam que os ancestrais do gênero *Passiflora*

chegaram na América Central e assim se diversificaram, com eventos de dispersão (MUSCHNER et al., 2012). O subgênero *Passiflora*, de acordo com esses autores, divergiu-se cerca de 32 a 38 milhões de anos atrás (Mya), indicando que é uma diversificação bem antiga (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014).

A utilização de marcadores moleculares para averiguar a diversidade genética inter e intraespecíficas em *Passiflora*, permitiu a identificação de híbridos e parentais para serem usados em programas de melhoramento (VIANA et al., 2010). Os marcadores moleculares estão distribuídos no genoma e são eficazes, pois permitem a identificação de polimorfismo a nível de DNA, não sofrem influência ambiental e podem ser usados em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (MIAH et al., 2013; PAIVA, 2013). Dentre os diversos marcadores moleculares existentes, destaca-se os SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou microssatélites, por serem codominantes, apresentarem alto nível de polimorfismo e reprodutibilidade (MIAH et al., 2013). Estes marcadores são ferramentas úteis para estudo de variação genética, mapeamento e melhoramento genético (MOHAMMADREZA et al., 2007; LI et al., 2011), e eles têm um alto nível de transferibilidade entre espécies estreitamente relacionadas (ZIYA et al., 2016).

No entanto, estudos com *Passiflora* que utilizam marcadores SSR ainda são incipientes considerando a grande diversidade de espécie. Apenas as espécies *P. edulis* (OLIVEIRA, 2005), *P. alata* (PÁDUA et al., 2005), *P. cincinnata* Mast. (CERQUEIRA-SILVA, 2012) e *P. contracta* Vitta (CAZÉ et al., 2012) apresentam marcadores microssatélites desenvolvidos. Para contornar a situação estudos de transferibilidade de primers entre espécies vem sendo realizados (OLIVEIRA et al., 2013). Microssatélites comuns entre diferentes espécies ocorrem devido à conservação das regiões flanqueadoras destes marcadores entre espécies e gêneros próximos (PAIVA, 2013). Microssatélites conservados vem sendo utilizados em diferentes estudos de transferibilidade envolvendo genética de populações (MARTIN et al., 2010; MISTURA et al., 2012; SINGH et al., 2012; YAN et al., 2017), identificação taxonômica e filogenia (BUDAK et al., 2004; KARACA et al., 2012; GARCIA-LOR et al., 2013; TULER et al., 2015) e em trabalhos de origem e evolução (TAN et al., 2017; THAKUR et al., 2018).

Neste trabalho objetivou-se avaliar a transferibilidade de *primers* desenvolvidos para *P. edulis* e *P. alata* em 26 espécies nativas da Mata Atlântica, e propor identificação de espécies por perfil de transferibilidade e identificar microssatélites conservados e polimórficos para análise genética.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo

A área de estudo compreendeu as áreas de extensão da Mata Atlântica e seus fragmentos remanescentes, sendo um único domínio encontrado no Espírito Santo, com suas diversas fisionomias: restingas, manguezais e florestas ombrófilas e estacionais (IBGE, 2012).

2.2. Análise Molecular

2.2.1. Análise de transferibilidade

Para a análise de transferibilidade foram considerados 26 indivíduos (*P. sepciosa*, *P. misera*, *P. capsularis*, *P. racemosa*, *P. mediterrânea*, *P. amethystina*, *P. alata*, *P. sidifolia*, *P. contracta*, *P. suberosa*, *P. kermesina*, *P. velozii*, *P. junqueirae*, *P. mucronata*, *P. speciosa 2*, *P. rhamnifolia*, *P. edulis*) relativos a 17 espécies das estudadas e ainda acrescentadas as espécies *P. sp1*, *P. sp 4*, *P. sp8*, *P. sp11*, *P. sp14*, *P. sp 17* e *P. sp19*, que foram coletados no estado, mas que não apresentaram órgãos reprodutivos para a correta delimitação destas espécies. As demais espécies ocorrentes no estado não foram encontradas nas expedições a campo, o que inviabilizou sua utilização nestas análises. Foram avaliados 71 *loci* microssatélites (Apêndice III), dos quais 50 desenvolvidos para *Passiflora edulis* e 21 de *Passiflora alata*. Desses 71 *loci* microssatélites utilizou-se 44 *loci* para análise de transferibilidade, pois foram os que apresentaram melhores perfis de amplificação, ou seja, amplificaram na maioria das espécies estudadas (BORGES, 2016). A matriz de dados moleculares da análise de transferibilidade foi obtida de acordo com o perfil de amplificação, sendo que presença de amplificação foi codificada como 1 e a ausência como 0.

2.2.2. Análise de genética de populações

Na análise de genética de populações foram selecionados nove *loci* microssatélites que amplificaram na maioria das espécies, de acordo com os dados de transferibilidade. Os microssatélites utilizados foram desenvolvidos para *P. edulis* (PE15, PE18, PE75, PE88, U04) e *P. alata* (PA05, PA07, PA08, PA10). Foi utilizada 19 espécies coletadas nas regiões de Venda Nova do Imigrante, Conceição do Castelo;

Santa Teresa, Santa Maria de Jetibá, Sooretama e São Roque do Cannã, totalizando 150 indivíduos (Tabela 1). Para avaliar o potencial de microssatélites conservados em análises populacionais os genótipos de cada espécie foram codificados por *locus* como: A matriz gerada dos dados moleculares para análise de população foi obtida de acordo com o perfil de amplificação dos nove *primers*, a codificação foi realizada conforme os dados para *locus* homocigotos e para *locus* heterocigotos.

Tabela 1. Espécies de *Passiflora* pertencentes a cada subgênero com seus respectivos números cromossômicos e quantidade de indivíduos por local de coleta no Espírito Santo.

Subgênero	Espécies	TI	NC	LC/ QI
<i>Astrophea</i>	<i>P. rhamnifolia</i>	4	-	Sooretama (4)
<i>Deidamioide</i>	<i>P. contracta</i>	3	-	Santa Teresa (3)
	<i>P. porophylla</i>	20	12	Santa Maria de Jetibá (9); Santa Teresa (4); Venda Nova do Imigrante (7)
<i>Decaloba</i>	<i>P. capsularis</i>	8	12	Venda Nova do Imigrante (6); Santa Teresa (2)
	<i>P. suberosa</i>	3	24	Venda Nova do Imigrante (3)
	<i>P. misera</i>	7	12	Sooretama (7)
	<i>P. amethystina</i>	24	18	Conceição de Castelo (10); São Mateus (14)
	<i>P. kermesina</i>	15	18	Venda Nova do Imigrante (7); Santa Teresa (2);
	<i>P. mediterrânea</i>	8	-	Santa Teresa (8)
<i>Passiflora</i>	<i>P. sidifolia</i>	7	-	Venda Nova do Imigrante (3); São Roque do Cannã (4)
	<i>P. racemosa</i>	8	18	Santa Teresa (4); São Roque do Cannã (4)
	<i>P. mucronata</i>	3	18	Sooretama (3)
	<i>P. speciosa</i>	9	24	Santa Teresa (4); Sooretama (3); Santa Maria de Jetibá (2)

	<i>P. edulis</i>	5	18	Sooretama (3); Santa Maria de Jetibá (2)
	<i>P. alata</i>	10	18	Sooretama (4); São Roque do Canaã (3); Santa Maria de Jetibá (3)
	<i>P. junqueirae</i>	6	18	Venda Nova do Imigrante (6)
	<i>P. sp8</i>	3	-	Sooretama (3)
Outras	<i>P. sp11</i>	3	-	Sooretama (3)
	<i>P. sp19</i>	4	-	Santa Teresa (4)
Total		150		

TI: Total de Indivíduos; NC: Número Cromossômico; LC: Local de Coleta; QI: Quantidade de indivíduos por local.

2.2.3. Extração de DNA e PCR

A extração de DNA foi realizada usando o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) com modificações. A qualidade e concentração de DNA foi verificada por meio de leitura da absorvância a 260 e 280nm, utilizando um espectrofotômetro.

As condições de amplificação foram: 50 ng de DNA; tampão 1X; 1,6 mM de MgCl₂; 0,25 μM de cada dNTP; 0,5 μM de *primer*; 1,0 U de Taq DNA polimerase em um volume final de reação de 13 μL. A amplificação foi feita por meio de termociclador utilizando o programa com etapa de desnaturação a 94 °C por 4 min seguido de 8 ciclos de touchdown com desnaturação a 94 °C por 40 s, anelamento a 58 °C (com decréscimo de 0,5 °C por ciclo) por 40 s, extensão a 72 °C por 50 s. Seguido de 28 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 58 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min; extensão final a 72 °C por 7 minutos.

Os produtos provenientes da amplificação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com voltagem de 80 volts por 3 h. Os produtos da amplificação foram corados com gel red e os resultados dos fragmentos amplificados foram visualizados sob luz UV em fotodocumentador.

2.2.4. Arvore de regressão multivariada

Visando a identificação de espécies com base em marcador, uma arvore de regressão multivariada foi construída utilizando os dados de transferibilidade para as 26

espécies e 32 *primers* (U02; U04; U05; U09; U11; PE24; U12; PE04; PE13; PE42; PE38; PE58; PE29; PE14; PE04; PE90; PE09; PE88; PE66; PE02; PE74; PE15; PE18; PE37; PA03; PA14; PE64; PA02; PA05; PA07; PA08; PA20), pois foram retirados os *primers* que apresentavam o mesmo padrão de amplificação ou dados que continham apenas 1, ou seja, padrão monomórfico, para não gerar ambiguidade na hora de rodar os dados. Esta análise não revela o grau de proximidade entre espécies, apenas uma chave dicotômica baseada em perfis de amplificação de microsátélites para a identificação destes.

2.3. Análises Estatísticas

Para análise de transferibilidade foi utilizado o índice de coincidência simples, e agrupamento por UPGMA. O Programa estatístico das análises foi o R (2016).

Para os dados de genética de população foram realizadas análises descritivas. O Programa estatístico das análises foi o programa Genes (2013).

Para construção da árvore de regressão multivariada foi utilizado o programa estatístico das análises foi o R (2016). Foram utilizados os pacotes: *tree*, *ggdendro*, *ggplot2*.

3. Resultados

3.1. Transferibilidade

O agrupamento gerado pelos dados de transferibilidade para as 26 espécies de *Passiflora* está representado na Fig. 2. Este agrupamento permitiu a formação de cinco grupos (Figura 1): primeiro grupo (G1) constituído pelas espécies *P. sp 11*, *P. sp 1*, *P. kermesina*, *P. sp 19*, *P. sp 14* e *P. rhamnifolia*. O segundo (G2) com as espécies *P. suberosa*, *P. porophylla*, *P. capsularis* e *P. contracta*. O terceiro (G3) por *P. mediterrânea*, *P. mucronata*, *P. amethystina*, *P. junqueirae*, *P. sidifolia* e *P. sp 17*. O quarto (G4) formado por *P. racemosa*, *P. sp 8*, *P. vellozii*, *P. alata*, *P. misera*, *P. sp 4* e *P. speciosa* e o quinto (G5) por *P. edulis*. As espécies *P. porophylla* e *P. speciosa* tiveram dois indivíduos presentes na análise molecular, por apresentarem características morfológicas distintas em campo, diferente do padrão encontrado para os demais exemplares coletados, os quais foram designados como *P. porophylla** e *P. speciosa**.

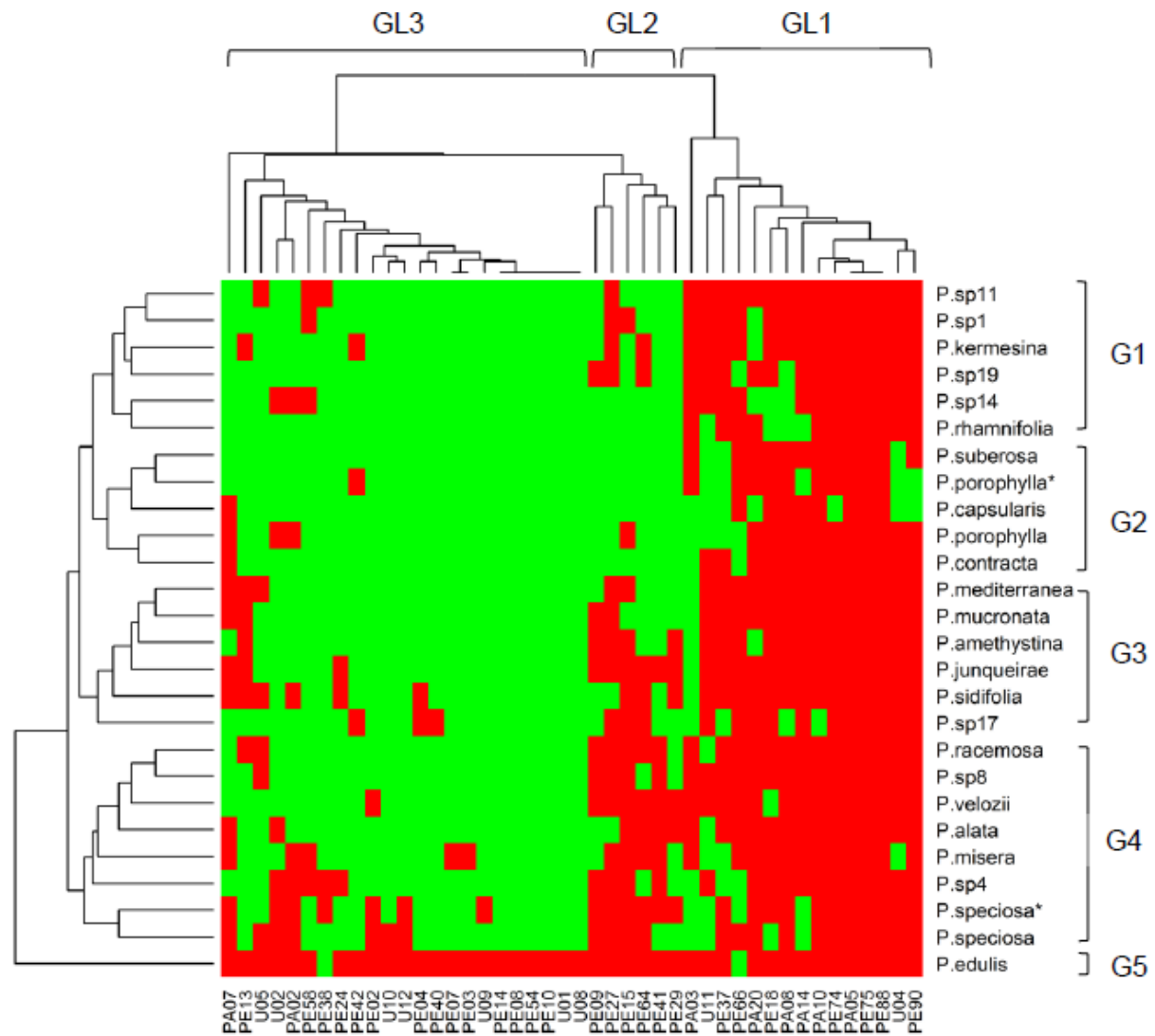


Figura 2. Heatmap gerado a partir de 44 SSR em 26 espécies de *Passiflora*. Preenchimento em vermelho é amplificação e em verde, não amplificação. G: Grupos que dividem as espécies; G: grupos que dividem os marcadores. (Fonte: Borges, 2016).

3.2. Identificação de espécies via microssatélites

Com a árvore de regressão multivariada (Fig. 3) verificou-se que foram necessários apenas 14 *loci* microssatélites (PA03; PA14; U02; U05; U09; U11; PE04; PE13; PE24; PE29; PE41; PE42; PE58 e PE64) para identificar as 26 espécies do gênero *Passiflora* dos 32 *loci* utilizados na transferibilidade. Os ramos esquerdos da árvore informa ausência de amplificação do *primer*, e os ramos do lado direito informa presença de amplificação do *primer*. Para as espécies *P. contracta*, *P. mucronata*, *P. speciosa*, *P. sp17*, *P. rhamnifolia*, *P. sp1*, *P. sp11*, *P. alata*, *P. racemosa*, *P. sp19* os *primers* PE24, U05, PE58, PE04, PA14, U02, PE41, U11 e PE41, respectivamente não amplificaram para essas espécies. E os mesmos *primers* e PE29, U09, PE42 amplificaram para *P. sp14*, *P. mediterrânea*, *P. amethystina*, *P. misera*, *P. speciosa**, *P. edulis*, *P. junqueirae*, *P. sidifolia*, *P. suberosa*, *P. porophylla**, *P. sp14*, *P. sp8*, *P. kermesina*, *P. velozii*.

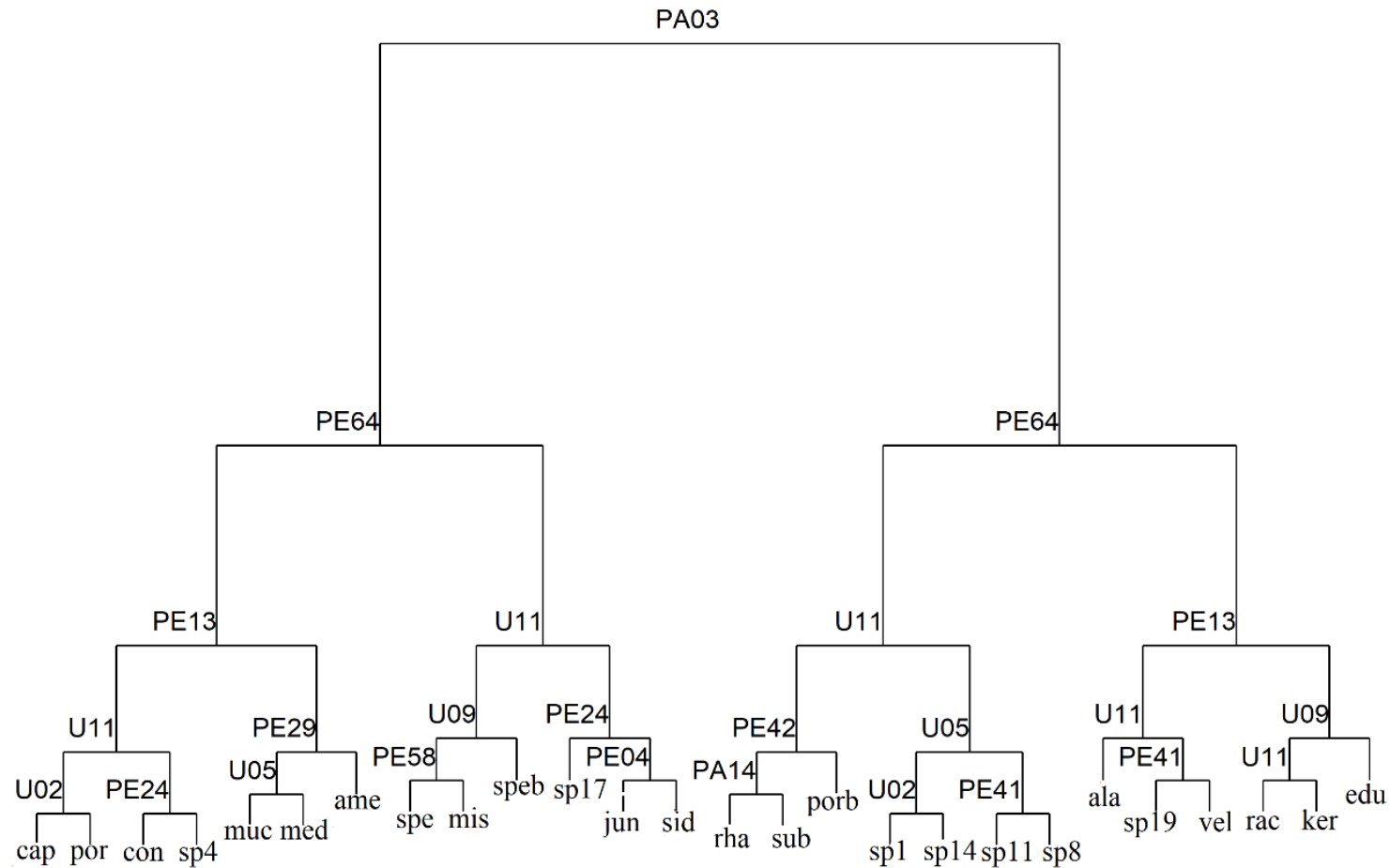


Figura 3. Árvore de regressão multivariada de 26 espécies do gênero *Passiflora* dos dados de transferibilidade. As espécies são representadas por cap: *P. capsularis*; por: *P. porophylla*; con: *P. contracta*; sp4: *P. sp4*; muc: *P. mucronata*; med: *P. mediterrânea*; ame: *P. amethystina*; spe: *P. speciosa*; mis: *P. misera*; speb: *P. speciosa b*; sp17: *P. sp17*; jun: *P. junqueirae*; sid: *P. sidifolia*; rha: *P. rhamnifolia*; sub: *P. suberosa*; porb: *P. porophylla b*; sp1: *P. sp1*; sp8: *P. sp8*; ala: *P. alata*; sp19: *P. sp19*; vel: *P. velozii*; rac: *P. racemosa*; ker: *P. kermesina*; edu: *P. edulis*.

3.3. Análise de loci microssatélites conservados entre espécies e subgêneros

Para as análises populacionais nos 150 indivíduos coletados das 19 espécies, e apenas nove loci foram utilizados, os mais conservados entre as espécies. Os nove *loci* microssatélites apresentaram em média sete alelos, variando de cinco (PE88) a nove alelos (PE15 e PE18) por *loci*. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0.54 (PA08) a 0.83 (PE18) com média de 0.69. Verificou-se que os *loci* analisados mais conservados foram PE88, PA05 e PA08 (Tab. 2), de acordo com a quantidade de dados perdidos. A porcentagem de ausência de alelos foi menor para os loci PA05 (8), PA08 (8) e PE88(10.7), e estes também apresentaram valores altos para Pic, He e FM (Frequência máxima).

