

FENOTIPAGEM DIGITAL, GERMINAÇÃO DE SEMENTES E
MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Passiflora* spp.

RENAN CARRARI DOS SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO - 2019

FENOTIPAGEM DIGITAL, GERMINAÇÃO DE SEMENTES E
MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Passiflora* spp.

RENAN CARRARI DOS SANTOS

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

Orientadora: Prof^a Virginia Silva Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO - 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

S237 Santos, Renan Carrari dos.

Fenotipagem digital, germinação de sementes e morfogênese in vitro de *Passiflora* spp. / Renan Carrari dos Santos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

128 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019.
Orientadora: Virginia Silva Carvalho.

1. *Passiflora mucronata*. 2. *Passiflora edulis*. 3. *Passiflora setacea*. 4. Groundeye® System. 5. Cultura de endosperma. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

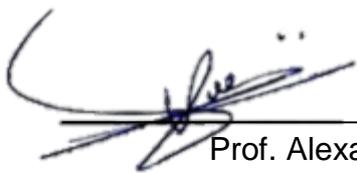
FENOTIPAGEM DIGITAL, GERMINAÇÃO DE SEMENTES E
MORFOGÊNESE *IN VITRO* DE *Passiflora* spp.

RENAN CARRARI DOS SANTOS

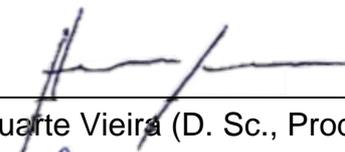
Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 01 de março de 2019

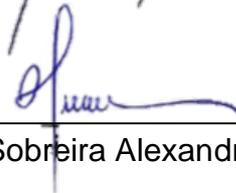
Comissão Examinadora:



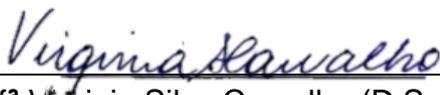
Prof. Alexandre Pio Viana (D. Sc., Produção Vegetal) – UENF



Prof. Henrique Duarte Vieira (D. Sc., Produção Vegetal) - UENF



Prof. Rodrigo Sobreira Alexandre (D.Sc., Fitotecnia) - UFES



Profª Virginia Silva Carvalho (D.Sc., Fitotecnia) - UENF
(Orientadora)

Dedico

A DEUS,

Por sempre guiar meus passos, permitindo que eu chegasse até aqui.

AOS MEUS PAIS,

Domingos Risse e Sandra Carrari que dignamente me apresentaram a importância da família e o caminho da persistência e da honestidade.

AS MINHAS IRMÃS,

Roberta e Sabrina, pela amizade, muito amor e cumplicidade.

AOS MEUS SOBRINHOS,

Arthur, Jhúlia e Lara, por todos os sorrisos e momentos de alegria.

A TODOS OS VERDADEIROS AMIGOS,

Que apesar da distância ou falta de contato contínuo, sempre seremos amigos,
independente de tempo ou distância.

“Ensina-me o bom senso e o conhecimento, pois confio em teus mandamentos.” Salmo 119:66

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre guiar meus passos, permitindo que mesmo nas adversidades mais uma etapa em minha vida se cumprisse, fazendo da capacidade que me foi concedida um instrumento para crescer, aprender e ensinar;

Ao meu pai Domingos e à minha mãe Sandra, por todo incentivo e apoio, pelo exemplo de homem e mulher a ser sempre seguido. Por nunca terem me deixado desistir de estudar e me aperfeiçoar profissionalmente. Eu os amo muito!

Às minhas irmãs Roberta e Sabrina por todo amor e carinho, por sempre se preocuparem comigo, estando ao meu lado em todos os momentos;

Aos meus sobrinhos, Arthur, Lara e Jhúlia pelos momentos de alegria e distração;

À minha vózinha Luzia e ao meu tio Ronaldo, que mesmo com limitações, me ensinam por meio de gestos a sempre valorizar a família;

A minha família, tios, primos e cunhados, que acreditaram e torceram por mim;

Aos amigos de Muqui, pelas orações, além da enorme força, ajuda e incentivo nos momentos mais difíceis;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e ao Laboratório de Fitotecnia, pela oportunidade em fazer o mestrado;

Agradeço a CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento da pesquisa;

Um agradecimento mais que especial, à minha orientadora Virginia por todo o conhecimento compartilhado, todos os conselhos e incentivos. Por toda a orientação durante o projeto e, sobretudo pela amizade. Serei eternamente grato!