Tabela 2. Análise descritiva para os 150 indivíduos de 19 espécies do gênero *Passiflora*

<i>Locus</i>	% A	NA	PIC	Ho	FM
U04	24.7	6	0.5571	0.6277	0.4649
PE15	37.3	9	0.7114	0.7467	0.3936
PE18	20.7	9	0.8316	0.8499	0.2083
PE75	30.7	6	0.7414	0.7769	0.3019
PE88	10.7	5	0.5904	0.6259	0.5672
PA05	8	7	0.7864	0.8129	0.259
PA07	14.7	7	0.7346	0.7661	0.3789
PA08	8	7	0.5489	0.579	0.6187
PA10	31.3	7	0.7359	0.7698	0.3269
Média	20.68	7	0.69	0.73	0.39

%A: Porcentagem de perda de alelos; NA: Número de alelos; PIC: Conteúdo de informação polimórfico; Ho: heterozigiosidade observada; FM: frequência máxima.

Para os subgêneros avaliados verifica-se que os loci PE88, PA05 e PA08 também apresentaram menor porcentagem de alelos perdidos, principalmente para o subgênero *Passiflora*, demonstrando que esses *loci* são mais conservados devido a menor porcentagem de perda de alelo. Estes marcadores foram desenvolvidos para as espécies *Passiflora edulis* e *Passiflora alata*, ambas do subgênero *Passiflora* (Tab 3). Para o subgênero *Passiflora* o número de alelos por *locus* variou de quatro a nove, o PIC foi de 0.48 a 0.82, a heterozigiosidade de 0.56 a 0.84 e a frequência máxima de 0.25 a 0.59. Para *Decaloba*, o PA07 apresentou a menor porcentagem de alelos perdidos. No

entanto, PE88, PA05 e PA08 também apresentaram uma baixa porcentagem de alelos perdidos em relação aos demais. O número de alelo variou de 4 a 7, o PIC de 0.45 a 0.75 e He de 0.48 a 0.79. Para o subgênero *Astropheia* os loci U04 e PA08 não apresentaram perda de alelo, e os loci PE88, PA05 e PA07 apresentaram as menores porcentagens de alelo perdidos. Este foi o subgênero que apresentou menor número de alelo (3 a 1), o Pic foi de 0 a 0.53, He variou de 0 a 0.61, isso pode ser devido à baixa amostragem de indivíduos.

Tabela 3. Análise descritiva para os subgêneros *Passiflora*, *Decaloba* e *Astrophea*. O número de indivíduos e as espécies pertencentes a cada subgênero encontra-se na Tabela 1.

<i>Passiflora</i>					
<i>Locus</i>	% A	NA	PIC	Ho	FM
U04	19.2	4	0.4878	0.5687	0.5476
PE15	35.6	9	0.7239	0.7583	0.3731
PE18	19.2	9	0.8241	0.8428	0.250
PE75	21.2	5	0.7399	0.7761	0.2988
PE88	6.7	5	0.5589	0.5945	0.5979
PA05	2.9	7	0.7738	0.8029	0.2723
PA07	14.4	6	0.7134	0.7534	0.3483
PA08	7.7	6	0.5718	0.6061	0.5885
PA10	22.1	6	0.681	0.7264	0.358
Média	16.56	6.33	0.67	0.71	0.40
<i>Decaloba</i>					
U04	51.72	4	0.5849	0.6429	0.5
PE15	41.38	7	0.5583	0.5848	0.6176
PE18	24.14	5	0.7569	0.7903	0.2727
PE75	65.52	5	0.673	0.7	0.5
PE88	27.59	6	0.7122	0.7528	0.3333
PA05	17.24	6	0.7529	0.7821	0.3542
PA07	6.9	5	0.7572	0.7908	0.2407
PA08	13.79	5	0.4518	0.4808	0.7
PA10	51.72	5	0.6707	0.7143	0.4286
Média	33.33	5.33	0.66	0.69	0.44
<i>Astrophea</i>					
U04	0.0	2	0.3698	0.4898	0.5714
PE15	42.86	2	0.3047	0.375	0.75
PE18	57.14	2	0.3457	0.4444	0.6667
PE75	28.57	2	0.2688	0.32	0.8
PE88	14.29	2	0.2392	0.2778	0.8333
PA05	14.29	3	0.5355	0.6111	0.5
PA07	14.29	1	0.0	0.0	1
PA08	0.0	2	0.2149	0.2449	0.8571
PA10	57.14	2	0.3457	0.4444	0.6667
Média	25.4	2	0.29	0.36	0.74

%A: Porcentagem de perda de alelos; NA: Número de alelos; PIC: Conteúdo de informação polimórfico; Ho: heterozigidade observada; FM: frequência máxima.

3.4. Análise entre e dentro de populações de uma espécie

Considerando as populações das espécies *P. alata*, *P. amethystina*, *P. kermesina*, *P. porophylla* e *P. speciosa*, que foram colhidos em mais de uma localidade, de acordo com o descrito na Tabela 1. Foram realizadas análises populacionais para verificar a eficácia da utilização dos microssatélites conservados em análises genéticas populacionais, dentro de espécie.

Para *P. alata*, verifica-se que não existe muita diferença entre as medias dos parâmetros calculados para as duas populações (Tab 4). Para *P. amethystina*, a população 1 (P1) apresentou as menores medias para os parâmetros avaliados. Os loci U04, PE18, PA05, PA08 e PA10 não houve perda de alelos, a He variou de 0 a 0.75, Pic de 0 a 0.71, NA de 1 a 5 e Fm de 0.38 a 1. Na população (P2) teve uma maior percentagem de ausência de alelos, sendo que os loci PA05, PA07, PA08 e PE 18 apresentaram uma menor porcentagem de alelos perdidos. A He variou de 0.2 a 0.75, Pic de 0.19 a 0.7, NA de 3 a 5, FM de 0.33 a 1. Para *P. kermesina*, verifica-se que a P1 apresentou uma menor média de perda de alelos em relação a P2, tendo uma menor percentagem de perda nos loci. No entanto, a P1 apresentou maiores medias de He (0 a 0.78), Pic (0 a 0.74) e NA (1 a 5), e uma menor media de FM (0.29 a 1). Para *P. porophylla*, a P1 apresentou maiores medias para todos os parâmetros avaliados, exceto para FM. A P2 teve uma menor porcentagem de alelos perdidos para os loci U04, PE15, PE18, PE88, PA05, PA07, PA08. A He variou de 0 a 0.75, Pic de 0 a 0.70, NA de 1 a 4, FM de 0.25 a 1. *Passiflora speciosa* os loci PE18, PE88, PA05, PA07 e PA08 não apresentaram porcentagem de alelos perdidos, no entanto a P1 teve maior média do que P2. A He variou de 0 a 0.5 e 0 a 0.67, Pic de 0 a 0.38 e de 0 a 0.59, FM de 0.5 a 1 e de 0.33 a 1, respectivamente para P1 e P2, e em relação ao NA variou de 1 a 3 para as duas populações.

Tabela 4. Análise descritiva para duas populações das espécies *P. alata*, *P. amethystina*, *P. kermesina*, *P. porophylla* e *P. speciosa*.

<i>Passiflora alata</i>										
<i>Locus</i>	P1(n= 4 indivíduos)					P2(n= 3 indivíduos)				
	% A	Ho	Pic	NA	FM	% A	Ho	Pic	NA	FM
U04	50.00	0.38	0.30	2.00	0.75	33.33	0.00	0.00	1.00	1.00
PE15	50.00	0.50	0.38	2.00	0.50	33.33	0.50	0.38	2.00	0.50
PE18	50.00	0.50	0.38	2.00	0.50	66.67	0.00	0.00	1.00	1.00
PE75	25.00	0.44	0.35	2.00	0.67	0.00	0.67	0.59	3.00	0.33
PE88	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.44	0.35	2.00	0.67
PA05	0.00	0.72	0.67	4.00	0.38	0.00	0.44	0.35	2.00	0.67
PA07	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	33.33	0.50	0.38	2.00	0.50
PA08	0.00	0.53	0.47	3.00	0.63	0.00	0.61	0.54	3.00	0.50
PA10	25.00	0.44	0.35	2.00	0.67	25.00	0.44	0.35	2.00	0.67
Média	22.22	0.39	0.32	2.11	0.68	21.30	0.40	0.32	2.00	0.65
<i>Passiflora amethystina</i>										
<i>Locus</i>	P1 (n= 10 indivíduos)					P2 (n= 14 indivíduos)				
	% A	He	Pic	NA	FM	% A	He	Pic	NA	FM
U04	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	28.57	0.49	0.44	3.00	0.67
PE15	40.00	0.28	0.24	2.00	0.83	42.86	0.66	0.61	4.00	0.50
PE18	0.00	0.75	0.71	5.00	0.35	14.29	0.74	0.69	4.00	0.33
PE75	10.00	0.68	0.62	4.00	0.44	42.86	0.75	0.70	4.00	0.25
PE88	10.00	0.44	0.35	2.00	0.67	21.43	0.56	0.48	3.00	0.55
PA05	0.00	0.32	0.27	2.00	0.80	0.00	0.55	0.52	5.00	0.64
PA07	20.00	0.72	0.67	4.00	0.38	7.14	0.65	0.58	3.00	0.38
PA08	0.00	0.18	0.16	2.00	0.90	0.00	0.20	0.19	3.00	0.89
PA10	0.00	0.18	0.16	2.00	0.90	21.43	0.56	0.48	3.00	0.55
Média	8.89	0.39	0.35	2.67	0.70	19.84	0.57	0.52	3.56	0.53
<i>Passiflora kermesina</i>										
<i>Locus</i>	P1 (n= 7 indivíduos)					P2(n= 3 indivíduos)				
	% A	He	Pic	NA	FM	% A	He	Pic	NA	FM
U04	0.00	0.57	0.50	3.00	0.57	33.33	0.00	0.00	1.00	1.00
PE15	14.29	0.78	0.74	5.00	0.33	33.33	0.00	0.00	1.00	1.00
PE18	14.29	0.72	0.67	4.00	0.33	0.00	0.61	0.54	3.00	0.50
PE75	14.29	0.72	0.67	4.00	0.33	0.00	0.44	0.35	2.00	0.67
PE88	14.29	0.44	0.35	2.00	0.67	0.00	0.44	0.35	2.00	0.67
PA05	0.00	0.68	0.65	5.00	0.50	0.00	0.44	0.35	2.00	0.67
PA07	0.00	0.73	0.68	4.00	0.29	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00
PA08	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	33.33	0.00	0.00	1.00	1.00
PA10	0.00	0.41	0.32	2.00	0.71	0.00	0.44	0.35	2.00	0.67
Média	6.35	0.56	0.51	3.33	0.53	11.11	0.27	0.21	1.67	0.80
<i>Passiflora porophylla</i>										
<i>Locus</i>	P1(n= 9 indivíduos)					P2(n= 4 indivíduos)				
	% A	He	Pic	NA	FM	% A	He	Pic	NA	FM
U04	22.22	0.61	0.53	3.00	0.43	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00
PE15	44.44	0.64	0.58	4.00	0.50	0.00	0.38	0.30	2.00	0.75
PE18	11.11	0.75	0.71	5.00	0.38	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00
PE75	22.22	0.65	0.58	3.00	0.43	75.00	0.00	0.00	1.00	1.00

PE88	11.11	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00
PA05	0.00	0.67	0.61	4.00	0.44	0.00	0.75	0.70	4.00	0.25
PA07	11.11	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00
PA08	0.00	0.50	0.38	2.00	0.50	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00
PA10	44.44	0.00	0.00	1.00	1.00	25.00	0.00	0.00	1.00	1.00
Média	18.52	0.42	0.38	2.67	0.63	11.11	0.13	0.11	1.44	0.89
<i>Passiflora speciosa</i>										
	P1(n= 4 indivíduos)					P2(n= 3 indivíduos)				
<i>Locus</i>	% A	He	Pic	NA	FM	% A	He	Pic	NA	FM
U04	50.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00
PE15	75.00	0.00	0.00	1.00	1.00	66.67	0.00	0.00	1.00	1.00
PE18	0.00	0.50	0.38	2.00	0.50	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00
PE75	25.00	0.44	0.35	2.00	0.67	0.00	0.67	0.59	3.00	0.33
PE88	0.00	0.22	0.19	2.00	0.88	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00
PA05	0.00	0.63	0.55	3.00	0.50	0.00	0.44	0.35	2.00	0.67
PA07	0.00	0.38	0.30	2.00	0.75	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00
PA08	0.00	0.38	0.30	2.00	0.75	0.00	0.00	0.00	1.00	1.00
PA10	25.00	0.00	0.00	1.00	1.00	33.33	0.00	0.00	1.00	1.00
Média	19.44	0.28	0.23	1.78	0.78	11.11	0.12	0.10	1.33	0.89

%A: Porcentagem de perda de alelos; NA: Número de alelos; Pic: Conteúdo de informação polimórfico; Ho: heterozigidade observada; FM: frequência máxima.

4. Discussão

De acordo com o agrupamento formado (Fig 2), verifica-se que os grupos alocaram espécies próximas. No G1 foram agrupados táxons do subgênero *Astrophea* (*P. rhamnifolia*), quatro espécies ainda sem identificação, porém com caracteres morfológicos próximos de *Astrophea* e uma única espécie do subgênero *Passiflora* (*Passiflora kermesina*). O G2 foi constituído por espécies do subgênero *Decaloba* (*P. capsularis*, *P. porophylla* e *P. suberosa*) juntamente com *P. contracta* que pertence ao subgênero *Deidamioides*. Essa proximidade entre os subgêneros pode ser explicada pela filogenia proposta para o grupo, onde *Deidamioides* e *Decaloba* são mais próximos entre si (MUSCHNER et al. 2012), em relação a filogeneticamente de *Astrophea* que de *Passiflora* (MUSCHNER et al. 2003; MACDOUGAL; FEILLET, 2004). Os grupos (G3, G4 e G5) agruparam espécies pertencentes ao subgênero *Passiflora*, à exceção da espécie *P. misera*, que pertence ao subgênero *Decaloba* e as espécies sem identificação (*P. sp 4*, *P. sp 8* e *P. sp 17*). A espécie *P. edulis* ficou isolada das demais (G5), esse fato

pode ser justificado pela alta taxa de amplificação para a espécie, o que era esperado, dado que a maioria dos *primers* foram desenvolvidos para a espécie.

A conservação de *loci* microssatélites entre espécies é dependente da coexistência de sítios específicos de anelamento do *primer* com a sequência genômica da espécie (SILVA et al. 2014). A transferibilidade dos *loci*, além de reduzir tempo e custo no desenvolvimento de marcadores específicos, também permitiu a distinção de espécies relacionadas filogeneticamente, como demonstrado em outros trabalhos a exemplo de *Psidium* (TULER et al., 2015) e *Passiflora* (MUSCHNER et al., 2012). O padrão de amplificação dos *loci* microssatélites nas espécies estudadas revelou três grupos de marcadores (Fig 1): os conservados na maioria das espécies, grupo GL1, e os poucos conservados, divididos nos grupos GL2 e GL3.

O padrão de amplificação dos *primers* do grupo GL1 sugere que esses locus permaneceram conservados durante o processo evolutivo do gênero. De acordo com Ferreira-Ramos et al. (2014) marcadores conservados são indicados em estudos de diversidade genética. Além disso, os fragmentos amplificados pelos microssatélites entre diferentes espécies podem permitir a obtenção de marcadores associados a características de interesse (GRATTAPAGLIA et al., 2012).

Para estudos intraespecíficos, marcadores de regiões variáveis são indicados por garantir amplificação de diferentes formas alélicas, evidenciando variações genômicas na espécie. Enquanto para estudos que visam distinguir níveis taxonômicos hierárquicos superiores, como gênero, os marcadores de *loci* conservados podem garantir uma melhor discriminação dos táxons. Como exemplo o SSR U04, que não apresenta amplificação para nenhuma das espécies do subgênero *Decaloba*, evidenciando a ausência do loco no subgênero. No entanto para os demais é tido como um *locus* altamente conservado.

Para confirmar esses dados, foi realizada uma árvore multivariada de regressão. De acordo com a árvore, verifica-se que são necessários 14 *primers* microssatélites para separar as espécies, sendo que ocorre uma semelhança das espécies que estão nos mesmos grupos gerado pelo Heatmap e da árvore de regressão. Estes grupos são: *P. capsularis*, *P. porophylla* e *P. contracta*; *P. speciosa* e *P. speciosa**; *P. junqueirae*, *P. sidifolia* e *P. sp17*; *P. sp11*, *P. sp1* e *P. sp14*; *P. mediterrânea*, *P. mucronata* e *P. amethystina*. Em estudos com 12 espécies de *Campomanesia* foram necessários 13

primers de microssatélites necessários para identificar as espécies (LUBER, 2017). E estudo com 16 espécies de *Piper* foram necessários nove primers para identificar as espécies (CHRIST, 2016).

Com relação a diversidade genética entre as espécies estudadas, verificou-se uma variação de 1 a 9 alelos em todos os *locus* avaliados (Tabela 2; 3; 4). Esse baixo número de alelos por loci, é devido as regiões conservadas do genoma com uma baixa taxa de mutação (PAIVA et al., 2014). No entanto, estudos realizados por Cazé et al (2012) e Cerqueira-Silva et al. (2012) também encontraram baixo número de alelos quando caracterizaram loci de SSR para *P. contracta* e *P. cincinnata*, respectivamente, apresentando um baixo número de alelo, que variou de 2 a 9 para ambas as espécies. Segundo Cerqueira-Silva et al. (2012), isso mostra que se tem um baixo número de alelos por locus e poucos marcadores SSR polimórficos tem sido característico do gênero. Reis et al. (2011) também verificou baixa quantidade de alelo em acessos de maracujá-amarelo que variou de 2 a 4, e segundo este autor, isto pode está relacionado a estreita base genética dos parentais, pois os agricultores fazem uso das sementes de seus pomares para a formação de um novo pomar, isso gera uma pressão de seleção.

O PIC é calculado para informar o quanto cada primer foi informativo entre os acessos (PAIVA et al., 2014), e também é utilizado para verificar a qualidade do *primer* que é estudado (BOTSTEIN et al., 1980). O valor PIC maior que 0.5 evidencia que o marcador é altamente informativo; valores entre 0.25 e 0.50 são considerados razoavelmente informativo; e valores abaixo de 0.24 é considerado levemente informativo (BOTSTEIN et al., 1980). Neste estudo, observou uma variação em relação aos valores de PIC para os marcadores, variando de levemente a altamente informativo, sendo que os marcadores PE15, PE18, PE75 e PA05 foram mais informativos. Em estudo com *P. alata* Curtis, *P. edulis* Sims e *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. também foi verificado que os locus PE18 e PE 15 foram altamente informativos com valores de 0.57; 0.55 e 0. 53 (MACIEL, 2015). Em estudo realizado por Reis et al. (2011) também houve variação do PIC entre 0 a 0.50 para a população MA1 de maracujá-amarelo. Já Oliveira et al. (2005) conseguiram valores de PIC variando de 0 a 0.81 em acessos de *P. edulis*. Bernal-Parra et al. (2014) encontraram valores variando de 0.74 a 0.90 para acessos de *Passiflora ligularis* Juss. Paiva et al. (2014) verificaram marcadores que

variaram de razoavelmente (0.28 – 0.31) a altamente (0.64-0.62) informativo em diferentes espécies de *Passiflora*.

O baixo valor de PIC pode estar relacionado com a concentração da frequência alélica, isso ocorre quando todos os alelos não apresentam frequência semelhantes ou não apresentam distribuição alélica igualmente (PAIVA et al., 2014), estes autores verificaram valores baixos de 0.28-0.31 para dois loci. Similarmente, neste estudo também houve valores baixos de PIC, principalmente no subgênero *Astrophea* e entre as populações das espécies de *P. alata*, *P. amethystina*, *P. kermsina*, *P. porophylla* e *P. speciosa*. E os altos valores de PIC estão relacionados com o equilíbrio e a distribuição das frequências alélicas na população (MISSIO et al., 2010). Desta forma, os loci PE18, PE75, PE15 e PA05 podem ser selecionados para detectar diversidade genética nas espécies do gênero *Passiflora*, por serem considerados altamente informativos. Os valores de PIC também estão relacionados com o tamanho da população utilizada, ou seja, o polimorfismo do loco não foi explorado inteiramente devido a baixa quantidade de indivíduos em uma população, neste pode ocorrer a subestimação do valor de PIC (SILVA, 2010). Em estudo com *Passiflora*, quando utilizou apenas 10 plantas para a conservação dos acessos, verificou-se perda significativa no PIC, sendo que para *P. cincinnata* (60%) e *P. alata* (19%) (CASTRO et al., 2016).

A heterozigosidade refere-se quanto da variação é existente na população e como ela é distribuída por meio de alelos em um determinado loco analisado (SIQUEIRA, 2008). Quando se analisa a H_o dentro população das espécies estudadas e no subgênero *Astrophea* este parâmetro chega a ter valores de zero para alguns locus analisados, demonstrando baixa variabilidade genética. Segundo Siqueira (2008), quando se tem uns valores baixos de H_o significa que se tem pouca variabilidade genética. Valores baixos também foram verificados por Reis et al. (2011) em progênies oriundas de dois ciclos de seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo, em que apresentaram variação para a população MA_0 de 0.04 a 0.60, e na população de MA_1 de 0 a 0.56. Em estudo realizado por Paiva et al. (2014), foram encontrados valores altos variando de 0.33 a 0.69. Em nosso estudo também verificados valores altos, principalmente em relação aos subgêneros *Passiflora* e *Decaloba*, e levando em consideração os 150 indivíduos. Valores mais elevados de heterozigosidade sugerem uma ampla variabilidade genética no gênero *Passiflora* (PAIVA et al., 2014). A

variabilidade e diversidade genética no gênero pode estar relacionada à alogamia e autoincompatibilidade das espécies (PÉREZ-ALMEIDA et al., 2010). Portanto, a diversidade genética é influenciada pelos seguintes fatores: sistema de reprodução, dispersão das sementes, deriva genética, evolução e principalmente pela forma de vida (HU et al., 2014).

5. Conclusão

Os primers desenvolvidos para *P. edulis* e *P. alata* são eficazes e pode ser usado em estudos de diversidade de Passiflora, pois permite a distinção das espécies por meio da transferibilidade entre as espécies da Mata Atlântica.

O perfil de amplificação dos microssatélites por meio da transferibilidade, permite separar as espécies em subgêneros estudos, sendo que há uma maior taxa de transferibilidade para espécies do subgênero *Passiflora*.

Os dados de diversidade genética evidenciaram regiões que são conservadas nas espécies, e isto também é observado nos dados de transferibilidade.

6. Referências

- BERNAL-PARRA, N.; OCAMPO-PÉREZ, J.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, X. Caracterización y análisis de la variabilidad genética de la granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) en Colombia empleando marcadores microsatélites. **Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal**, v. 36, n. 3, p. 598- 611, 2014.
- BORGES, K. P. 2016. Diversidade de Passifloraceae s.s. no Espírito Santo. 2016. 197f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo.
- BORGES, K. P.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A. Passifloraceae sensu stricto do Parque Estadual Cachoeira da Fumaça, Espírito Santo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 68, n. 5, p. 1939-1949, 2017.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BUDAK, H.; SHEARMAN, R. C.; PARMAKSIZ, I.; DWEIKAT, I. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs. **Theor Appl Genet**, v. 109, p. 280–288, 2004.
- CASTRO, J. A.; OLIVEIRA, E. J.; JESUS, O. N.; SOARES, T. L.; MARGARIDO, G. R. A. Molecular markers for conservation genetic resources of four *Passiflora* species. **Scientia Horticulturae**, v. 212, p. 251–26, 2016.
- 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**, v.13, p. 11343-11348, 2012.
- CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SANTOS, E. S. L.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; CARDOSO-SILVA, C. B.; PEREIRA, A. S.; OLIVEIRA, A. C.; CORRÊA, R. X. Genetic variation in a wild population of the “sleep” passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **Genetics and molecular research**. v.11, n.1, p.731–738, 2012.
- CERQUEIRA-SILVA, C.B.M., E.S.L. SANTOS, A.M. SOUZA, G.M. MORI, E.J. OLIVEIRA, R.X. CORRÊA, et al. Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, v. 99, p. 170-172, 2012.
- CERQUEIRA-SILVA, C.D.; SANTOS, E.S.; JESUS, O.N.; VIEIRA, J.G.P.; MORI, G.M.; CORRÊA, R.X.; SOUZA, A.P. Molecular Genetic Variability of Commercial and Wild Accessions of Passion Fruit (*Passiflora* spp.) Targeting *ex Situ* Conservation and Breeding. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 22933-22959, 2014.
- CHRIST, J. A. Diversidade morfológica e molecular em *Piper* (Piperaceae) em um fragmento de Floresta Atlântica. 2016. 104f. Dissertação (Mestrado em Genética e

Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

CRUZ, C. D. GENES - A SOFTWARE PACKAGE FOR ANALYSIS IN EXPERIMENTAL STATISTICS AND quantitative genetics. *Acta Scientiarum*. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

EMBRAPA. **Rede Passitec**: Desenvolvimento tecnológico para uso funcional das passifloras silvestres. 2010.

ESCOBAR, L. K. Passifloraceae. In: Flora de Colombia. Universidad Nacional de Colombia. 1988 p. 1-138.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. 2005. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 187-209.

Fundação SOS Mata Atlântica; Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Instituto socioambiental. Atlas da Evolução dos Remanescentes Florestais e Ecossistemas Associados no Domínio da Mata Atlântica no Período de 1990-1995. São Paulo. 1998.

FARIA, F. S.; STEHMANN, J. R. Biologia reprodutiva de *Passiflora capsularis* L. e *P. pohlii* Mast. (*Decaloba*, Passifloraceae). **Acta Botanica Brasilica**. p. 262-269, 2010.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Passiflora**, v. 14, p. 34-38, 2003

GARCIA-LOR, A.; CURK, F.; SNOUSSI-TRIFA, H.; MORILLON, R.; ANCILLO, G.; LURO, F.; NAVARRO, L.; OLLITRAULT, P. A nuclear phylogenetic analysis: SNPs, indels and SSRs deliver new insights into the relationships in the ‘true citrus fruit trees’ group (*Citrinae*, *Rutaceae*) and the origin of cultivated species. **Annals of Botany**, v.111, p. 1–19, 2013.

GRATTAPAGLIA, D.; VAILLANCOURT, R. E.; SHEPHERD, M.; THUMMA, B. R.; HALE, M. L.; BURG, T. M.; STEEVES, T. E. Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. **Plos One**, v.7, p. 1–10, 2012.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Manual técnico da vegetação brasileira. Manuais Técnicos em Geociências. Rio de Janeiro: IBGE.v.1), 2012.

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. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Embrapa Cerrados, p.81-108. 2005.

- KARACA, M.; INCE, A. G.; AYDINA, A.; AYB, S. T. Cross-genera transferable e-microsatellite markers for 12 genera of the Lamiaceae Family. **J Sci Food Agric**, v.93, p. 1869–1879, 2013.
- KILLIP, E. P. The American Species of Passifloraceae. Associate Curador, Division of plants United States National Museum. **Botanical Series Field Museum of Natural History**, v. 19, p. 8-9, 1938.
- LI, H.; CHEN, X.; YANG, Y.; XU, J.; GU, J.; FU, J.; QIAN, X.; ZHANG, S.; WU, J.; LIU, K. Development and genetic mapping of microsatellite markers from whole genome shotgun sequences in *Brassica oleracea*. **Mol. Breeding**, v. 28, p.585–596, 2011.
- LUBER, J. Diversidade de *Campomanesia* Ruiz e Pav. (Myrtaceae) no Espírito Santo. 2017. 110 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo.
- MACDOUGAL, J. M.; FEUILLET, C. Systematic. In: ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. **Passion flowers of the world**. Timber Press (Portland, Oregon) 2004. p. 27 31
- MACIEL, K. S. Qualidade fisiológica de sementes e diversidade genética de maracujazeiros cultivados em diferentes altitudes no Espírito Santo. 2015. 101 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.
- MACIEL, T. L. Diversidade Genética Em Populações De *Myrsine Umbellata* (Primulaceae) em Remanescentes da Floresta Atlântica. 2015. 59f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal do Espírito Santo. 2015.
- MARTIN, M. A.; MATTIONI, C.; CHERUBINI, M.; TAURCHINI, D.; VILLANI, F. Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genic microsatellite markers. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, p. 735–744, 2010.
- MENDES, S. L.; Padovan, M. da P. A Estação Biológica de Santa Lúcia, Santa Teresa, Espírito Santo. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão* 11: 7-34, 2000.
- MIAH, G.; RAFII, M.Y.; ISMAIL, M.R.; PUTEH, A.B.; RAHIM, H.A.; ISLAM, K.N.; LATIF, M.A. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 499–528, 2013.
- MISSIO, R. F.; TEIXERA, E.; ZAMBOLIM, E. M.; ZAMBOLIM, L.; CRUZ, C. M.; SUSSUMU, N. Polymorphic information content of SSR markers for *Coffea* spp. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, p.89-94, 2010.
- MISTURA; C. C.; BARBIERI; R. L.; CASTRO, C. M.; PRIORI, D.; VILLELA, J. C. B. Transferibilidade de marcadores microssatélites de coco (*Cocos nucifera*) para butiá (*Butia odorata*). **Magistra**, v. 24, n. 4, p. 360-369, 2012.

- MOHAMMADREZA, N.; MARDI, M.; PIRSEYEDI, S. M.; KAZEMI, M.; GHAFFARI, M.R. Comparison of genetic variation among accessions of *Aegilops tauschii* using AFLP and SSR markers. **Genet. Resour. Crop Ev.**, v. 54, p. 237–240, 2007.
- MUSCHER, V.C.; LORENZ, A.P.; CERVI, A.C.; BONATO, S.L.; SOUZA-CHIES, T.T.; SALZANO, F.M.; FREITAS, L.B. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, v. 98, p.1229-1238, 2003.
- MUSCHNER, V.C.; ZAMBERLAN, P.M.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B. Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v.35, p.1036-1043, 2012.
- 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**, v.5, n.2, p.331-333, 2005.
- OLIVEIRA, G.A.F.; PADUA, J.G.; COSTA, J.L.; JESUS, O.N.; CARVALHO, F.M.; OLIVEIRA, E. J. Cross-species amplification of microsatellite loci developed for *Passiflora edulis* Sims. in related *Passiflora* Species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 785-792, 2013.
- 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**. v.5, p.863-865, 2005.
- PAIVA, C. L.; VIANA, A. P.; SANTOS, A. E.; FREITAS, J. C. DE O.; SILVA, R. N. O.; OLIVEIRA, E. J. DE. Genetic variability assessment in the genus *Passiflora* by SSR markers. **Chilean Journal Of Agricultural Research**, v. 74, n. 3, p355-360, 2014.
- PAIVA. C. L. **Descritores morfológicos e marcadores microssatélites na caracterização de germoplasma de *Passiflora* spp.** 2013. 73f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2013.
- PÉREZ-ALMEIDA, I.; VÁSQUEZ GARCÍA, S.; PÉREZ, D.; SALAZAR, E. Genetic diversity in six species of *Passiflora* spp. using RAPD introducción. **Revista Facultad Agronómica**, v. 27, p. 347-359, 2010.
- R, CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.
- REIS, R. V. DOS.; OLIVEIRA, E. J. DE.; VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SILVA, M. G. DE M. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro-amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.46, n.1, p.51-57, 2011.

SILVA, M. A. A. **Caracterização molecular por microssatélites de passifloras Silvestres do BAG** – UESC, Ilhéus – Bahia /. – BA: UESC 2010. xi, 84 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

SINGH, B. K.; THAKUR, A. K.; RAI, P. K. Genetic diversity and relationships in wild species of Brassica and allied genera as revealed by cross-transferable genomic STMS marker assays. **Aust J Crop Sci.**, v.6, n. 5, p. 815–21, 2012.

SIQUEIRA, M. V. B. M. Diversidade genética de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em áreas de Cerrado no Estado do Mato Grosso do Sul e de variedades comerciais por meio de marcadores microssatélites. 2008.

TAN, J.; WANG, J.; LUO, L.; YU, C.; XU, T.; WU, Y.; CHENG, T.; WANG, J.; PAN, H.; ZHANG, Q. Genetic relationships and evolution of old Chinese garden roses based on SSRs and chromosome diversity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 15437, p. 1-27, 2017.

THAKUR, A. K.; SINGH, K. H.; SINGH, L.; NANJUNDAN, J.; KHAN, Y. J.; SINGH, D. SSR marker variations in Brassica species provide insight into the origin and evolution of Brassica amphidiploids. **Hereditas**, v.155, n. 6, p. 1-19, 2018.

TULER, A.C.; CARRIJO, T.T.; NÓIA, L.R.; FERREIRA, A.; PEIXOTO, A.L.; FERREIRA, M.F.S. SSR markers: a tool for species identification in *Psidium* (Myrtaceae). **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 11, p. 1501-1513, 2015.

VIANA, A. J. C.; SOUZA, M. M.; ARAÚJO, I. S.; CORRÊA, R. X.; AHNERT, D. Genetic diversity in *Passiflora* species determined by morphological and molecular characteristics. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 3, p. 535-538, 2010.

YAN, Z.; WU, F.; LUO, ZHAO, Y.; YAN, Q.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHANG, J. Cross-species transferability of EST-SSR markers developed from the transcriptome of *Melilotus* and their application to population genetics research. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-11, 2017.

ZIYA, M. E.; KAFKAS, S.; KHODAEIAMINJAN, M. N. Ç.; GÖZEL, H. Genome survey of pistachio (*Pistacia vera* L.) by next generation sequencing: Development of novel SSR markers and genetic diversity in *Pistacia* species. **Bmc Genomics**, v.17, n.998, 2016.

CAPÍTULO 3

FINGERPRINT DE EXTRATOS DE FOLHAS DE PASSIFLORAS E TOXICIDADE DE INFUSÕES EM *LACTUCA SATIVA* L.

Resumo

As espécies do gênero *Passiflora* são usadas nas áreas, medicinal, industrial, agrícola e farmacêutica. No entanto, as espécies silvestres vêm sendo usadas na cultura popular por apresentarem atividades ansiolíticas, anti-inflamatória, cicatrizantes e antioxidantes. Desta forma, torna-se importante um maior conhecimento sobre as espécies silvestres em relação aos compostos metabólicos presentes e se eles apresentam ação tóxica sobre os organismos. Diante disso, objetivou-se obter o *fingerprint* dos extratos aquosos e clorofórmicos das espécies *P. suberosa*, *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. foetida*, *P. cincinnata*, *P. maliformis*, *P. mucronata*, *P. setacea*, BRS Rubi do Cerrado e BRS Gigante Amarelo, por meio da técnica de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e verificar a toxicidade de extratos aquosos por meio de análises macroscópicas (germinação e crescimento radicular) e microscópicas (índice mitótico, aberrações cromossômicas e nucleares), em bioensaio com *Lactuca sativa*. Na caracterização fitoquímica foi utilizados extratos foliares aquosos e clorofórmicos de dez espécies de *Passiflora* e realizada ressonância magnética nuclear (RMN) usando o Espectro Bruker Avance III de 500 MHz. Para os testes macroscópicos e microscópicos foram colocadas para germinar 30 sementes de *Lactuca sativa* em contato com as infusões nas seguintes concentrações: C₄: 100mg/mL; C₃: 50 mg/mL⁻¹; C₂: 25 mg/mL⁻¹; C₁: 12,5 mg/mL⁻¹, e como controle negativo (Co⁻) água destilada e controle positivo (Co⁺) o Picloram. E foi analisado os seguintes parâmetros: porcentagem de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento da raiz e da parte aérea, índice mitótico, alterações cromossômicas e nucleares. Na composição dos extratos aquosos para RMN verificou-se a presença de glicose, frutose, sacarose, sacarose, colina, alanina, glicina, triptofano, asparagina, treonina e fenóis. Para os extratos clorofórmicos verificou um deslocamento químico característico para flavonoides, alcaloides, taninos, lactonas, saponinas, ácidos graxos e compostos do grupo aldeído. Houve uma redução nos parâmetros de germinação, crescimento radicular e índice mitótico nas maiores concentrações da infusão aquosa, quando comparados ao controle negativo. Verificou-se alterações cromossômicas (c-metáfase; cromossomo pegajoso; cromossomo com atraso; cromossomo perdido) e nucleares (micronúcleo; núcleo condensado) nas células meristemáticas das raízes de alface. O espectro do extrato aquoso demonstrou três regiões principais: açúcares, aminoácidos e dos compostos fenólicos. Os flavonoides e ácidos graxos foram encontrados em todas as espécies, e o alcaloide apenas em BRS gigante amarelo de acordo com os espectros do extrato clorofórmico. As infusões das dez espécies causaram efeitos fitotóxicos, citotóxicos e genotóxicos nas raízes de *Lactuca sativa* nas análises macro e microscópicas, sendo mais frequentes nas maiores concentrações. Essas alterações podem estar relacionadas com a presença de compostos fenólicos. Desta forma, conclui-se que a técnica de ¹HRMN permitiu identificar e caracterizar compostos metabólicos primários e secundários dos extratos aquosos e clorofórmicos das espécies do gênero *Passiflora*. E as infusões aquosas promoveram alterações nas células das raízes meristemáticas, causando efeitos fitotóxicos, citotóxicos e genotóxicos.

Palavra- chaves: RMN; fitotoxicidade; alface; macroscópica; microscópica.

Abstract

Species of the genus *Passiflora* are used in medicinal, industrial, agricultural and pharmaceutical areas. However, wild species are used in popular culture because they present anxiolytic, anti-inflammatory, cicatrizing and antioxidant activities. Thus, a greater knowledge about the wild species regarding the present metabolic compounds and whether they present toxic action on the organisms becomes important. In this study, we aimed to obtain the fingerprint of aqueous and chloroform extracts of the species *P. suberosa*, *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. foetida*, *P. cincinnata*, *P. maliformis*, *P. mucronata*, *P. setacea*, BRS Rubi do Cerrado and BRS Gigante Amarelo, by the NMR (Nuclear Magnetic Resonance) technique and verify the toxicity of aqueous extracts by macroscopic (germination and root growth) and microscopic analyzes (mitotic index, chromosomal and nuclear aberrations), in a bioassay with *Lactuca sativa*. In the phytochemical characterization, we used aqueous and chloroform extracts of ten *Passiflora* species and nuclear magnetic resonance (NMR) was performed using the 500-MHz Bruker Avance III Spectrum. For macroscopic and microscopic tests, 30 seeds of *Lactuca sativa* were germinated in contact with infusions in the following concentrations: C₄: 100mg/mL; C₃: 50 mg/mL⁻¹; C₂: 25 mg/mL⁻¹; C₁: 12.5 mg/mL⁻¹, and as negative control (Co-) distilled water and positive control (Co +) Picloram. The following parameters were analyzed: percentage of germination, germination speed index, root and shoot length, mitotic index, chromosomal and nuclear alterations. In the composition of aqueous extracts for NMR, we verified the presence of glucose, fructose, sucrose, choline, alanine, glycine, tryptophan, asparagine, threonine and phenols. For the chloroform extracts, a characteristic chemical shift was found for flavonoids, alkaloids, tannins, lactones, saponins, fatty acids and compounds of the aldehyde group. There was a reduction in the parameters of germination, root growth and mitotic index at the highest concentrations of the aqueous infusion, when compared to the negative control. Chromosomal (c-metaphase, sticky chromosome, delayed chromosome, lost chromosome) and nuclear (micronucleus, condensed nuclei) alterations were observed in the meristematic cells of the lettuce roots. The spectrum of the aqueous extract showed three main regions: from sugars, amino acids and phenolic compounds. Flavonoids and fatty acids were found in all species, and the alkaloid was only found in BRS gigante amarelo according to the chloroform extracts spectra. The infusions of the ten-species caused phytotoxic, cytotoxic and genotoxic effects on the roots of *L. sativa* in the macro and microscopic analyzes, and it was more frequent at higher concentrations. These changes may be related to the presence of phenolic compounds. Thus, it is concluded that the ¹HMRN technique allowed to identify and characterize primary and secondary metabolic compounds of the aqueous and chloroform extracts of the *Passiflora* species. And the aqueous infusions promoted changes in meristematic root cells, causing phytotoxic, cytotoxic and genotoxic effects.

Keywords: NMR; phytotoxicity; lettuce; macroscopic; microscopic.

1. Introdução

As plantas medicinais são usadas para tratamento, cura e prevenção de doenças, sendo um hábito que acompanha a humanidade (ESTEVAM et al., 2017). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), em países subdesenvolvidos, 80% da população faz uso de plantas medicinais para cuidados básicos e na medicina tradicional utiliza 85% de extratos de plantas (WHO, 2016).

As espécies de *Passiflora* possuem uma longa história de uso como plantas medicinais, sendo utilizadas desde o século XVII na Europa como sedativos (WOSCH et al., 2015). Atualmente, essas espécies são amplamente usadas em medicamentos tradicionais, principalmente como sedativos e ansiolíticos (CORRÊA et al., 2016). No entanto, seu uso foi estudado cientificamente em poucas espécies do gênero (FARAG et al., 2016). Assim, na Farmacopeia Brasileira estão registradas *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2011).

Em diversos estudos realizados com espécies do gênero *Passiflora* foram identificadas substâncias polifenólicas (ZERAIK; YARIWAKE, 2010), ácidos graxos poli-insaturados (KOBORI; JORGE, 2005) e fibras (CÓRDOVA et al., 2005). No entanto, os constituintes químicos encontrados com maior frequência são os flavonoides, especialmente os *C-glicosilados*, que são descritos como os principais constituintes (COSTA et al., 2016). Vários estudos estão sendo realizados para identificar as substâncias químicas presentes nas espécies, como: saponinas, vitexina, isovitexina e isorientina em folhas de *P. edulis* (WANG et al., 2013; DA SILVA et al., 2013); apigina-6-C-a-L-ramnopyranosyl-(1/2)-(600-Oacetil)-b-D-glucopiranoside em folhas de *P. bogotensis* (COSTA et al., 2015); apigenina em pericarpo de *P. quadrangularis* L. (GAZOLA et al., 2015); ácido edulico em casca de *P. edulis* Sims (LEWIS et al., 2013); polissacarídeo em *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. (SILVA et al., 2012), entre outros compostos.

As espécies do gênero *Passiflora* apresentam composições químicas heterogêneas (WOHLMUTH et al., 2010; LI et al., 2011; ZUCOLOTTI et al., 2012), sendo importante identificá-las e caracterizá-las por apresentarem graus de eficiência terapêutica distintas (WOSCH et al., 2017). Uma alternativa para investigar a toxicidade de compostos químicos são os ensaios biológicos com modelos vegetais (GRANT, 1999).