Aos professores que contribuíram para a execução desse trabalho: meu coorientador Rodrigo Sobreira Alexandre pelo apoio técnico, colaboração e doação das sementes de *Passiflora mucronata*. Ao professor Henrique Duarte Vieira pela disponibilidade e colaboração ao ceder o equipamento para a análise morfológica das sementes. Ao professor Alexandre Pio Viana por todas as sugestões que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas e ex-colegas de laboratório: Andressa, Clarissa, Daniel, Gabriel, Joel, Kezia, Lidiane, Mariana, Otalício, Pedro, Rafael, Renato, Roberta, Roberto e Vinícius agradeço pela companhia diária, trocas de experiências, ajuda durante a execução deste trabalho, sem contar os momentos de descontração;

Ao meu grande amigo Rafael Walter, pela amizade e companheirismo, por toda a ajuda durante estes dois anos, desde o esboço do projeto até a execução;

A Kézia, Kelly, William, Patrícia, Amanda, Otalício, Daniel e Laís pela amizade sincera, paciência e ajuda em todos os momentos. Serei eternamente grato a vocês, o meu eterno amor e gratidão!

Aos amigos que me proporcionaram momentos maravilhosos: Rosana, Thaís Moraes, Luize, José Inácio, Vanessa, Renata, José Olívio, Diego e Danilo;

À minha família república Albert Eistein: Anderson, Ana Flávia, Helvis, Marcus, Pedro e Igor pelo ótimo convívio, inestimável amizade, apoio, paciência e incentivo nos momentos difíceis;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Gênero <i>Passiflora</i> : Origem, aspectos botânicos e propagação	4
2.2. Sistema de análise de sementes (SAS) para a quantificação da diversidade genética em <i>Passiflora</i> spp.....	5
2.3. Importância econômica da cultura do maracujazeiro	7
2.4. <i>Passiflora mucronata</i> Lam.	8
2.5. Cultura de tecido vegetal ligada à cultura do maracujazeiro	10
2.6. Cultivo <i>in vitro</i> de embriões cotiledonares.....	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivo Geral.....	14
3.2. Objetivos Específicos.....	14
4. TRABALHOS.....	16
4.1. FENOTIPAGEM DIGITAL NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE SEMENTES DE <i>Passiflora</i> spp.....	16
RESUMO.....	16
4.1.1. INTRODUÇÃO.....	18
4.1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1.2.1. Caracterização do local e delineamento estatístico.....	20
4.1.2.2. Material Vegetal	21
4.1.2.3. Captura e análise de imagens de sementes de <i>Passiflora</i> spp.	21

4.1.2.4. Análise multivariada.....	27
4.1.2.5. Análise estatística.....	27
4.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1.3.1. Análise de variância.....	28
4.1.3.2. Contribuição dos caracteres para a diversidade genética por distância generalizada de Mahalanobis.....	28
4.1.3.3. Diversidade genética.....	33
4.1.4. CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
4.2. GERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>EX VITRO</i> DE SEMENTES RECÉM-COLHIDAS E ARMAZENADAS DE DEZ POPULAÇÕES DE <i>Passiflora mucronata</i>.....	42
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43
4.2.1. INTRODUÇÃO.....	44
4.2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.2.2.1. Caracterização do local.....	45
4.2.2.2. Material vegetal.....	45
4.2.2.2.1. Germinação <i>ex vitro</i> de sementes de <i>P. mucronata</i>	46
4.2.2.2.2. Estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>P. mucronata</i>	47
4.2.2.2.2.1. Desinfestação das sementes de <i>P. mucronata</i>	47
4.2.2.2.2.2. Germinação <i>in vitro</i> de <i>P. mucronata</i>	47
4.2.3.3. Aclimatização.....	48
4.2.3.4. Germinação <i>ex vitro</i> e <i>in vitro</i> de sementes armazenadas de <i>P. mucronata</i> ...	49
4.2.3.5. Análise estatística.....	49
4.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.2.4.1. Germinação <i>ex vitro</i> de sementes de <i>Passiflora mucronata</i> recém-colhidas...	49
4.2.4.2. Germinação <i>in vitro</i> de sementes recém-colhidas de <i>P. mucronata</i>	53
4.2.4.3. Germinação <i>ex vitro</i> e <i>in vitro</i> de sementes armazenadas de <i>P. mucronata</i> ...	58
4.2.4.4. Aclimatização.....	61
4.2.5. CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
4.3 MORFOGÊNESE <i>IN VITRO</i> EM <i>Passiflora</i> spp. A PARTIR DE DIFERENTES EXPLANTES E CONCENTRAÇÕES DE CITOCININAS.....	65
RESUMO.....	65
ABSTRACT.....	66
4.3.1. INTRODUÇÃO.....	67
4.3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	69