Os modelos vegetais são indicados por apresentarem simplicidade e baixo custo, além de possuir correlação com outros modelos e sistemas testes, incluindo animais (BIANCHI et al., 2015). Dentre os bioensaios com plantas tem-se *Lactuca sativa* (alface), utilizada por apresentar um considerável grau de contato com a solução em estudo, alta sensibilidade, elevado número de sementes e cromossomos grandes (CAMPOS et al., 2008). Além disso, é definido como estático e pode ser usado em avaliações de toxicidade aguda (ANDRADE et al., 2010), sendo confiável, pois dificilmente fornece resultados falsos (AGUIAR et al., 2016). Os testes são realizados por meio de ensaios macroscópicos, que representam fitotoxicidade (germinação, crescimento radicular, crescimento aéreo e índice de velocidade de germinação) e ensaios microscópicos, que representam citotoxicidade e genotoxicidade (análise de alterações no ciclo celular, alterações cromossômicas e nucleares em geral) (SILVEIRA et al., 2017). Estes ensaios permitem uma maior compreensão dos mecanismos de ação de substâncias e de resíduos tóxicos a serem estudados (ANDRADE et al., 2010; PALMIERI et al., 2014; ARAGÃO et al., 2015; FREITAS et al., 2016).

Muitos compostos ativos ainda precisam ser identificados em *Passiflora*, para que se tenha uma compreensão de forma geral da composição química do gênero (FARAG et al., 2016). Dentre as análises usadas para identificação de compostos químicos destaca-se a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN). Esta análise é altamente versátil e aplicada em diversas áreas como física, química, biologia e na medicina (GIRAUDEAU et al., 2014). Esta ferramenta permite a elucidação das estruturas de compostos naturais ou sintéticos, e tem a vantagem de permitir o acesso simultâneo de informações qualitativas e quantitativas (SIMMLER et al., 2014). Esta técnica avalia dois tipos de extratos: aquoso, que permite identificar metabolitos primários (açúcares, acetato, amino ácidos, grupos fenólicos) e o clorofórmico, que possuem sinais bem característicos e permite identificar metabolitos secundários como os flavonoides (SCHRIPSEMA, 2010). Desta forma, objetivou-se obter o *fingerprint* dos extratos aquosos e clorofórmicos de dez espécies do gênero *Passiflora* por meio da técnica de ressonância magnética nuclear (RMN). Além disso, verificar a toxicidade de infusões das espécies *P. suberosa*, *P. alata*, *P. quadrangularis*, *P. foetida*, *P. cincinnata*, *P. maliformis*, *P. mucronata*, *P. setacea*, BRS Rubi do Cerrado e BRS

Gigante Amarelo, por meio de análises do crescimento inicial de sementes e análises microscópicas de meristemas radiculares de alface.

2. Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Para obtenção dos extratos foliares e das infusões foram utilizadas folhas de dez espécies do gênero *Passiflora* (*Passiflora foetida*, *P. alata*, *P. suberosa*, *P. maliformis*, *P. mucronata*, *P. cincinnata*, *P. quadrangularis*, BRS Rubi do Cerrado (*P. edulis* azedo-roxo x *P. alata* x *P. edulis* azedo-amarelo), BRS Gigante Amarelo (*P. edulis* flavicarpa x *P. edulis* flavicarpa) e BRS Pérola do Cerrado (*P. setacea*), que foram coletadas de experimentos instalados no viveiro florestal da Universidade Federal do Espírito.

Para as avaliações de toxicidade dos extratos foliares em bioensaio vegetal, sementes comerciais de *L. sativa* L. (alface) var. Crespa Grand Rapids (Isla Pak) foram adquiridas em comercio local (casa agropecuária).

2.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos extratos aquosos e clorofórmicos das folhas das espécies de *Passiflora*

Para a análise de RMN pesou-se 100mg da amostra das folhas secas (estufa a 40°C por 7 dias) das espécies para o preparo dos extratos aquoso e clorofórmico. Os extratos foram acondicionados em tubos eppendorf. Posteriormente foi adicionado 0.8 mL de agua deuterada-D2O e 0.8 mL de clorofórmio deuterado (CDCl₃) nos 20 tubos eppendorf, que foram agitados em Vortex (PHOENX modelo AP 56) por 2 min e levados ao ultrassom (Cleaner) por 10 min. Esse processo foi repetido 2 vezes, em um período de 16 horas, em temperatura ambiente (25-27 °C). Após a maceração, os tubos foram centrifugados por 10 min e o sobrenadante foi retirado, separando a fração agua e clorofórmio, sendo estes acondicionados em tubos próprios para análise de RMN (Espectrômetro Bruker Avance III de 500 MHz). Para o extrato aquoso foi utilizado o padrão trimetil silil proprianato (TMAP-Na) sendo aplicado em cada amostra uma quantidade de 100 µL. Para obtenção dos espectros de ¹H do material vegetal foram feitos 100 scans. Os espectros foram analisados no programa Date Slate.

2.3. Preparo das infusões das folhas das espécies de *Passiflora* para avaliação fitotóxica

As folhas foram secas em estufa de circulação forçada por setedias a 40 °C. Após a secagem foram trituradas e pesadas 30g de folhas e colocadas em 300 mL de água destilada aquecida à 80-90 °C. Após descanso de 10 minutos, a infusão foi filtrado e o primeiro concentrado de 100 mg mL⁻¹ (C₄) foi obtido (ALMEIDA et al., 2006; PRICHOA et al., 2013). Em seguida, foram feitas diluições para obter as seguintes concentrações: C₃: 50 mg mL⁻¹; C₂: 25 mg mL⁻¹; C₁: 12,5 mg mL⁻¹

2.4. Teste Macroscópico

A germinação das sementes de alface foi realizada em placas de *Petri* de 9 cm de diâmetro, forradas com papel de filtro fino e regadas com as infusões das folhas das dez espécies descritas acima nas quatro concentrações (C₁: 12,5 mg mL⁻¹; C₂: 25 mg mL⁻¹; C₃: 50 mg mL⁻¹; C₄:100 mg mL⁻¹), com cinco repetições (cinco placas) por tratamento. Como controle negativo (Co⁻) utilizou-se água destilada e como controle positivo (Co⁺) foi utilizado o herbicida comercial Picloram (0,1%). Os parâmetros avaliados foram: porcentagem de sementes germinadas (PSG), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da raiz (CR) e comprimento da parte aérea (CA), calculados pelas seguintes fórmulas: $PSG = (\text{total de sementes germinadas} / \text{total de sementes do tratamento} \times 100)$. $IVG = [(N_1 \times 1) + (N_2 - N_1) \times 1/2 + (N_3 - N_2) \times 1/3 + \dots + (N_y - N_{y-1}) \times 1/y]$, em que N_y representa o número de sementes germinadas em um dado período e y representa o número total de períodos de avaliação.

2.5. Teste Microscópico

Cerca de 15 raízes de alface foram coletadas por placa após as 96 h de exposição aos tratamentos, fixadas em uma solução de álcool etílico e ácido acético (3:1) e posteriormente armazenadas a - 18 °C. Após a fixação, as raízes foram lavadas e hidrolisadas em HCl 5 N por 18 minutos em temperatura ambiente e coradas comorceína acética 2%. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram dissociados, cobertos com lamínula e esmagados em ácido-acético 45%. Foram preparadas uma lâmina por placa, totalizando-se cinco lâminas por tratamento. Em cada lâmina, foram contabilizadas aproximadamente 1.000 células, totalizando 5.000 células por

tratamento. Avaliaram-se índice mitótico (IM), alterações cromossômicas (AC), alterações nucleares (AN) e a frequência de cada AC segundo Aragão et al. (2015).

2.6. Análise Estatística

Os dados obtidos com as análises de fitotoxicidade e citotoxicidade foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo Teste de Dunnett. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico GENES (CRUZ, 2013).

3. Resultados

3.1. *Fingerprint* dos extratos aquosos e clorofórmicos das espécies de *Passiflora* pela análise de RMN

Para os extratos aquosos das espécies de *Passiflora* foram realizados *fingerprints* para identificação de metabolitos primários (Anexo I). A Tabela 1 demonstra a presença ou ausência dos compostos primários identificados para as espécies. Os compostos que foram encontrados na maioria das espécies foram glicose (4.6 - 5.2 ppm), colina (3.1 - 3.2 ppm), alanina (1.4 ppm), glicina (3.54-3.47 ppm), triptofano (3.3-3.1 ppm) e fenóis totais (6,0-9.5 ppm).

Os espectros de ^1H RMN permitiu identificar uma mistura de açúcares com um deslocamento químico entre 4,0 a 3,0 ppm. A glicose foi o açúcar presente em todas as espécies apresentando um deslocamento químico entre 4.6 a 5.2 ppm, sendo que *P. setacea* foi a única que apresentou um único pico de glicose no seu extrato aquoso. A frutose foi identificada em *P. setacea* (4.11 ppm) e *P. alata* (4.10 ppm), no entanto sacarose (Figura 1) e sacarose apenas em *P. setacea* em espectro de 5.11 e 4.22 ppm, respectivamente. A treonina não está presente nos extratos de *P. setacea*, BRS gigante amarelo, BRS rubi do cerrado e *P. alata*. E asparagina não foi identificada nos extratos de *P. setacea* e *P. suberosa*. A glicina e o triptofano foram identificados em todas as espécies, sendo que *P. setacea* não foi encontrado triptofano (Tabela 1).

Em relação a quantidade de metabolitos primários presentes nos extratos foliares das espécies, verificou-se que as espécies *P. setacea*, *P. foetida* e BRS gigante amarelo apresentaram maior quantidade de glicose, sendo que BRS gigante amarelo também apresentou alta quantidade de colina, triptofano e fenóis totais (Tabela 2). E *P. foetida* teve menor quantidade de treonina e maior de glicina. *Passiflora quadrangularis* maior

quantidade de treonina. *Passiflora cincinnata* também apresentou um alto valor para alanina (0.169 mg) e colina (0,173 mg), e para BRS rubi do cerrado com 0.176 mg para colina. *Passiflora mucronata* apresentou menores quantidades de glicose, colina, alanina e asparagina, sendo que *P. maliformis* teve maior quantidade de asparagina. *Passiflora alata* teve uma alta quantidade de frutose e não apresentou fenóis totais. *Passiflora suberosa* não apresentou glicina e triptofano.

Nos extratos clorofórmicos verificou-se um deslocamento químico característico para as seguintes classes metabólicas: flavonoides, alcaloides, taninos, lactonas, saponinas, ácidos graxos, compostos do grupo aldeído e glicerol. Os flavonoides e os ácidos graxos estão presentes em todas as espécies. BRS gigante amarelo foi a única que apresentou alcaloides (Figura 2) e *P. suberosa* foi a única que apresentou aldeído (Figura 3) e não teve a presença de taninos e saponinas. A presença do glicerol foi verificada apenas nas espécies BRS gigante amarelo e *P. setacea* em 3,0 e 4,0 ppm. O grupo das lactonas foi verificado nas espécies *P. suberosa*, *P. cincinnata* e *P. alata* (Tabela 1, Anexo II).

Tabela 1. *Fingerprints* dos extratos aquoso e clorofórmicos das dez espécies do gênero *Passiflora*.

Metabólitos	Espécies										
	<i>P. set</i>	BRS RC	BRS GA	<i>P. sub</i>	<i>P. foe</i>	<i>P. qua</i>	<i>P. mal</i>	<i>P. muc</i>	<i>P. cin</i>	<i>P. ala</i>	
Primários											
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Frutose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Sucarose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Treonina	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Asparagina	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Glicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triptofano	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenóis Totais	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metabolitos											
Secundários											
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcaloides	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Lactonas	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Saponinas	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ácidos graxos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aldeido	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

P. setacea (*P. set*); *P. suberosa* (*P. sub*); BRS Rubi do Cerrado (BRS RC); *P. foetida* (*P. foe*); BRS Gigante Amarelo (BRS GA); *P. maliformis* (*P. mal*); *P. mucronata* (*P. muc*); *P. cincinnata* (*P. cin*); *P. alata* (*P. ala*). +: presença; -: ausência

Tabela 2. Quantidade (mg do composto mg⁻¹ da amostra) de metabolitos primários encontrados nas espécies de *Passiflora*.

Metabolitos	Espécies									
	<i>P. set</i>	BRS RC	BRS GA	<i>P. sub</i>	<i>P. foe</i>	<i>P. qua</i>	<i>P. mal</i>	<i>P. muc</i>	<i>P. cin</i>	<i>P. ala</i>
Glicose	0.163	0.159	0.222	0.046	0.2038	0.120	0.096	0.019	0.127	0.157
Sacarose	0.160									
Frutose	0.061									0.106
Sucarose	0.099									
Colina	0.068	0.176	0.213	0.061	0.0888	0.107	0.103	0.053	0.173	0.085
Alanina	0.030	0.061	0.007	0.012	0.0276	0.056	0.028	0.006	0.169	0.044
Treonina				0.004	0.0005	0.018	0.003	0.010	0.007	
Asparagina		0.020	0.015		0.0009	1.385	1.429	0.000	0.009	0.005
Glicina	0.016	0.016	0.035	0.000	0.7964	0.016	0.066	0.005	0.043	0.003
Triptofano	0.000	0.079	0.193	0.000	0.0635	0.053	0.041	0.033	0.009	0.000
Fenóis Totais	0.003	0.007	0.010	0.004	0.003	0.001	0.005	0.003	0.005	0.000

P. setacea (*P. set*); *P. suberosa* (*P. sub*); BRS Rubi do Cerrado (BRS RC); *P. foetida* (*P. foe*); BRS Gigante Amarelo (BRS GA); *P. maliformis* (*P. mal*); *P. mucronata* (*P. muc*); *P. cincinnata* (*P. cin*); *P. alata* (*P. ala*).

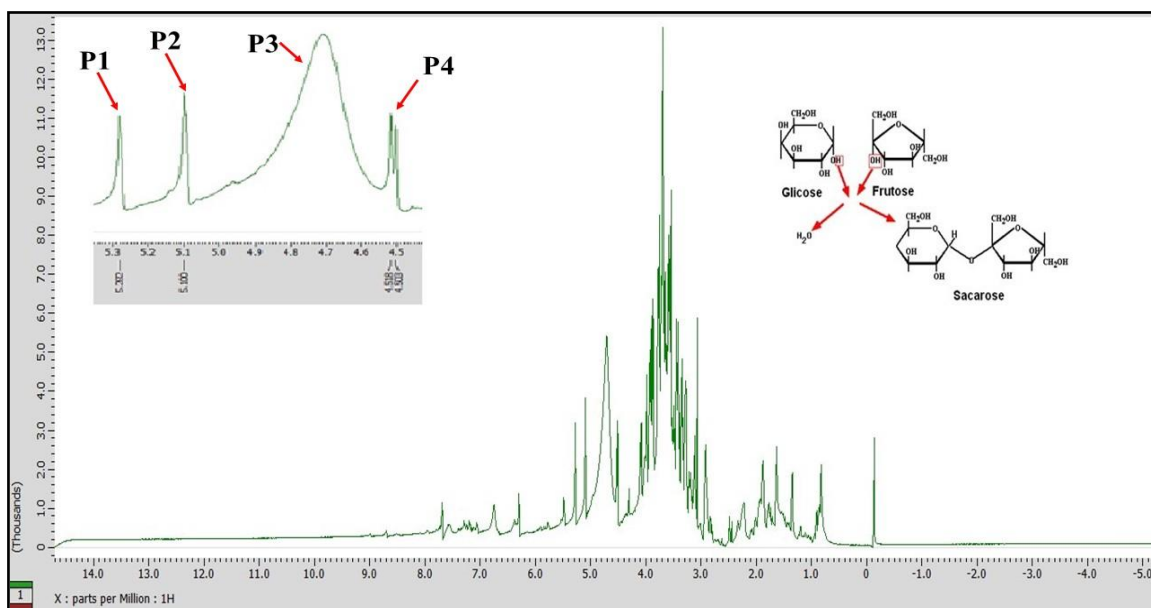


Figura 1. Identificação da sacarose para espécie *P. setacea*. P1: sacarose; P2: sacarose; P3: água e P4: glicose.

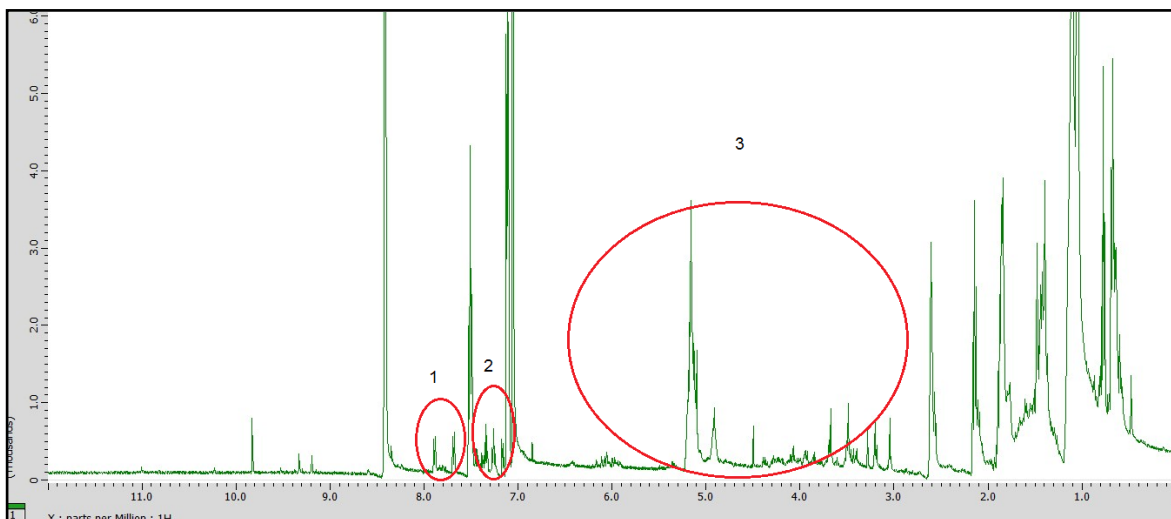


Figura 2. Espectro de $^1\text{HRMN}$ da espécie BRS gigante amarelo da região pertencente dos alcaloides e flavonoide (1 e 2) e ácidos graxos insaturados (3).

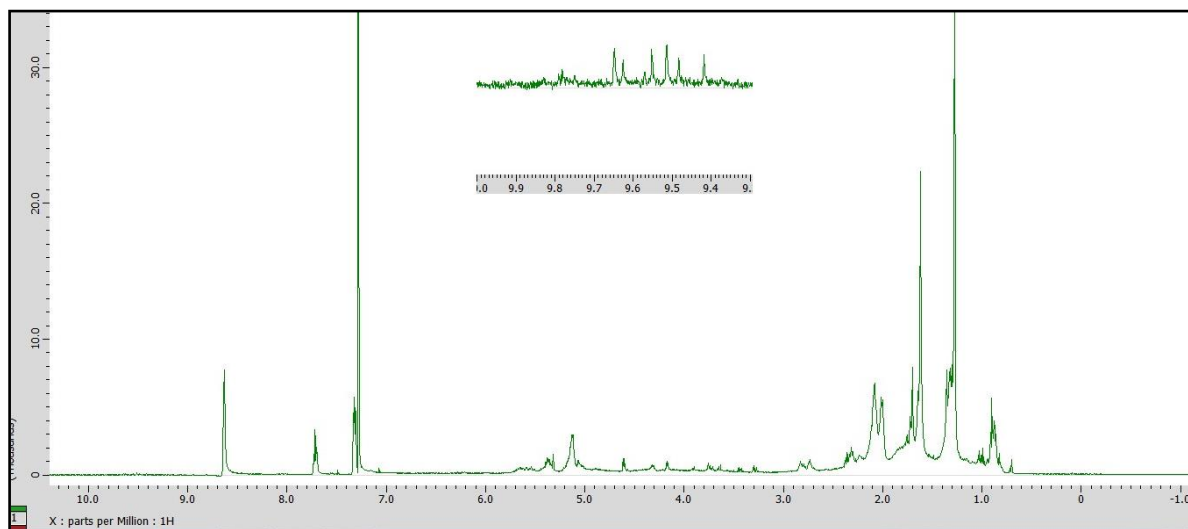


Figura 3. Espectro de $^1\text{HRMN}$ da espécie *P. suberosa* da região pertencentes aos compostos com função de aldeído

3.2. Análises Macroscópicas e Microscópicas

As infusões foliares de todas as espécies avaliadas apresentaram efeito fitotóxico demonstrado pela redução dos parâmetros macroscópicos (germinação, CR, CA e IVG) nas raízes de *Lactuca sativa* (Tabela 3). Quanto maior a concentração das infusões, maior a fitotoxicidade para todas as espécies.

Algumas espécies apresentaram efeitos fitotóxicos similares. As infusões orindas das espécies *P. suberosa* e *P. setacea* foram os mais fitotóxicos, afetando drasticamente todos os parâmetros avaliados principalmente nas duas maiores concentrações (C_3 e C_4),

enquanto nas demais espécies efeito similar foi observado apenas na maior concentração (C₄). Como exemplo na concentração C₃, somente 10% das sementes germinaram para *P. setacea* apresentando um baixo IVG, CR e AC próximos a zero. *Passiflora quadrangularis*, BRS RC (Rubi do Cerrado) e *P. foetida* constituíram o segundo tratamento com maior efeito fitotóxico, ocasionando atraso na velocidade de germinação e retardo no crescimento radicular e aéreo na C₃ em relação ao Co⁻, apresentando redução da germinação para 48, 54 e 66% respectivamente. Os extratos das espécies *P. maliformis*, BRS GA (Gigante Amarelo), *P. mucronata* e *P. cincinnata* causaram efeito fitotóxico intermediário, diferindo dos controles (Co⁻ e Co⁺) para germinação na C₃ (entre 70 a 75%) e redução em torno de 10, 14 e 2 vezes menor que o Co⁻ em relação as alterações de CR, CA e IVG, respectivamente. O extrato de *P. alata* não apresentou redução na germinação comparado ao Co⁻, no entanto o CR, CA e IVG foram reduzidos nas maiores concentrações. As espécies *P. cincinnata*, *P. maliformis* e BRS RC apresentaram crescimento aéreo superior ao Co⁻ na menor concentração (C₁), assim esta concentração não foi fitotóxica para as raízes, mas pode ter estimulado o crescimento (Tabela 3).

Com relação aos efeitos citotóxicos, avaliados pelos parâmetros microscópicos (índice mitótico, alterações cromossômicas e alterações nucleares), verificou-se também maior efeito com o aumento das concentrações dos extratos aquosos avaliados pelos danos ocasionados nas células meristemáticas das raízes (Figura 4, Apêndice I). Na concentração C₄ não foi possível analisar os parâmetros IM, AC e AN, pois não houve germinação das raízes, devido ao efeito toxico ocasionado por essa concentração. De maneira geral, o índice mitótico (IM) diferiu significativamente dos controles na maioria das concentrações. Os extratos aquosos de *P. quadrangularis* e BRS Gigante Amarelo foram os mais citotóxicos, demonstrado pela maior redução da divisão celular (IM) na C₃ em relação ao Co⁺. Os extratos que foram o segundo mais citotóxicos foram *P. alata* e *P. setacea*, tendo uma redução em relação ao Co⁻, no entanto não diferiu do Co⁺. Depois foram os extratos de *P. foetida*, *P. suberosa*, BRS Rubi do Cerrado, *P. mucronata*, *P. cincinnata* e *P. maliformis*, respectivamente, apresentaram uma redução do IM em relação ao Co⁻.

Quanto aos efeitos genotóxicos avaliados pelos parâmetros de alterações cromossômicas (AC%) e nucleares (AN%), houve um aumento das alterações à medida

que aumentou a concentração em relação ao Co^- e Co^+ , sendo estatisticamente diferentes de ambos os controles para a maioria das concentrações dos extratos testados (Figura 4). Os extratos das espécies BRS GA, *P. maliformis*, *P. mucronata*, *P. setacea* e *P. quadrangularis* apresentaram maiores frequências de AN na C3, e *P. alata* foi nas C1 e C2, demonstrando maior efeito genotóxico.

As alterações nucleares aumentaram na C₃ com os extratos de todas as espécies, com maior efeito para *P. quadrangularis*, *P. setacea*, *P. mucronata* e *P. maliformis* indicando menor taxa de divisão celular (Figura 4). Em relação as AN, todos os extratos ocasionaram a formação de micronúcleo (MNC) e núcleo condensado (NC) com maior frequência. Houve aumento de MNC na C₃ e redução em C₁ para todos os extratos aquosos utilizados. Para NC houve aumento nas C₂ e C₃ para todos os extratos aquosos. A maior frequência de MNC e NC foi causada pelo extrato de *P. quadrangularis*, demonstrando maior taxa de mutação e morte celular nas células das raízes de *L. sativa* (Figura 6, Apêndice II).

Os maiores valores de AC foram observados nas menores concentrações nos tratamentos com todas as espécies, sendo mais intensa para *P. quadrangularis*, BRS Gigante Amarelo, *P. alata*, BRS Rubi do Cerrado, *P. maliformis* e *P. setacea* (Figura 4). Este efeito foi maior nas menores concentrações, pois não houve crescimento radicular das raízes nas maiores concentrações testadas, não sendo possível fazer análise de AC.

As alterações cromossômicas que foram observadas para todos os extratos foram: cromossomo pegajoso, cromossomo perdido, cromossomo com atraso e c-metáfase. Das alterações verificadas, cromossomos pegajosos foram observados em maior frequência para os extratos. Os extratos de *P. setacea*, BRS Gigante Amarelo e *P. mucronata* apresentaram frequências mais baixas das alterações na C₃, isto é explicado pelo baixo IM e pela alta presença de AN. O extrato de *P. quadrangularis* apresentou maior frequência de cromossomo perdido e cromossomo com atraso nas C₂ e C₃. *Passiflora alata* apresentou maior frequência de cromossomo pegajoso e c-metáfase nas C₁ e C₂ (Figura 5, Apêndice II).

Tabela 3. Parâmetros fitotóxicos avaliados em sementes de *Lactuca sativa* tratadas com extratos aquoso de espécies do gênero *Passiflora*, com quatro concentrações cada, e controles negativo (água destilada) e positivo (picloran).

Tratamentos	Concentração	G (%)	CR (cm)	CA (CM)	IVG
Co ⁻ Água	-	95.2 a	10.11 a	8.48 a	11.87 a
Co ⁺ Picloran	0.1%	52 b	0.17 b	0.00 b	2.94 b
BRS Pérola do Cerrado (<i>P. setacea</i>)	C ₁	94.4 a	3.68	2.24 b	5.05
	C ₂	90.4 a	1.87	2.29 b	4.31
	C ₃	10.4	0.15 b	0.0 b	0.45
	C ₄	0.0	0.0 b	0.0 b	0.0 b
<i>P. alata</i>	C ₁	96.8 a	6.64	6.57 a	9.00
	C ₂	95.2 a	4.16	4.11 ab	7.75
	C ₃	85.6 a	1.57	2.81 b	3.68 b
	C ₄	0.0	0.0 b	0.0 b	0.0 b
<i>P. foetida</i>	C ₁	96 a	6.25	6.34 a	8.74
	C ₂	97.6 a	3.81	3.74 b	7.36
	C ₃	66.4 b	1.00 b	2.21 b	3.83 b
	C ₄	0.0	0.0 b	0.0 b	0.0 b
BRS Gigante Amarelo (<i>P. edulis</i> flavicarpa x <i>P. edulis</i> flavicarpa)	C ₁	88 a	3.51	5.58 a	9.92
	C ₂	94.4 a	2.81	3.18 b	9.07
	C ₃	74.4	0.73 b	1.77 b	4.98
	C ₄	0.0	0.0 b	0.0 b	0.0 b
<i>P. mucronata</i>	C ₁	97.6 a	5.36	8.69 a	7.96
	C ₂	89.6 a	3.65	2.65 b	5.96
	C ₃	75.2	1.41	2.76 b	5.87
	C ₄	0.0	0.0 b	0.0 b	0.0 b
<i>P. quadrangularis</i>	C ₁	95.2 a	6.52	7.33 a	9.17
	C ₂	94.4 a	4.58	5.47 a	7.37
	C ₃	48 b	0.58 b	0.25 b	2.17 b
	C ₄	0.0	0.0 b	0.0 b	0.0 b
<i>P. suberosa</i>	C ₁	94.4 a	5.14	4.40 ab	9.48
	C ₂	93.6 a	4.05	2.91 b	8.40
	C ₃	0.0	0.0 b	0.0 b	0.0 b
	C ₄	0.0	0.0 b	0.0 b	0.0 b
<i>P. cincinnata</i>	C ₁	97.6 a	5.16	11.04 a	9.23

	C ₂	98.4 a	3.56	5.87 a	6.61
	C ₃	75.2	1.73	1.26 b	3.83 b
	C ₄	0.0	0.0 b	0.0 b	0.0 b
<i>P. maliformis</i>	C ₁	98.4 a	4.50	13.03	11.92 a
	C ₂	94.4 a	3.02	3.37 b	10.92 a
	C ₃	70.4	0.96 b	0.63 b	5.87
	C ₄	0.0	0.0 b	0.0 b	0.0 b
BRS Rubi do Cerrado (<i>P. edulis</i> azedo-roxo x <i>P. alata</i> x <i>P. edulis</i> azedo-amarelo)	C ₁	94.4 a	4.18	13.81	7.42
	C ₂	84.8 a	2.19	2.11 b	3.85 b
	C ₃	54.4 b	0.58 b	2.27 b	2.27 b
	C ₄	0.0	0.0 b	0.0 b	0.0 b

As médias seguidas pela mesma letra *a* (Co-) nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de probabilidade, pelo Teste Dunnet. As médias seguidas pela letra *a* são estatisticamente semelhantes ao controle negativo e as medias seguidas pela letra *b* são estatisticamente semelhantes ao controle positivo em nível de 5% de probabilidade, pelo Teste Dunnet.

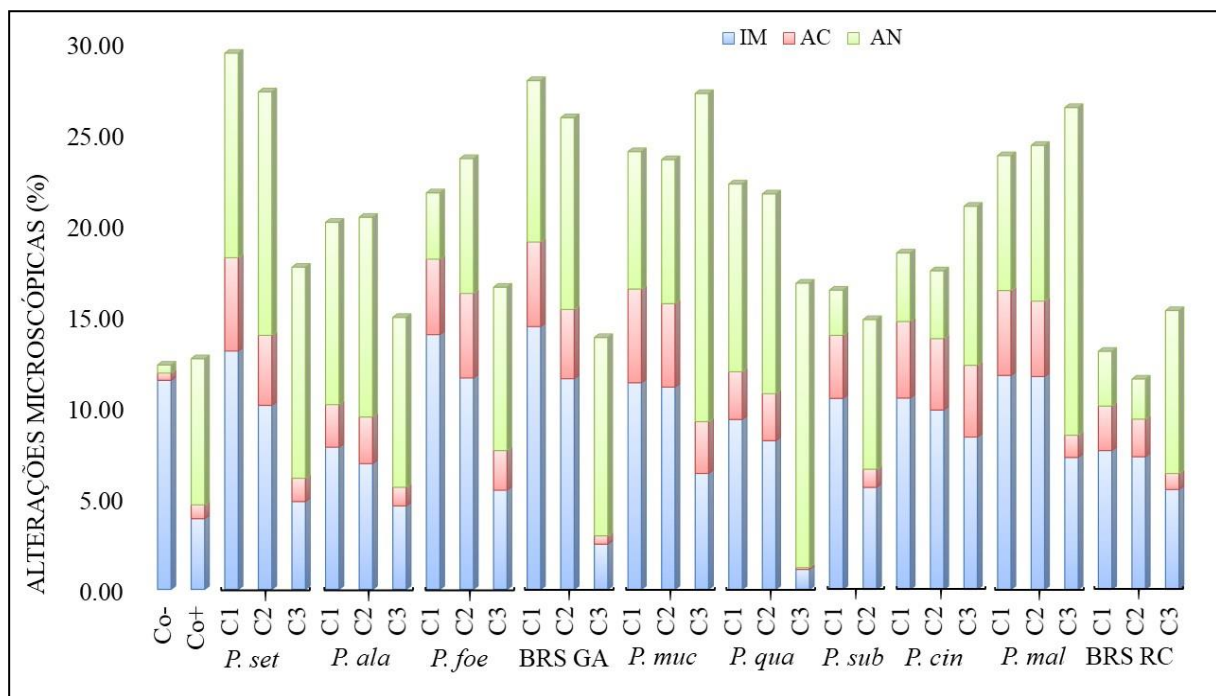


Figura 4. Alterações microscópicas observadas em células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* tratadas com extratos aquosos de folhas das espécies do gênero *Passiflora*, com quatro concentrações cada, e controles negativo (Co⁻: água destilada) e positivo (Co⁺: picloran). Espécies: *P. setacea*; *P. alata*; *P. foetida*; BRS GA (Gigante Amarelo); *P. mucronata*; *P. quadrangularis*; *P. suberosa*; *P. cincinnata*; *P. maliformis*; BRS RC (Rubi do Cerrado). IM: índice mitótico; AC: alterações cromossômicas; AN: alterações nucleares.

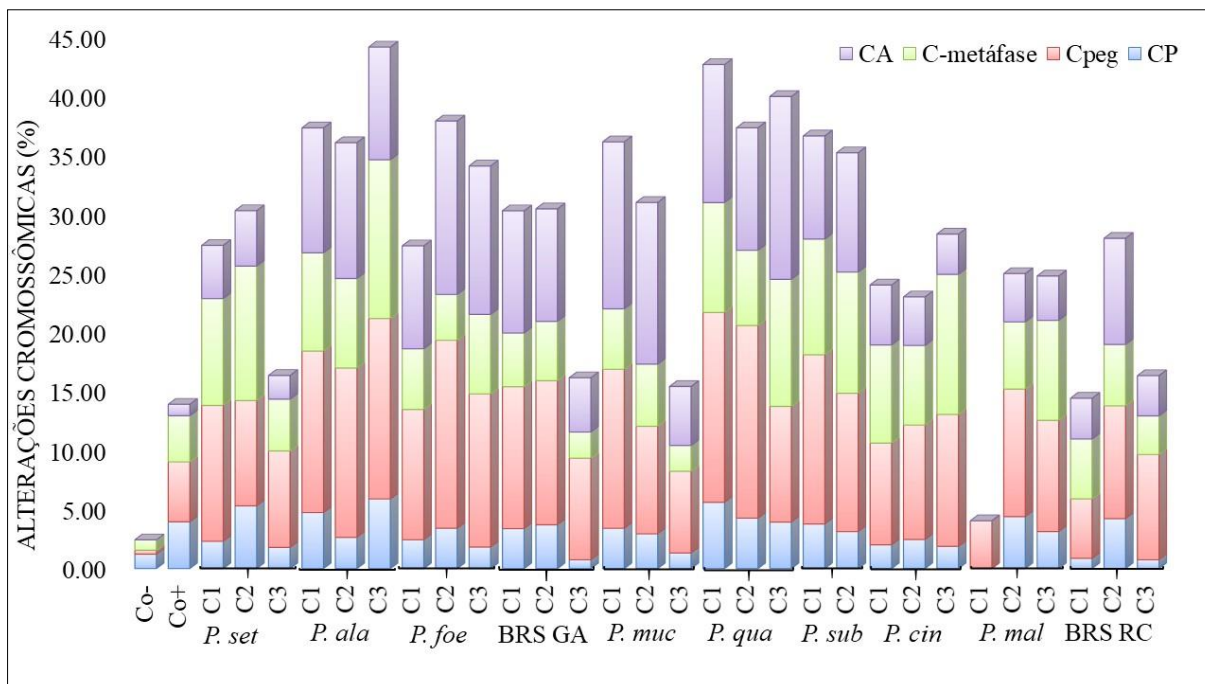


Figura 5. Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* tratadas com extratos aquosos de folhas de espécies do gênero *Passiflora*, com quatro concentrações cada, e controles negativo (Co⁻: água destilada) e positivo (Co⁺: picloran). Espécies: *P. setacea*; *P. alata*; *P. foetida*; BRS GA (Gigante Amarelo); *P. mucronata*; *P. quadrangularis*; *P. suberosa*; *P. cincinnata*; *P. maliformis*; BRS RC (Rubi do Cerrado). CA: cromossomo com atraso; C-metáfase; Cpeg: cromossomo pegajoso; CP: cromossomo perdido

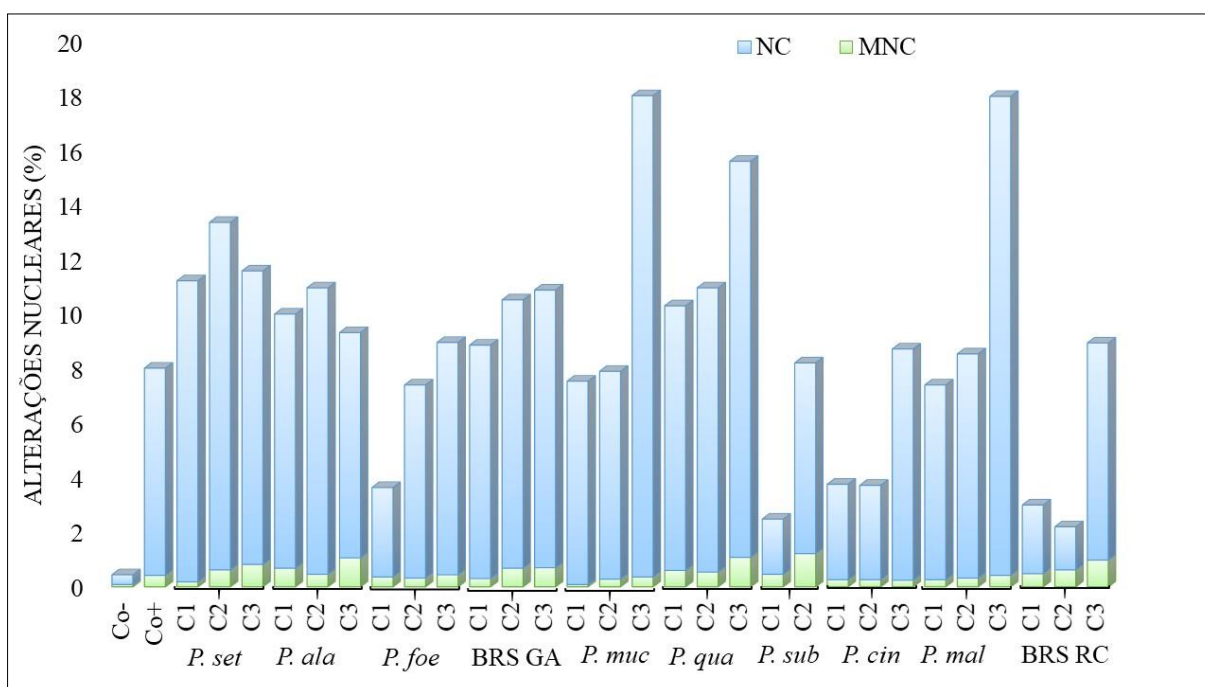


Figura 6. Alterações nucleares observadas em células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* tratadas com infusões aquosas de folhas de espécies do gênero *Passiflora*, com quatro concentrações cada, e controles negativo (Co⁻: água destilada) e positivo (Co⁺: picloran). Espécies: *P. setacea*; *P. alata*; *P. foetida*; BRS GA (Gigante

Amarelo); *P. mucronata*; *P. quadrangularis*; *P. suberosa*; *P. cincinnata*; *P. maliformis*; BRS RC (Rubi do Cerrado). NC: núcleo condensado; MNC: micronúcleo.

4. Discussão

4.1. *Fingerprint* dos extratos aquosos e clorofórmicos das espécies de *Passiflora* pela análise de RMN

Os perfis aquosos e clorofórmicos das espécies de *Passiflora* estudadas (espectros de ^1H -RMN, Anexo 1) através dos espectros de hidrogênio foram obtidos. Dessa forma, as substâncias foram extraídas em diferentes polaridades para que todos os compostos, ou a maioria deles pudessem serem extraídos.

O uso da técnica de RMN ainda é pouco utilizada para análise de espécies do gênero *Passiflora*. Este trabalho usou essa técnica para identificar os metabolitos presentes nas espécies por meio da espectroscopia de ^1H -RMN. Os compostos identificados estão listados na Tabela 1 e a quantidade dos compostos para os extratos aquosos na Tabela 2.

Os espectros de ^1H -RMN dos extratos aquosos de folhas de *P. setacea*, *P. suberosa*, *P. alata*, *P. maliformis*, *P. cincinnata*, *P. mucronata*, *P. quadrangularis*, *P. foetida*, BRS gigante amarelo e BRS rubi do cerrado mostram três regiões principais: dos açúcares, dos aminoácidos e dos fenóis totais. A região dos açúcares (3.4 – 5.4 ppm) mostrou sinais mais intensos, sendo identificados a glicose, frutose e sacarose. Apesar de possuir sinais intensos nessa região, ainda assim é difícil de identificar os açúcares presentes, pois se tem uma sobreposição dos picos (SCHRIPSEMA, 2010). Na região do amino ácido também apresentou picos mais intensos na região de 3.2 - 1 ppm, sendo identificados alanina, colina, treonina, glicina e asparagina. No entanto, a região caracterizada pelos fenóis totais apresentou espectros com menor intensidade (9.5 - 6 ppm). Em estudo realizado com *P. incarnata* por ^1H -RMN também encontram a presença de metabolitos primários em sinais mais intensos (0 – 6 ppm) e uma região com sinais menos intensos que representa os C-flavonoides (FARAG et al., 2016).

Para *P. setacea* verificou-se a presença da sacarose (dissacarídeo formado por glicose e frutose). A confirmação da presença da sacarose está no deslocamento com 5,4 ppm evidenciando um dubleto, que representa o hidrogênio anomérico da sacarose.. A sacarose nessa espécie apresenta possível diferença no metabolismo relacionado a respiração, onde a sacarose não foi completamente transformada em glicose. Em estudo

realizado para verificar o estresse osmótico causado por sacarose nos metabolitos, verificaram que em concentrações maiores de sacarose também tinham maiores níveis de glicose e frutose, isso indica que a hidrólise extracelular da sacarose ocorreu, levando a formação da glicose e frutose (CUI et al., 2010), provavelmente o que não ocorreu com a espécie em estudo.

Nos espectros de $^1\text{H-RMN}$ dos extratos clorofórmicos de folhas das dez espécies foi possível observar que na região do H aromático (6,0 – 8,0 ppm) há presença de sinais característicos de flavonoides (BORELLA, FONTOURA, 2002). Além disso, todas as espécies estudadas apresentaram sinais característicos de acetatos (2 ppm) e uma região dos alcaloides, saponinas, taninos, triterpenos e lactonas com possível presença de cumarinas. Em estudo fitoquímico feito com a espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* também verificou a presença de flavonoides, alcaloides, cumarinas, saponinas, taninos, triterpenos e esteroides (XAVIER et al., 2016).

Nas espécies de *P. alata*, *P. setacea*, *P. maliformis*, *P. cincinnata*, *P. mucronata* e *P. quadrangularis* apresentaram semelhanças nos perfis sugerindo sinais característicos de flavonoides (Anexo 1). Os flavonoides são metabolitos polifenólicos encontrados em diversas espécies e desempenham atividade neurofarmacológica (COLETA et al., 2006; HERRERA-RUIZ et al., 2011), e possuem efeito analgésico (HIGGS et al., 2013). Em análise fitoquímica de flavonoides da espécie *P. incarnata* verificou que cerca de 2.5% dos constituintes presentes nos extratos das folhas são de flavonoides (MARCHART et al., 2003; MIRODDI et al., 2013). Em estudo comparativo dos perfis cromatográficos de folhas de diversas espécies de *Passiflora* Wosch et al (2017) também verificaram a presença de flavonoides nos extratos das folhas, principalmente a presença de isoorientina, orientina, vitexina, isovitexina.