4.3.3.1. Caracterização do local.....	69
4.3.3.2. Experimento I.....	69
4.3.3.2.1. Material Vegetal.....	69
4.3.3.3. Experimento II: Morfogênese <i>in vitro</i> de <i>P. mucronata</i>	71
4.3.3.3.1. Material Vegetal.....	71
4.3.3.4. Análise estatística.....	73
4.3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4.3.4.1. Experimento I: Cultura de endosperma maduro para a regeneração de calos de <i>P. setacea</i> , <i>P. edulis</i> , <i>P. mucronata</i> e do híbrido <i>P. setacea</i> x <i>P. edulis</i>	74
4.3.4.2. Experimento II: Uso de diferentes explantes (segmento nodal, segmento intermodal e disco foliar) para a regeneração <i>in vitro</i> de <i>Passiflora mucronata</i>	80
4.3.5. CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
RESUMO E CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
APÊNDICE.....	103

RESUMO

SANTOS; Renan Carrari; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2019. Fenotipagem digital, germinação de sementes e morfogênese *in vitro* de *Passiflora* spp. Orientadora: Prof^a Virginia Silva Carvalho. Coorientador: Prof^o Rodrigo Sobreira Alexandre.

Algumas espécies silvestres de *Passiflora*, como a *P. mucronata*, apresentam resistência à morte prematura e a certas doenças causadas por patógenos de solo. Esta espécie é citada como fonte de resistência a *Fusarium solani*, à bacteriose nas folhas e à antracnose nos frutos e ramos, representando uma importante alternativa para uso potencial como porta-enxerto e, ou em cruzamentos com *Passiflora edulis* ou outras espécies de interesse econômico. Entretanto, a falta de informação científica quanto a diversidade, compatibilidade genética, fenologia, formas de propagação e de cultivo, potencial medicinal, ataque de pragas e doenças, biologia reprodutiva, armazenamento e germinação de sementes, torna mais difícil a utilização de *P. mucronata* em programas de melhoramento genético vegetal. Com isso, objetivou-se com este trabalho quantificar a diversidade genética em *Passiflora* spp. por meio da fenotipagem digital, avaliar a germinação *in vitro* e *ex vitro* de dez populações de *P. mucronata* e determinar o tipo de explante (endosperma, epicótilo, segmento nodal ou folha) que apresenta a maior capacidade de regeneração de plantas *in vitro*. Para a quantificação da diversidade genética de sementes em *Passiflora* spp., foram utilizadas sementes de *P. edulis*, *P. setacea* e *P. mucronata*. O equipamento

Groundeye® System Mini foi utilizado para capturar e analisar as sementes. O Groundeye® System Mini gerou uma planilha com valores médios de cada tratamento para as variáveis, cor, geometria, textura e histograma. O software gerou informações que resultaram em gráficos e planilhas, que facilitaram a interpretação das imagens das sementes. O uso dos descritores de sementes obtidos por meio de análise digital utilizando o Groundeye® System Mini foi eficiente para a quantificação da divergência genética em sementes de *Passiflora*. Os experimentos de germinação *in vitro* e *ex vitro*, foram conduzidos com sementes de dez populações de *P. mucronata* recém-colhidas, a fim de verificar sua qualidade fisiológica, de acordo com as Regras para Análise de Sementes. Os resultados demonstraram uma grande variação na germinação *ex vitro* e *in vitro* nas dez populações de *P. mucronata*. Foi possível concluir que para a obtenção de uma alta taxa de germinação e de plântulas normais é necessário o cultivo *in vitro* de embriões isolados. O material utilizado para o experimento de regeneração *in vitro* foi: endosperma, segmento nodal, folha e epicótilo. Para o experimento com endosperma foram utilizadas diferentes concentrações de TDZ (0,00; 2,27; 4,54; 6,81 e 9,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$). A avaliação foi realizada após 45 dias. Avaliaram-se a porcentagem de calos, o diâmetro, a textura, a coloração e a formação da parte aérea. Para a retirada dos endospermas, utilizaram-se sementes do híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*, *P. setacea*, *P. edulis* e *P. mucronata*. Para os demais explantes (epicótilo, segmento nodal e folha) foram testadas cinco concentrações de BA e de TDZ (2,04; 3,06; 4,08; 5,11 e 6,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em um esquema fatorial 5x5 com cinco repetições em *P. mucronata*. O TDZ apresentou efeito maior que o BA na indução de calos e brotações em dois dos três explantes utilizados (epicótilo e segmento nodal) em *P. mucronata*. Na cultura de endospermas maduros, a formação de brotações ocorreu apenas para o híbrido, na concentração de 4,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ. Estes resultados de caracterização morfológica, germinação e regeneração de plantas *in vitro* são os primeiros em populações de *P. mucronata*.

ABSTRACT

SANTOS; Renan Carrari; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Mach, 2019. Digital phenotyping, seed germination and *in vitro* morphogenesis of *Passiflora* spp. Advisor: Prof. Virginia Silva Carvalho. Co-advisor: Prof. Rodrigo Sobreira Alexandre.