A espécie BRS gigante amarelo apresentou uma quantidade maior principalmente dos alcaloides, flavonoide e compostos glicosilados. Dentre os principais compostos metabólicos encontrados em *Passiflora* tem-se os alcaloides e os flavonoides (VIEIRA, 2013). Estes compostos protegem o organismo contra as espécies reativas de oxigênio e apresentam ação ansiolíticas (DHAWAN et al., 2004; WOODMAN, 2004; ROJAS et al., 2006; VARGAS et al., 2007; BENINCÁ et al., 2007). Em estudo fitoquímico de *P. incarnata* verificou a presença de alcaloides de 13.4% nas folhas (AMAN et al., 2016).

Nos extratos clorofórmicos das espécies *P. setacea* e BRS gigante amarelo foram observados sinais com maiores intensidades mostrando a presença de glicerol. O glicerol tem maior importância na fabricação de biodiesel por meio da transesterificação, em que um triglicerídeo em contato com um álcool vai formar o glicerol e éster (SANTOS, 2015). Em estudo realizado para obter biodiesel a partir do óleo de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener) verificaram a presença de glicerol na região de 4,10 a 4,20 por meio da técnica de ¹HMRN (SANTOS, 2015).

A espécie *P. suberosa* foi a única espécie que apresentou uma série de sinais (10,0 e 9,0 ppm) que são característicos de compostos com função de aldeídos. Nas espécies de maracujá o aldeído é considerado um dos compostos responsáveis pelo aroma do fruto (MACORIS, 2010). Em estudo para verificar compostos voláteis verificaram a presença de 16% de aldeído presente em resíduo de maracujá (OLIVEIRA et al., 2012).

4.2. Análises Macroscópicas e Microscópicas

Neste estudo foram constatados efeitos de fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade das infusões avaliadas para as dez espécies do gênero *Passiflora*, por análises macroscópicas e microscópicas no sistema *Lactuca sativa*. Esses efeitos foram mais frequentes nas maiores concentrações.

Nas análises realizadas das infusões foi verificado efeito de dose-dependência, evidenciado pelo aumento dos danos com aumento das concentrações. A germinação, o crescimento radicular, crescimento aéreo e IVG foram reduzidos nas maiores concentrações para todas as espécies, demonstrando efeito fitotóxico nas raízes de *Lactuca sativa*. Em estudo realizado com extratos de *Solanum muricatum* e *Solanum betaceum* também verificaram a inibição do crescimento radicular e da germinação na maior concentração, demonstrando efeito fitotóxico dos extratos (SANTOS et al., 2018). A redução do crescimento radicular pode estar relacionada com o aumento no número de células, ao processo de alongamento das células (FUSCONI et al., 2006) e à inibição da síntese de proteínas (SETH et al., 2007). O crescimento de um órgão na planta, está relacionado com os sucessivos ciclos de divisão celular (HARASHIMA, SCHNITTGER, 2010).

Desta forma, se não ocorrer interferência do composto usado nas fases do ciclo mitótico, vai acontecer a proliferação celular sem afetar o comprimento da raiz (SILVEIRA et al., 2017). Assim, verificou-se que as infusões das espécies afetaram o ciclo celular, por impedir o crescimento radicular das sementes nas maiores concentrações, principalmente na C₄. Isto pode estar relacionado com a presença de compostos fenólicos, pois estes têm a capacidade de alterar a permeabilidade da membrana plasmática, a síntese de proteína e de hormônios, atividade enzimática, conseqüentemente afetando o crescimento normal das plantas (LI et al. 2010). E de acordo com o perfil fitoquímico dos extratos aquosos obtidos pela técnica de RMN H¹, verifica a presença de compostos fenólicos. Segundo Costalonga e Batitucci (2014), uma exposição prolongada das sementes em concentrações maiores afeta o funcionamento do ciclo celular, e isto pode ser explicado pelo aumento da concentração dos fitoquímicos nas doses mais altas, tornando seus efeitos mais fortes sobre o ciclo celular.

O índice mitótico (IM) teve um decréscimo em relação ao controle negativo para todas as infusões na C₃, indicando a ocorrência de efeito citotóxico nas raízes, principalmente para *P. quadrangularis* e BRS gigante amarelo que apresentaram menores valores de índice mitótico. A citotoxicidade de um composto pode ser determinada pelo aumento ou pela redução do IM (LUBINI et al., 2008). Neste caso, se tem uma redução do IM, isto ocorre pela inibição da divisão celular na interfase, ou pela morte do núcleo interfásico, dificultando o início da prófase, conseqüentemente a divisão celular (SOLOMON et al., 1999). A redução do IM ocasionada pelas infusões das espécies sugere uma inibição da atividade mitótica nas células de *Lactuca sativa*. Em estudo utilizando extrato aquoso de *Ampelocissus latifolia* (Roxb.) Planch, observaram uma redução do IM e do número de células que entraram no ciclo mitótico, aumentando a frequência de células em interfase, isso ocorreu devido ao estresse citotóxico no meristema apical da raiz (CHAUDHURI, RAY, 2015). De acordo com estes autores, isso pode estar relacionado com substância(s) bioativa(s) (taninos, flavonoides, alcaloides, fenólicos, saponinas, terpenos, alcaloides), e estas interagem com o aparato mitótico.

De acordo com o tipo de alteração determina-se o efeito causado pelo composto, podendo ser aneugênico e/ou clastogênico (FENECH, 2000). Alterações que causam

modificações no fuso mitótico são conhecidas como aneugênicas (BERNARDES et al., 2015). Todas as infusões apresentaram efeito aneugênico, devido ao aumento das frequências de cromossomos perdidos, c-metáfase, cromossomo pegajoso, cromossomo com atraso, e estas alterações são cromossômicas. A presença de alterações cromossômicas podem está relacionadas com efeitos dos aleloquímicos presentes nas infusões, como foi verificado no extrato de *L. rufogrisea* em que observaram alterações na estrutura do DNA e proteínas, sendo que para proteínas a alteração esta relacionada com o crescimento e diferenciação celular, e isto foi devido aos aleloquímicos presentes, como compostos fenólicos, saponinas, triterpenos e esteroides (ARAGÃO et al., 2017).

A formação de c-metáfases esta relacionada com a inativação do fuso mitótico (FISKESJO, 1985), assim não haverá a formação da placa equatorial, levando a uma interrupção da divisão celular (FERNANDES et al., 2009). Os cromossomos pegajosos, são formados por alterações na estrutura dos cromossomos prejudicando sua condensação normal e resultando em aglomerados (BABICH et al., 1997). Essa alteração está normalmente associada a um forte efeito citotóxico, e é irreversível podendo levar a morte celular (EL-GHAMERY et al, 2003).

Os cromossomos com atraso são formados devido a uma interferência na despolimerização do fuso, ou seja, se houver alguma interferência na polimerização do fuso pode impedir o encurtamento do fuso e promover um atraso dos cromossomos para os polos (FERNANDES et al., 2009). Assim, estes são envolvidos pelo envelope nuclear, antes de serem incorporados aos outros cromossomos (SERRANO; MONTEIRO-MONTOYA, 2001). Os cromossomos perdidos são formados devido a falta parcial de polimerização das fibras do fuso mitótico, isso faz com que o cromossomo não seja orientado para o equador da célula no momento da divisão (FERNANDES et al. 2009), e são observados em células metafásicas (SANTOS et al., 2018).

Para as infusões aquosas estudadas, as alterações nucleares (AN) foi o parâmetro mais afetado das análises microscópicas, diferindo em todos os casos do controle negativo e similar ao controle positivo (Figura 5). Estas alterações foram observadas em todos os extratos das espécies nas concentrações usadas, tendo um acréscimo na maior concentração. As infusões de *P. mucronata*, *P. maliformis* e *P. quadrangularis*

apresentaram um aumento de núcleo condensados na maior concentração (Figura 3), isto demonstra morte das células e baixa divisão celular, que tem correlação com a baixa porcentagem de germinação e com o crescimento radicular. Isto foi verificado para essas espécies, principalmente para *P. quadrangularis* (Tabela 4). Com relação aos micronúcleos também houve um acréscimo na maior concentração. Os micronúcleos são originados de cromossomos perdidos ou de fragmentos cromossômicos acêntricos (FENECH et al., 2011; FERNANDES et al., 2007). Em estudo sobre a genotoxicidade e toxicidade de extrato de *P. alata* verificaram que o extrato ocasionou um aumento na frequência de micronúcleo na maior concentração (50 mg/Kg) demonstrando efeito genotóxico (BOEIRA et al., 2010).

5. Conclusão

A técnica de ¹HRMN permite identificar e caracterizar compostos metabólicos primários e secundários dos extratos aquosos e clorofórmicos das espécies do gênero *Passiflora*.

As infusões das dez espécies de *Passiflora* apresentam efeitos fitotóxicos pela redução na germinação, IVG, crescimento radicular e aéreo.

O índice mitótico mostrou um efeito alelopático das infusões das espécies pela redução na divisão celular no meristema das raízes de *Lactuca sativa*.

As infusões das dez espécies de *Passiflora* apresentaram efeitos citotóxicos e genotóxicos nas raízes, pelo aumento da frequência nas alterações cromossômicas e nucleares.

6. Referência

AGUIAR, L. L.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVID, J. A. DE O. Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.133, p. 366–372, 2016.

ALMEIDA, K. C.; BARBOSA, T. R.; SILVA, R. N. R.; JACQUES, D. S.; FREIRE, R. B. Efeito citotóxico do infuso aquoso de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). **Rev. Bras. Farm.**, v. 87, n. 2, p. 60-62, 2006.

AMAN, U.; SUBHAN, F.; SHAHID, M.; AKBAR, S.; AHMAD, N.; ALI, G.; FAWAD, K.; SEWELL, R. D. E. *Passiflora incarnata* attenuation of neuropathic allodynia and vulvodinia apropos GABA-ergic and opioidergic antinociceptive and behavioural mechanisms. **Complementary and Alternative Medicine**, p. 16-77, 2016.

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotox Environ Saf** , v. 73, p. 626-631, 2010.

ARAGÃO, F. B.; PALMIERI, M. J.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; QUEIROZ, V. T.; PINHEIRO, P. F.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on *Lactuca sativa* L. **Allelopathy Journal**, v. 35, p. 259-272, 2015.

ARAGÃO, F. B.; QUEIROZ, V. T.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; PINHEIRO, P. F.; CARRIJO, T. T.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Rev. Biol. Trop.**, v. 65, n. 2, p. 435-443, 2017.

BABICH, H.; SEGALL, M. A.; FOX, K. D. The Allium test - a simple, eukaryote genotoxicity assay. **The American Biology Teacher**, v. 59, n. 9, p. 580-583, 1997.

BENINCÁ, J. P.; MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTTI, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, v. 2014, p. 1097-1105, 2007.

BERNARDES, P. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; ARAGÃO, F. B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. da S. Toxicity of Difenoconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air and Soil Pollut**, v. 226, p. 207–218, 2015.

BIANCHI, J.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 120, p. 174-183, 2015.

BOEIRA, J. M.; FENNERC, R.; BETTI, A. H.; PROVENSIC, G.; LACERDA, L. DE A.; BARBOSAD, P. R.; GONZALEZD, F. H. D.; CORREAE, A. M. R.; DRIEMEIERE, D.; ALBA, M. P. DALL.; PEDROSO, A. P.; GOSMANN, G.; SILVA, J. DA.; RATES, S. M. K. Toxicity and genotoxicity evaluation of *Passiflora*

alata Curtis (Passifloraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p. 526–532, 2010.

BORELLA, J. C.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonoides em amostras comerciais de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP. **Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p.63-67, 2002.

CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; RODRIGUES, G. S. 2008. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis in Allelopathic Interactions. In: **Plant Bioassays**. Ed. Houston: Studium Press, 344 p.

CHAUDHURI, A.; RAY, S. Antiproliferative activity of phytochemicals present in aerial parts aqueous extract of *Ampelocissus latifolia* (Roxb.) planch. on apical meristem cells. **Int. J. Pharm. Bio. Sci.**, v.6, n. 2, p. 99–108, 2015.

COLETA, M.; BATISTA, M. T.; CAMPOS, M. G.; CARVALHO, R.; COTRIM, M. D.; LIMA, T. C. M.; CUNHA, A. P. da. Neuropharmacological evaluation of the putative anxiolytic effects of *Passiflora edulis* Sims, its sub-fractions and flavonoid constituents. **Phytother Res.**, v. 20, n. 12, p. 1067–73, 2006

CÓRDOVA, K. R. V.; GAMA, T. M. M. T. B.; WINTER, C. M. G.; NETO, G. K.; FREITAS, R. J. S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Degener) obtida por secagem. **Bol. Cent. Pesq. Proc. Alim.**, v. 23, p. 221-230, 2005.

CORREA, R. C.G.; PERALTA, R. M.; HAMINIUK, C. W. I.; MACIEL, G. M.; BRACHT, A.; FERREIRA, I. C.F.R. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (passion fruit). **Trends in Food Science & Technology**, v. 58, p. 79-95, 2016.

COSTA, G. M.; CARDENAS, P. A.; GAZOLA, A. C.; ARAGON, D. M.; CASTELLANOS, L.; REGINATTO, F. H.; et al. Isolation of C-glycosylflavonoids with α -glucosidase inhibitory activity from *Passiflora bogotensis* Benth by gradient high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 990, p. 104-110, 2015.

COSTA, G. M.; GAZOLA, A. C.; ZUCOLOTTI, S. M.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F. A.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P. Chemical profiles of traditional preparations of four South American *Passiflora* species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 451–458, 2016.

COSTALONGA, S. AP.; BATITUCCI, M. DO C. P. B. Evaluation of the mutagenic effects of *Passiflora edulis* Sims (maracujá) tincture on the *Allium cepa* test system. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 1, p. 329-337, 2014.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum. Agronomy (Online)**, v. 35, p. 271-276, 2013.

CUI, X. H.; MURTHY, H. N.; WU, C. H.; PAEK, K. Y. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v.103, n. 1, p. 7–14, 2010.

DA SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B. B.; COLOMEU, T. C.; BATISTA, A. G.; MELETTI, L. M.; PASCHOAL, J. A. R.; et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. **Food Research International**, v. 53, p. 882-890, 2013.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora: a review update. **Journal of ethnopharmacology**, v.94, p. 1-23, 2004.

EL-GHAMERY, A. A.; EL-KHOLY, M. A.; EL-YOUSER, M. A. A. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutation Research**, v. 537, n. 1, p. 29-41, 2003.

FARAG, M. A.; OTIFY, A.; PORZEL, A.; MICHEL, C. G.; ELSAYED, A.; WESSJOHANN, L. A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of genus *Passiflora* leaves using a multiplex approach of UPLC-MS and NMR analyzed by chemometric tools. **Anal Bioanal Chem**, v. 408, p. 3125–3143, 2016.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 2011. 1.ed. Brasília: Anvisa. Disponível em: // http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf/. Acesso: 10 de janeiro de 2018.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A.T.; SURRALLE, J.; CROTT, J.W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagen**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, n.3, p. 252- 259, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of aneugenic agent— Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1680–1686, 2009.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99–112, 1985.

FREITAS, A. S.; CUNHA, I. M. F.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; TECHIO, V. H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.124, p. 426-434, 2016.

- FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E.; MASSA, N.; GALLO, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; BERTA, G. Effect of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 253–260, 2006.
- GAZOLA, A. C.; COSTA, G. M.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F. A.; REGINATTO, F. H.; DE LIMA, T. C.; et al. Involvement of GABAergic pathway in the sedative activity of apigenin, the main flavonoid from *Passiflora quadrangularis* pericarp. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 158-163, 2015.
- GIRAUDEAU, P.; TEA, I.; REMAUD, G. S.; AKOKA, S. Reference and normalization methods: Essential tools for the intercomparison of NMR spectra. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 93, p. 3–16, 2014.
- GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations e a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutat. Res.**, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.
- HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, v.13, p. 66–74, 2010.
- HERRERA-RUIZ, M.; ZAMILPA, A.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; REYES-CHILPA, R.; LEÓN, E.; GARCÍA, M.; TORTORIELLO, J.; HUERTA-REYES, M. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytomedicine**, v.18, n. 14, p. 1255–61, 2011.
- HIGGS, J.; WASOWSKI, C.; LOSCALZO, L. M.; MARDER, M. In vitro binding affinities of a series of flavonoids for μ -opioid receptors. Antinociceptive effect of the synthetic flavonoid 3, 3-dibromoflavanone in mice. **Neuropharmacology**, v. 72, p. 9–19, 2013.
- KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas como aproveitamento de resíduos industriais. **Cien Agrotec**, v. 29, p. 1008 – 1014, 2005.
- LEWIS, B. J.; HERRLINGER, K. A.; CRAIG, T. A.; MEHRING-FRANKLIN, C. E.; DEFREITAS, Z.; HINOJOSA-LABORDE, C. Antihypertensive effect of passion fruit peel extract and its major bioactive components following acute supplementation in spontaneously. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 7, p.1359-1366, 2013.
- LI, H.; ZHOU, P.; YANG, Q.; SHEN, Y.; DENG, J.; LI, L.; ZHAO, D. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* ‘edulis’ and *Passiflora edulis* ‘flavicarpa’. **J. Ethnopharmacol.**, v. 133, p. 1085–1090, 2011.
- LI, Z. H.; WANG, Q.; RUAN, X.; PAN, C. D.; JIANG, D. A. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933-8952, 2010.
- LUBINI, G.; FACHINETTO, J. M.; LAUGHINGHOUSE, H. D.; PARANHOS, J. T.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**, v. 63, p. 647-651, 2008.

- MACORIS, M. S. Influência do estágio de maturação e do cultivo na composição de voláteis do maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). 2010. 209f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, São Paulo. 2010.
- MARCHART, E.; KRENN, L.; KOPP, B. Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis. **Planta Med.**, v. 69, n. 5, p. 452–6, 2003.
- MIRODDI, M.; CALAPAI, G.; NAVARRA, M.; MINCIULLO, P. L.; GANGEMI, S. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **J. Ethnopharmacol.**, v.150, n. 3, p. 791–804, 2013.
- OLIVEIRA, L. C. DE.; SANTOS, J. A. B. DOS.; NARAIN, N.; FONTES, A. DOS S.; CAMPOS, R. S. S.; SOUZA, T. L. de. Caracterização e extração de compostos voláteis de resíduos do processamento de maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência Rural**, v.42, n.12, pp.2280-2287, 2012.
- PALMIERI, M. J.; LUBER, J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVIDE, L. C. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: a comparative approach. **Mutat. Res.**, v. 763, p. 30-35, 2014.
- PRICHOA, F. C.; LEYSER, G.; OLIVEIRA, J. V.; CANSIAN, R. L. Comparative allelopathic effects of *Cryptocarya moschata* and aqueous extracts on *Lactuca sativa*. **Acta Scientiarum**, v. 35, n. 2, p. 197-202, 2013.
- ROJAS, J. RONCEROS, S.; PALOMINO, R. Efecto antihipertensivo y dosis letal 50 del jugo del fruto y del extracto etanolico de las hojas de *Passiflora edulis* (maracujá), en ratas. **An. Fac. Med.**, v.67, n.3, p. 206-213, 2006.
- SANTOS, F. E. DOS S.; CARVALHO, M. S. S.; GRACIELE LURDES SILVEIRA, G. L.; CORREA, F. F.; CARDOSO, M. DAS G.; ANDRADE-VIEIRA, L. FL.; VILELA, L. R. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait. and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–11, 2018.
- SANTOS, K. N. **Obtenção de biodiesel via catálises homogênea e heterogênea a partir do óleo do maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener).** 2015. 39f. Monografia (Graduação). Engenharia de Energia da Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.
- SCHRIPSEMA, J. Application of NMR in Plant Metabolomics: Techniques, Problems and Prospects. **Phytochemical Analysis**, v. 21 p. 14-21, 2010.
- SERRANO, L.; MONTEIRO-MONTOYA, R. Micronuclei and heterochromatid buds are the results of related genotoxic events. *Environ. Mol. Mutagen*, v. 38, p. 38–45, 2001.

- SETH, C.S.; CHATURVEDI, P.K.; MISRA, V. Toxic effect of arsenate and cadmium alone and in combination on Giant Duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) in response to its accumulation. **Environmental Toxicology**, v. 22, p. 539–549, 2007.
- SILVA, D. C.; FREITAS, A. L.; BARROS, F. C.; LINS, K. O.; ALVES, A. P.; ALENCAR, N. M.; et al. Polysaccharide isolated from *Passiflora edulis*: Characterization and antitumor properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 139-145, 2012.
- SILVEIRA, G. L., LIMA, M. G. F., REIS, G. B., PALMIERI, M. J., & ANDRADE-VIEIRA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, 178, 359–367. 2017.
- SIMMLER, C.; NAPOLITANO, J. G.; MCALPINE, J. B.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F. Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 51–59, 2014.
- SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M M. E.; LEVINE A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**, v. 11, p. 431-443, 1999.
- VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMAN, G.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extract inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. **Fitoterapia**, v.78, p. 112-119, 2007.
- VIEIRA, G. P. **Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de *Passifloras* spp.** 2013.81f. Dissertação (Mestrado em???) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. São Paulo. 2013.
- WANG, C.; XU, F.; SHANG, J.; XIAO, H.; FAN,W.; DONG, F. Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their antidepressant-like effects. **J. Ethnopharmacol**, v.148, p. 812–817, 2013.
- WOHLMUTH, H.; PENMAN, K. G.; PEARSON, T.; LEHMANN, R. P. Pharmacognosy and chemotypes of Passionflower (*Passiflora incarnata* L.). **Biol. Pharm. Bull.**, v. 33, p. 1015–1018, 2010.
- WOODMAN, O.; CHAN, E. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v.31, p. 786-90, 2004.
- WOSCH, L.; IMIG, D. C.; CERVI, A. C.; MOURA, B. B.; BUDEL, J. M.; SANTOS, C. A. M. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: I. A morpho-anatomic profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 328-343, 2015.
- WOSCH, L.; SANTOS, K. C. DOS.; IMIGB, D. C.; SANTOS, C. A. M. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic Profile. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 40–49, 2017.

XAVIER, A. S.; GALVÃO, D. F.; MAGALHÃES, E. P.; GARCIA, T. S. T.; RAMOS, M. P. O. Triagem fitoquímica da folha do maracujá (*Passiflora edulis*). **Revista Unipam**, 2016. Disponível em: [//http. www. revistas.unipam.edu.br/index.php/cenar/article/viewFile/256/179](http://www.revistas.unipam.edu.br/index.php/cenar/article/viewFile/256/179). Acesso: 13 de dezembro de 2017.

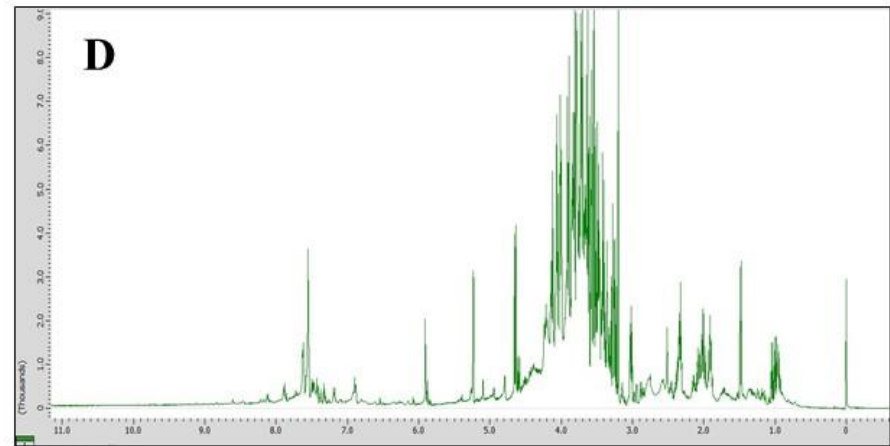
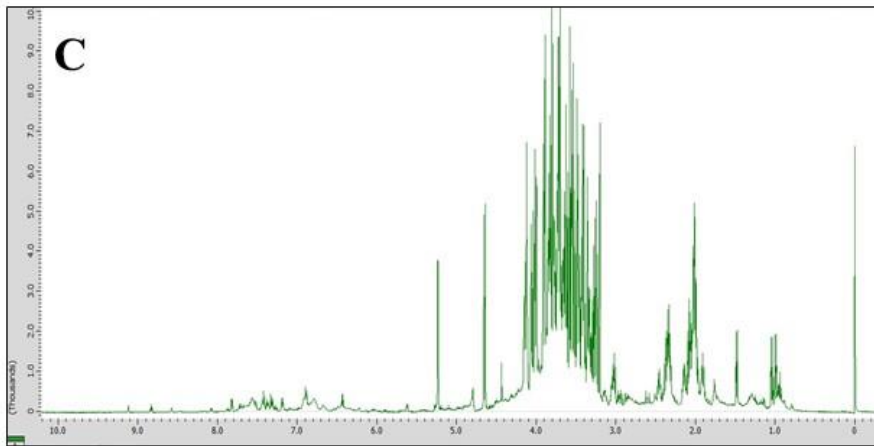
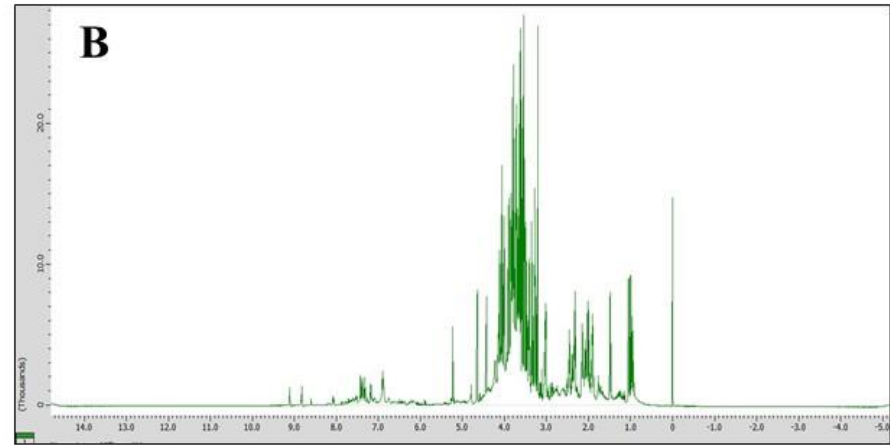
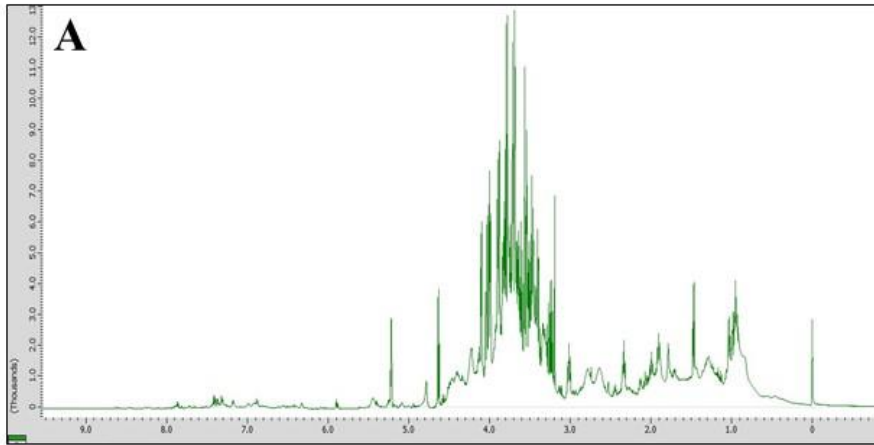
ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**, v. 96, p. 86-91, 2010.

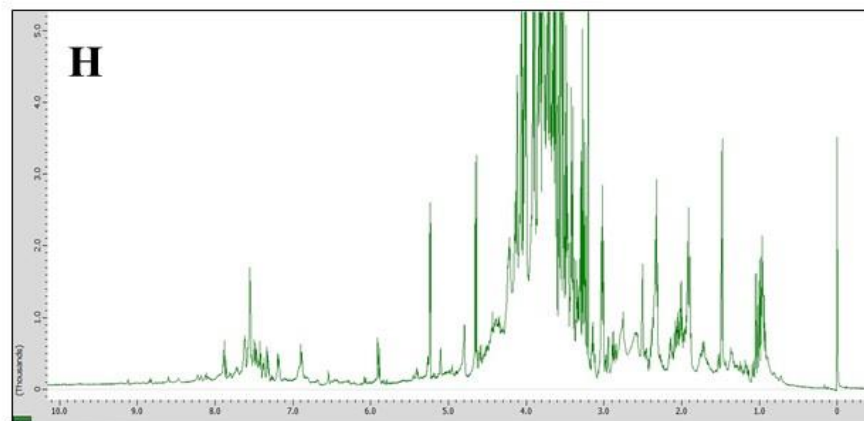
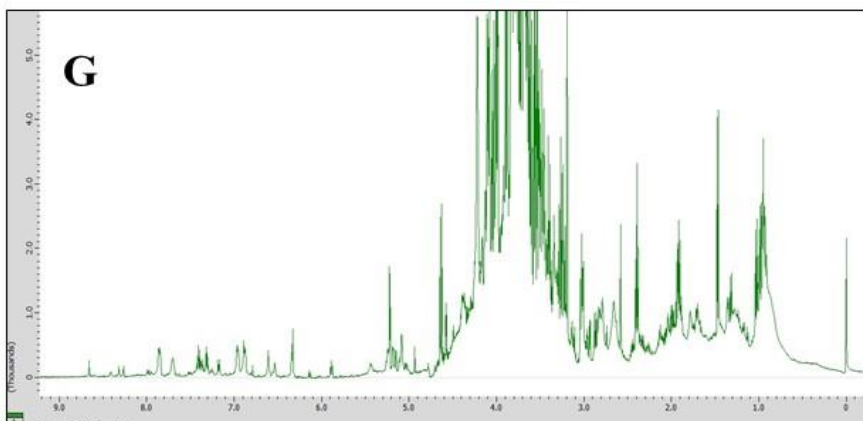
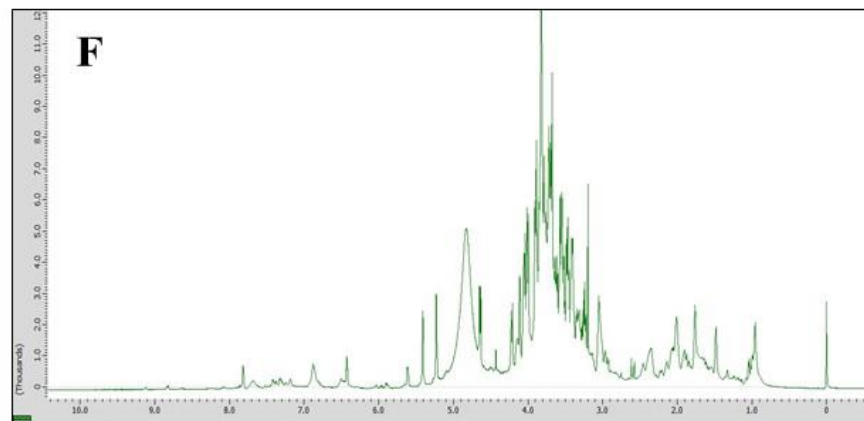
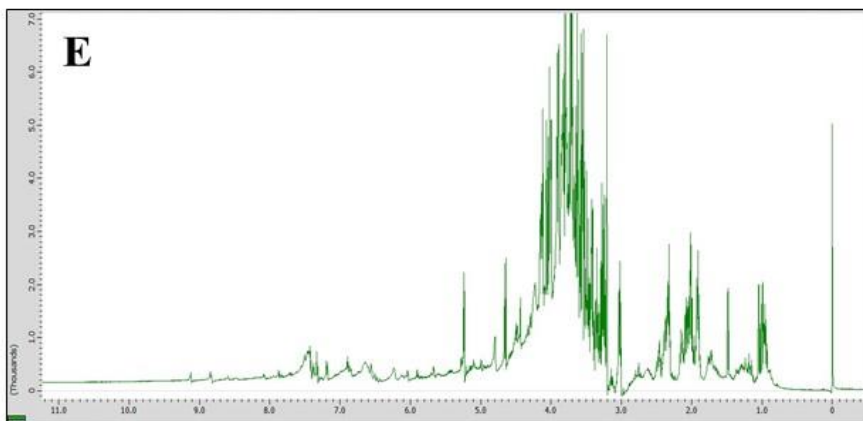
ZUCOLOTTO, S. M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E. P. Analysis of Cglycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochem.Anal.**, v. 23, p. 232–239, 2012.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho permitiu identificar variabilidade existente entre as espécies silvestres e comerciais por meio da análise agronômica. A análise molecular permitiu verificar a existência de locus conservados entre as 26 espécies pela análise de transferibilidade, e também foi possível separar-las de acordo com subgênero. As espécies *Passiflora foetida*, *P. alata*, *P. suberosa*, *P. maliformis*, *P. mucronata*, *P. cincinnata*, *P. quadrangularis*, BRS Rubi do Cerrado (*P. edulis* azedo-roxo x *P. alata* x *P. edulis* azedo-amarelo), BRS Gigante Amarelo (*P. edulis* flavicarpa x *P. edulis* flavicarpa) e BRS Pérola do Cerrado (*P. setacea*) apresentam compostos secundários de interesse fitoterápico como foi verificado nos perfis dos extratos cloroformico e aquoso obtido pela técnica de RMN. As infusões aquosas das espécies demonstraram efeitos fitotóxicos, genotóxicos e citotóxicos, assim é importante ter um maior atenção na hora de consumir as folhas das espécies como fitoterápico.

ANEXO I





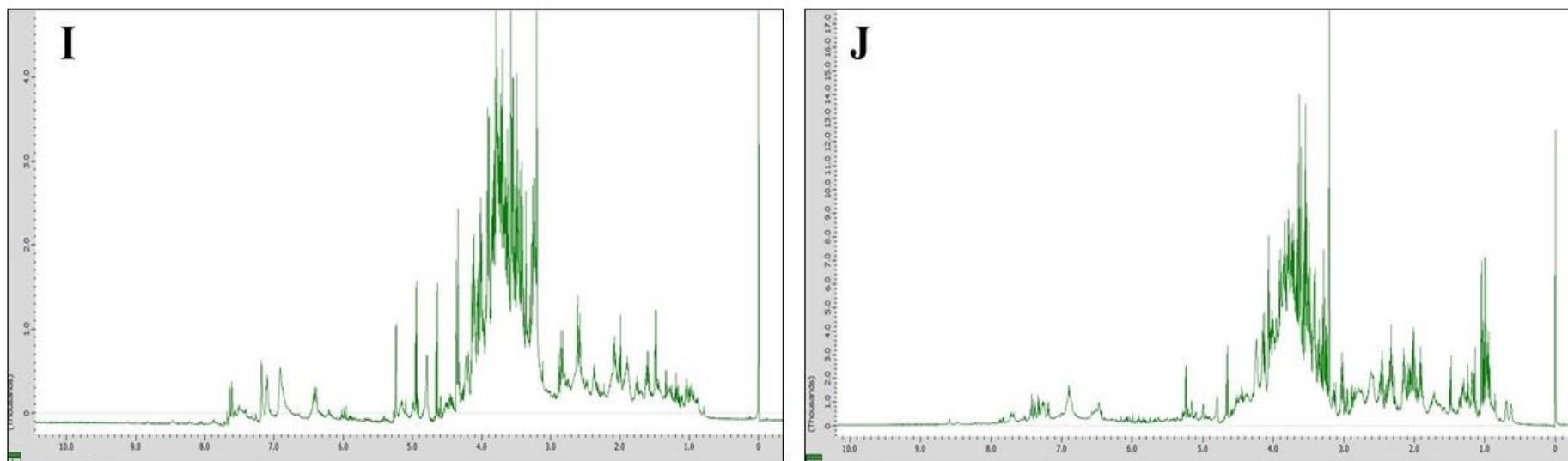
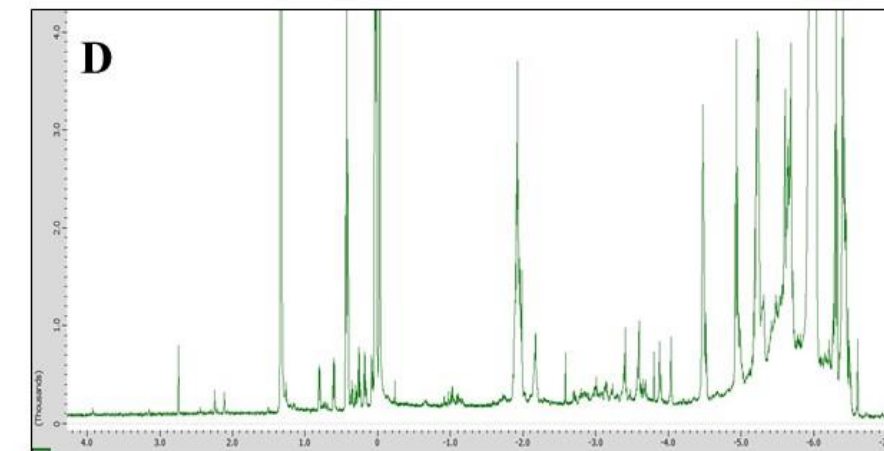
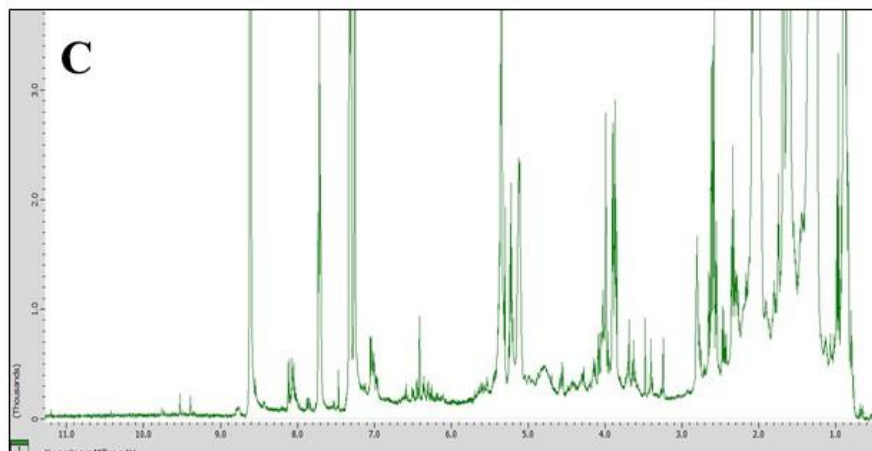
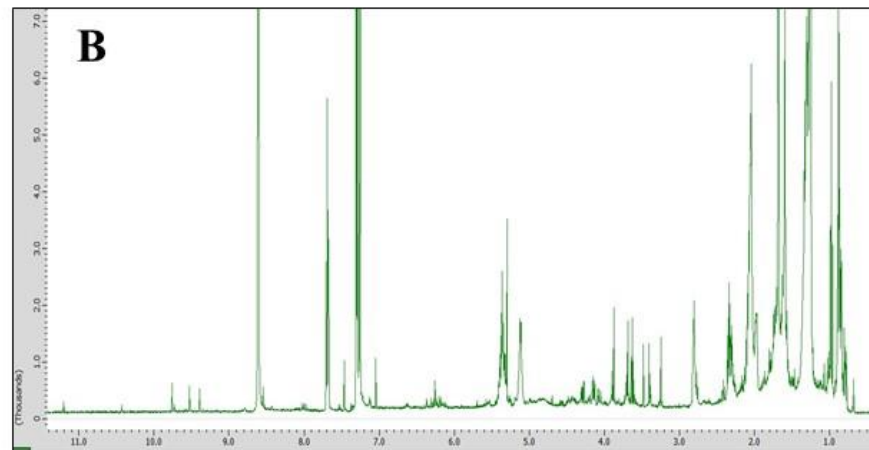
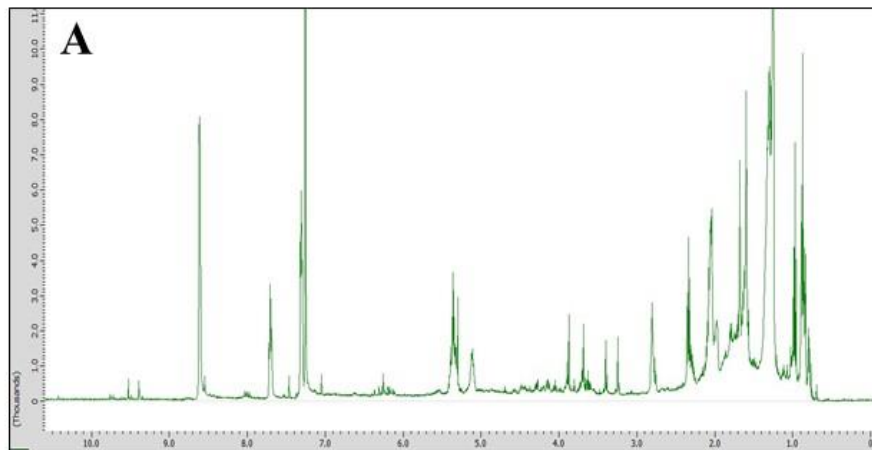
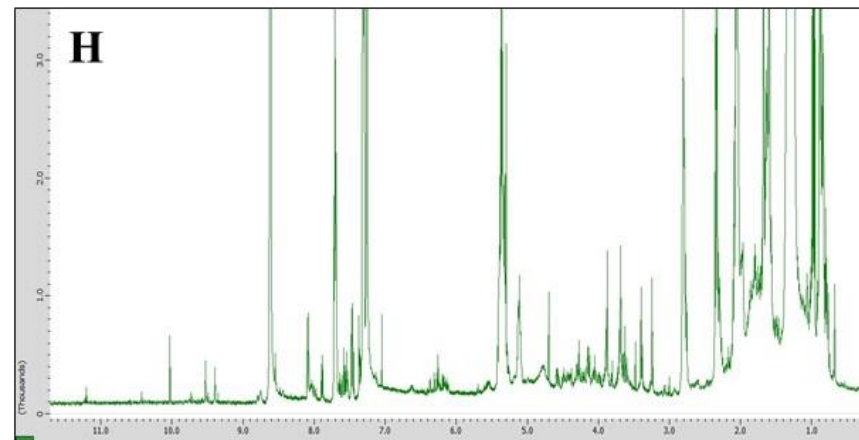
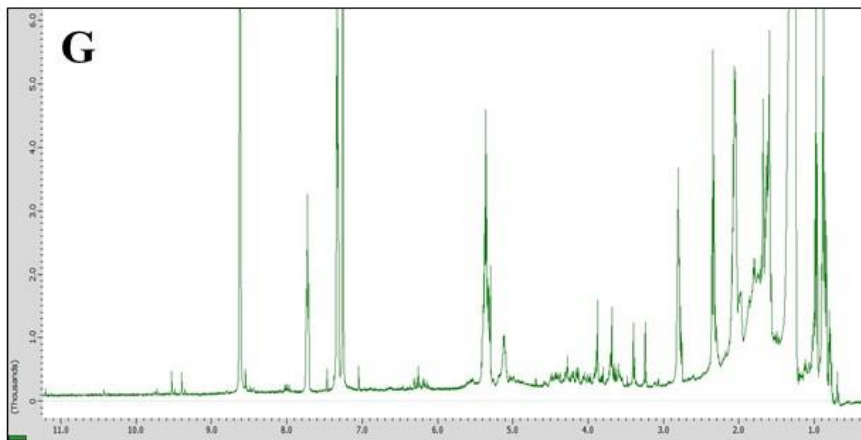
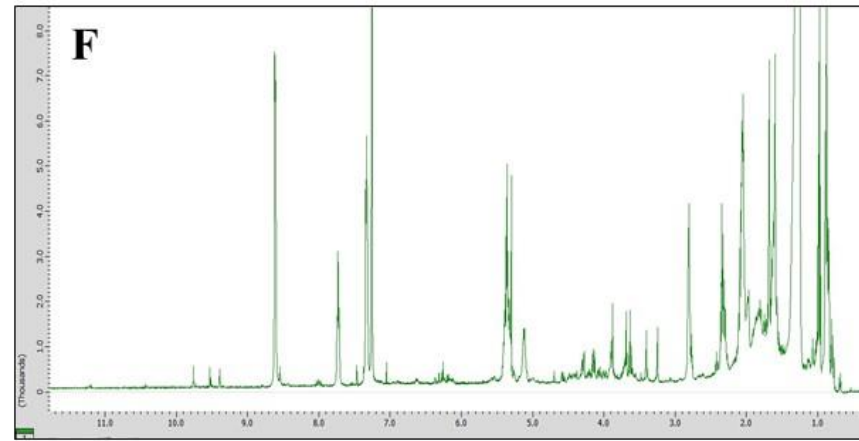
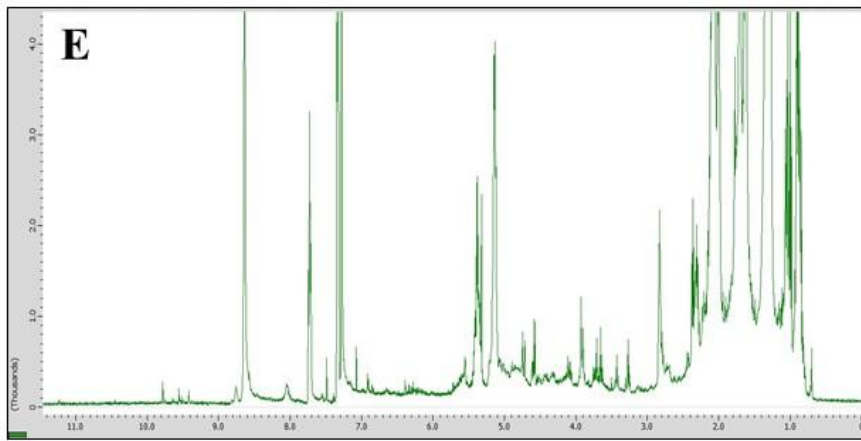


Figura 1. Espectros dos extratos aquosos das dez espécies de Passiflora. A: *P. alata*; B: *P. cincinnata*; C: *P. foetida*; D: BRS Gigante Amarelo; E: *P. maliformis*; F: *P. setacea*; G: *P. quadrangularis*; H: BRS Rubi do Cerrado; I: *P. suberosa*; J: *P. mucronata*.

ANEXO II





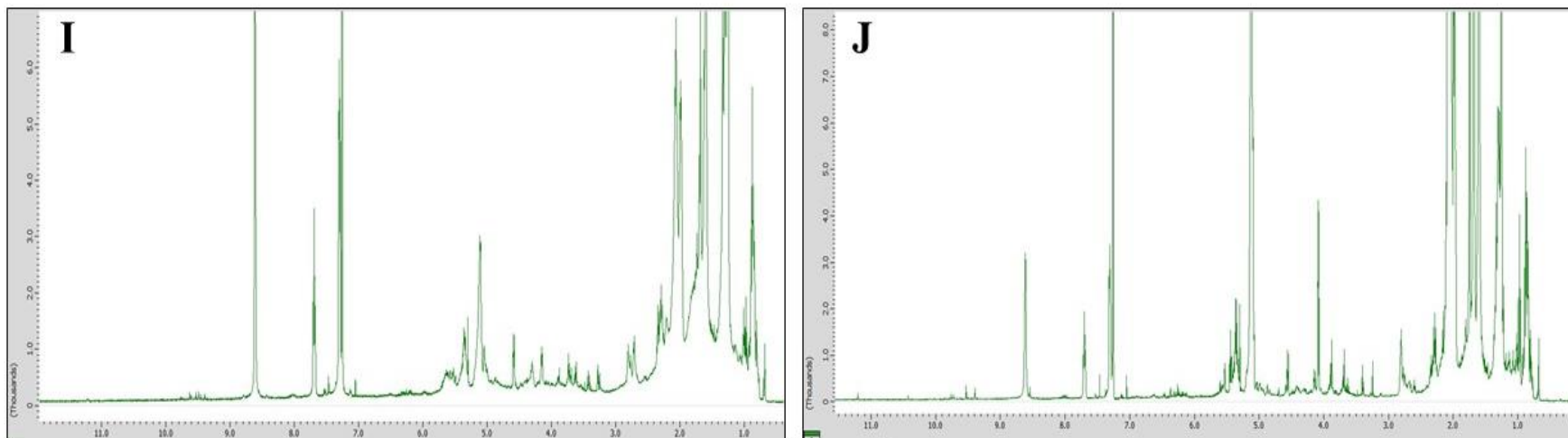


Figura 2. Espectros dos extratos aquosos das dez espécies de Passiflora. A: *P. alata*; B: *P. cincinnata*; C: *P. foetida*; D: BRS Gigante Amarelo; E: *P. maliformis*; F: *P. setacea*; G: *P. quadrangularis*; H: BRS Rubi do Cerrado; I: *P. suberosa*; J: *P. mucronata*.

APÊNDICE I

Tabela 1. Alterações microscópicas observadas em células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* tratadas com extratos aquosos de folhas das espécies do gênero *Passiflora*, com quatro concentrações cada, e controles negativo (Co⁻: água destilada) e positivo (Co⁺: picloran). Espécies: *P. setacea*; *P. alata*; *P. foetida*; BRS GA (Gigante Amarelo); *P. mucronata*; *P. quadrangularis*; *P. suberosa*; *P. cincinnata*; *P. maliformis*; BRS RC (Rubi do Cerrado).

Tratamento	Concentração	IM	AC	AN
Água	-	11.47 b	0.4 b	0.44 b
Picloran		3.878 a	0.76 a	8.018 a
BRS Pérola do Cerrado (<i>P. setacea</i>)	C ₁	13.08 b	5.12	11.22
	C ₂	10.1 b	3.84	13.36
	C ₃	4.82 a	1.28 ab	11.58
<i>P. alata</i>	C ₁	7.8	2.34	10
	C ₂	6.9	2.56	10.96
	C ₃	4.58 a	1.02 ab	9.32 a
<i>P. foetida</i>	C ₁	13.98	4.14	3.64
	C ₂	11.6 b	4.64	7.4 a
	C ₃	5.44 a	2.18	8.96 a
BRS Gigante Amarelo (<i>P. edulis</i> flavicarpa x <i>P. edulis</i> flavicarpa)	C ₁	14.42	4.64	8.86 a
	C ₂	11.56 b	3.8	10.52
	C ₃	2.48 a	0.46 ab	10.88
<i>P. mucronata</i>	C ₁	11.34 b	5.14	7.54 a
	C ₂	11.1 b	4.58	7.9 a
	C ₃	6.362	2.84	18.008
<i>P. quadrangularis</i>	C ₁	9.322	2.62	10.302
	C ₂	8.16	2.58	10.96
	C ₃	1.1	0.1 ab	15.6
<i>P. suberosa</i>	C ₁	10.48 b	3.46	2.48
	C ₂	5.594	1 ab	8.212 a
<i>P. cincinnata</i>	C ₁	10.5 b	4.2	3.76
	C ₂	9.84 b	3.92	3.72
	C ₃	8.36	3.94	8.72 a
<i>P. maliformis</i>	C ₁	11.74 b	4.66	7.4 a
	C ₂	11.68 b	4.14	8.54 a
	C ₃	7.24	1.22 ab	17.98

BRS Rubi do Cerrado	C ₁	7.62	2.44	3
(<i>P. edulis</i> azedo-roxo x <i>P. alata</i> x	C ₂	7.28	2.06 a	2.2
<i>P. edulis</i> azedo-amarelo)	C ₃	5.48 a	0.88 ab	8.94 a

IM: índice mitótico; AC: alterações cromossômicas; AN: alterações nucleares.

APÊNDICE II

Tabela 1. Alterações cromossômicas e nucleares observadas em células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* tratadas com extratos aquosos de folhas de espécies do gênero *Passiflora*, com quatro concentrações cada, e controles negativo (Co⁻: água destilada) e positivo (Co⁺: picloran). Espécies: *P. setacea*; *P. alata*; *P. foetida*; BRS GA (Gigante Amarelo); *P. mucronata*; *P. quadrangularis*; *P. suberosa*; *P. cincinnata*; *P. maliformis*; BRS RC (Rubi do Cerrado).

Tratamento	Concentração	CA	C-met	Cpeg	CP	MNC	NC
Água		0.0 b	0.88 b	0.33 b	1.218 b	1.08 a	14.52
Picloran		0.972 a	3.906 a	5.084 a	3.956 a	0.08 b	0.36 b
BRS Pérola do Cerrado (<i>P. setacea</i>)	C ₁	8.742	9.802 a	14.34	3.778 ab	0.44 ab	8.52 a
	C ₂	10.106	10.27 a	11.726 a	3.13 ab	0.24 ab	8.48 a
	C ₃	5.078 ab	8.32 ab	8.622 ab	2.008 ab	0.32 ab	7.08 a
<i>P. alata</i>	C ₁	4.508 ab	9.052 a	11.516 a	2.308 ab	0.62 ab	1.58 b
	C ₂	4.694 ab	11.4 a	8.916 a	5.314 a	0.28 ab	7.62 a
	C ₃	2.008 ab	4.388 ab	8.178 ab	1.788 ab	1.06 a	8.26 a
<i>P. foetida</i>	C ₁	8.722	5.14 ab	11.044 a	2.438 ab	0.46 ab	10.5
	C ₂	14.696	3.884 ab	15.928	3.416 ab	0.46 ab	2.02
	C ₃	12.574	6.738 ab	12.98 a	1.818 ab	0.36 ab	3.28
BRS Gigante Amarelo (<i>P. edulis</i> flavicarpa x <i>P. edulis</i> flavicarpa)	C ₁	10.358	4.55 ab	12.024 a	3.382 ab	0.36 ab	17.648
	C ₂	9.532	5.032 ab	12.212 a	3.704 ab	0.62 ab	12.74
	C ₃	4.594 ab	2.222 ab	8.608 ab	0.74 ab	0.18 ab	11.04
<i>P. mucronata</i>	C ₁	11.702	9.312 a	16.086	5.614 a	0.98 a	7.96 a
	C ₂	10.378	6.374 ab	16.322	4.274 ab	0.6 ab	9.702
	C ₃	15.494	10.766 a	9.804 a	3.94 ab	0.32 ab	8.22 a
<i>P. quadrangularis</i>	C ₁	4.116 ab	6.742 ab	9.698 a	2.464 ab	0.82 a	10.76
	C ₂	3.412 ab	11.874	11.178 a	1.878 ab	0.54 ab	10.42
	C ₃	0.0 ab	0.0 ab	4.046 ab	0.0 ab	0.68 ab	9.84

<i>P. suberosa</i>	C ₁	8.992	5.204 ab	9.556 a	4.23 ab	0.7 ab	10.18
	C ₂	3.41 ab	3.274 ab	8.92 a	0.742 ab	0.48 ab	2.52
<i>P. cincinnata</i>	C ₁	10.588	8.326 ab	13.682	4.746 ab	0.42 ab	17.56
	C ₂	11.514	7.582 ab	14.35	2.644 ab	0.26 ab	3.5
	C ₃	9.55	13.454	15.286	5.9 a	0.3 ab	8.56 a
<i>P. maliformis</i>	C ₁	14.146	5.122 ab	13.476 a	3.412 ab	1.218	6.992 a
	C ₂	13.698	5.268 ab	9.114 a	2.94 ab	0.26 ab	3.46
	C ₃	5 ab	2.188 ab	6.924 ab	1.316 ab	0.26 ab	7.14 a
BRS Rubi do Cerrado (<i>P. edulis</i> azedo-roxo x <i>P.</i> <i>alata</i> x <i>P. edulis</i> azedo- amarelo)	C ₁	4.094 ab	5.692 ab	10.812 a	4.396 ab	1.06 a	8.26 a
	C ₂	3.758 ab	8.472 ab	9.426 a	3.134 ab	0.68 ab	9.32
	C ₃	3.454 ab	5.074 ab	5.034 ab	0.87 ab	0.08 ab	7.46 a

CA: cromossomo com atraso; C- met: C-metáfase; Cpeg: cromossomo pegajoso; CP: cromossomo perdido; NC: núcleo condensado; MNC: micronúcleo.

APÊNDICE III

Tabela 1. Código do loco, sequências e motivos dos 50 pares de *primers* microsatélites desenvolvidos para *Passiflora edulis* e 21 para *Passiflora alata* utilizados na estimativa da diversidade genética. Os *primers* que estão em **negrito** corresponde aos 44 utilizados na transferibilidade.

	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	Motivo
mPe-UNICAMP01	CCTGTCGGAAAGACTTCTGC	GGATCGTTGTGGAGTGTGGT	(AC)4
mPe-UNICAMP02	TCGAGTGAGATTGGCAGTG	TTGGCTTCGAGGAGAAGAA	(GT)8
mPe-UNICAMP03	ATAGGCATTTACAACAGCAC	AAGCATCCGTGAGACAGGT	(AC)8
mPe-UNICAMP04	GCTAACAAGCCCAAATCAAC	CAGACCATGAGACGGCAGTA	(CA)5
mPe-UNICAMP05	CGGGGTTATGCAAGGTAACA	ACTGGGTGGACTAGGAAACG	(TG)8
mPe-UNICAMP07	GGAACCGTGTGATGGGATAC	ACCGATTGACAGCTCTGCC	(AG)8
mPe-UNICAMP08	GCTGAGAACCCCGTGACTTA	CGAGTATGGCACATCCCTG	(CA)4
mPe-UNICAMP09	TGCCTCTCGGATATTTACAGC	CGCATGTCCCCATACGAC	(AC)5
mPe-UNICAMP10	GTCACTGCAGCCTGGTATAGTT	GAACATATTCGGCAGATGGA	(CT)5
mPe-UNICAMP11	GCAGCAATCAATGCAATCAG	GCCATTCTCCTCTCACCGTA	(CA)9(AT)5
mPe-UNICAMP12	CACACAAGGCGTTTCTTACG	TGATATGAACGATACGGTAGGC	(CA)7
mPe-UNICAMP13	TTCGTGCATTGTTTATTACC	GCCTTCTTTGTCATGTTGGA	(TC)5
mPe-UNICAMP14	GACTTCGTATGACGCCAGGT	TGCAAGAATCCGAAGACTCA	(CA)8
mPe-UNICAMP15	CATTCCTCACCTCACGAA	TGGTTGTGTGGTTTGTGCTT	(AC)5
mPe-UNICAMP16	CGTGGGTGAGTGTGAATGAG	TGATGTGAGCATGGTTGGTT	(AT)4(TG)11
mPe-UNICAMP17	GCCACGTGCAATGTCAGT	CGTGCTGTGACCAAGGAG	(AC)9
PE02	GGGACGACAATCAAGTGAGG	CCCAAATATGCAACACCAA	(TG)7
PE03	GCAGCGAGGGAAGAAAA	TGAGACATCGTGCGTGAA	(GA)10
PE04	ATGCTTTTGGAAATCCGTTT	TGCTCATGCAAAGTCACTGG	(TG)9
PE07	TGCGCATTGATGGTGCTTG	TCGTCTCTTCTCCTCCTTCA	(GA)23
PE08	CCGGATACCCACGCATTA	TCTAATGAGCGGAGGAAAGC	(GTTGTG)4
PE09	GGAAATCCGAAAATGGTTG	GGGCCTTTATCCATGTTTGA	(AT)5(AC)5
PE10	AACCTTGATCTCCAGCCTAT	GGGCCTTTATCCATGTTTGA	(GA)34

PE11	GCATAAGTTGTCGGTCTTGG	CCTCGAACCTCTATCATCCA	(GT)11
PE13	AAGCACCCCAATCGTTGA	CCCCCTGCCACCTGAGTA	(GT)6
PE14	TGGTGTTGCTGAATTCATTT	TACGCGCCTAGCGTATTCTT	(GA)21
PE15	ACCGTTAAATCCAAGCAAGT	AAATGCAAAAGAATGATATGTTA	(CTTTAGC)5
PE18	CCGTGAACCAACCATTTCTC	TTGCAGCACAAACAAGTCAA	(TG)9
PE19	TTAACAGGACTTAGCACTTGA	CTCATCCTTCTTCCATCTTTG	(CA)14
PE20	AGGATCACCATAGAAAACCAT	GTTAGGTTGCATTGCTTT	(AAAC)4
PE23	CAATCCCTTGACCCATAGA	CGTCCATCCTTCTCCTTT	(GA)19
PE24	TCAAACCTGAACTCGTAAAGG	GTGCTGGGAGACTGATGTT	(CA)15
PE27	TTGCTCATTGCACTCATCCT	GCAGACATTTCCCTGGAGCA	(GT)7
PE28	GCCACTAACGTTAACTGTGCT	CAAGCTCTTATTAGGCATCCA	(CT)16
PE29	CGGATGAAGGCTCGTCTTT	CGGCACACTCACCTCTCC	(AG)13
PE35	ATTATGCCTAAAAACCCAAA	TGATCCAGAGGTTGAGAGG	(CA)9
PE37	CAAAAGGATAGGCCTGATGTC	TGTTGGTCATCCACTGAAG	(TG)8
PE38	GTACGGTCCTCGGTTAGAC	AGTCACACAGCATGAGAAATC	(TG)8
PE41	ATCGGGGTTTCGCTTATTTG	CGTTCATCCTTTAGTGGGCTA	(TTAA)5
PE42	GTCACCTCATTCTTCTTTCC	TTAGCCCCTCAAACACAA	(GT)8
PE54	TGGTGTGTGTGTGGGTGATTAG	CATTCTCCTGCCACCTGAGT	(TG)7
PE58	GCAATTTACCATCTTCTGCT	CCACGGTCATGGATGTTC	(AC)11
PE59	GAACACTTCGCATGGCTAGA	TTCCGAATCAAACCGTAACT	(ATCTA)3
PE60	TCCTCACCTTTGTTTATGCT	AATGACCTATTTGAACCTGGA	(TG)12
PE64	ATCAATTACGCACCCCAAAC	GGAACGTCAATCAAGTGAGGA	(AC)8
PE66	CCTAGTCCCAACAAGCATC	GCTGTGGACCCTAACTCAGTC	(AC)9
PE74	CCCTCTTATCAATAGCGTTGG	GCACGAGCACGAGTATTTATT	(ATCACA)5
PE75	CACAATCGGTGGGAAAGATA	GTAGTTTTTGGGCAGTTTGC	(TG)17
PE88	CTTCAGGGTCACACACATT	GTTTCATCCTTTAGTGGGCT	(TTAA)6
PE90	TCAGGAAGATTGCATGTTAGT	CTGGGTTTTGTTTATGTTGC	(AGC)5
PA01	CGTGGACTACAAACCAAAG	CGACACAAATGCACAAATG	(AGA)11
PA02	ATGCAAGAACATCACCACC	TTTCTCCTGGCTTTGAC	(GTGA)3(AGA)5
PA03	GGTAGGAAGCCCTCAACG	GCTTAGGTTCTCATCTG	(AAG)6

PA04	CAAGGAACAAAGCTCTCTAGG	GCCAGATGGGGTATGTAAAC	(CT)8
PA05	CATTCCAAC TCATGCAATC	CACCAGT CACCTCTTCACC	(TG)6
PA07	CTTCACCT CAGCCACACAC	AAACCCT ACATGCAAGAACC	(AAG)3(N)6(AAG)4
PA08	CAAACAC ACTCTCAAAACCAAG	TGGGGAA ACAGGTATGCAC	(AC)5
PA09	CATCGGAGGTATTTGCACAG	ACTGCATCGCAACAATCACT	(TG)6
PA10	CCCAAT CAAAGAATAAAAGCTC	GAACAG CCGCCTTGTA AAC	(CT)8
PA11	GCCTATTTGGCTCATGTGG	CCTACACACCCATGCAAAAC	(AGA)12
PA12	GCGACTTGAAAATCAAATACG	ATGTGATGCACTTGGAGTGTG	(AC)6
PA13	TATGCTTGATTGTGTGCAGTG	TTAGGAATAGTAGGGACATGC	(GT)2AT(GT)3
PA14	CAATCCG TTGGGATGTAG	CTACTT GTCATTCGGCAC	AG)8(A)9TC(A)5CG(A)12
PA15	CAAACGAAGGGAAAAGTG	GGCATTGAGGGTGTTTTG	(GT)7
PA17	CCCAAGATTACACGAGTC	ACATAAGACGCTGTCACC	(TG)6
PA18	ATGTGTCCATGCCACTCG	AGACTGGTGGATCGTATCAG	(GT)6
PA19	CATGACCAAGCACTCCTG	GCTCTGTCCAGTTCCTCC	(AAG)3
PA20	CATGA ACCACCACCAATTC	ATCGG TTTTCCCCTACAC	(CTT)17
PA21	TCTTTTCCCTAGCCAGCTC	ACCATCAAAACCCACA ACTC	(GAA)17
PA22	GACCAAGAGAACCAAAAGC	AAGAGAGGAGAAGAGAGCTG	(TTC)5(TTC)4
PA23	GGA ACTGAGAGCCATTAGG	TTGGAGGAGCGGATTATAG	(CA)6