Some wild *Passiflora* species, such as *P. mucronata*, is resistant to premature death and certain diseases caused by soil pathogens. This species is cited as a source of resistance to *Fusarium solani*, to bacteriosis in leaves and to anthracnose in fruits and branches, representing an important alternative for potential use as a rootstock, or in crosses with *Passiflora edulis* or other species of economic interest. However, the lack of scientific information on diversity, genetic compatibility, phenology, propagation and cultivation forms, medicinal potential, pest and disease attack, reproductive biology, storage and seed germination makes it more difficult to use *P. mucronata* in plant breeding programs. Thus, the objective of this work was to quantify the genetic diversity in *Passiflora* spp. by means of digital phenotyping, to evaluate the *in vitro* and *ex vitro* germination of ten populations of *P. mucronata* and to determine the type of explant (endosperm, epicotyl, nodal segment or leaf) that shows the greatest capacity of regeneration of plants *in vitro*. For the quantification of the genetic diversity of seeds in *Passiflora* spp., seeds of *P. edulis*, *P. setacea* and *P. mucronata* were used. The Groundeye® System Mini was used to capture and analyze the seeds. The Groundeye® System Mini generated a spreadsheet with mean values of each treatment for the variables, color, geometry, texture and histogram. The software

analysis generated information that resulted in graphs and spreadsheets, which facilitated the interpretation of seed images. The use of seed descriptors obtained through digital analysis using the Groundeye® System Mini was efficient for the quantification of genetic divergence in *Passiflora* seeds. The *in vitro* and *ex vitro* germination experiments were conducted with seeds of ten populations of *P. mucronata* newly harvested in order to verify their physiological quality, in accordance to the Rules for Seed Analysis. The results demonstrated a great variation in the *ex vitro* and *in vitro* germination in ten populations of *P. mucronata*. It was possible to conclude that in order to obtain a high germination rate of normal seedlings it is necessary the *in vitro* culture of isolated embryos. The material used for the *in vitro* regeneration experiment was: endosperm, nodal segment, leaf and epicotyl. For the endosperm experiment different concentrations of TDZ (0,00; 2,27; 4,54; 6,81 and 9,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$) were used. The evaluation was performed after 45 days. The percentage of callus, callus diameter, callus texture, callus color and shoot formation were evaluated. For the removal of the endosperms, seeds of the hybrid of *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*, *P. setacea*, *P. edulis* and *P. mucronata* were used. For the other explants (epicotyl, nodal segment and leaf), five concentrations of BA and five concentrations of TDZ (2,04; 3,06; 4,08; 5,11 and 6,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$) were tested in one 5x5 factorial scheme with five replicates for *P. mucronata*. TDZ had a greater effect than BA on the induction of calluses and shoots in two of the three explants used (epicotyl and nodal segment). In the mature endosperm culture, shoot formation occurred only for the hybrid, at the concentration of 4,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of TDZ. These are the first results of morphological characterization, germination and regeneration of plants *in vitro* of different populations of *P. mucronata*.

1. INTRODUÇÃO

Os maracujazeiros (*Passiflora* spp.) pertencem à família *Passifloraceae*, possuem uma grande diversidade de espécies, sendo *P. edulis* e *P. alata* as mais importantes para o setor alimentício (Meletti et al., 2011). As espécies desta família estão distribuídas tanto pela região tropical, como subtropical (Souza e Lorenzi, 2012). O gênero é nativo da América do Sul, possuindo cerca de 530 espécies sendo, aproximadamente, 150 originárias do Brasil. O país é considerado um dos maiores centros de diversidade, bem como, centro de origem de, pelo menos, um terço das espécies descritas (Cervi, 2006; Bernacci et al., 2008).

Considerando que *P. edulis* é a espécie mais importante no setor alimentício, principalmente para a produção de sucos, o aumento pela demanda de seus frutos, favoreceu o avanço significativo no seu plantio no Brasil, o que fez com que o país se destacasse como o maior produtor mundial do fruto (Meletti et al., 2011). Segundo dados do IBGE (2017), em 2016 o país destinou uma área de 41.090 hectares, com uma produção equivalente a 554.598 toneladas de frutos colhidos, tendo a maior produção em cinco Estados brasileiros, Bahia (31%), Ceará (17%), Santa Catarina (8%), Rio Grande do Norte (5%) e São Paulo (5%).

Conseqüentemente, com o aumento dos cultivos comerciais de maracujazeiro, os problemas fitossanitários que incidem sobre a cultura ganharam maior importância, visto que acarretam perdas significativas na produção e redução da vida útil dos pomares (Paula et al., 2010). Dentre as doenças que acometem o maracujazeiro destacam-se a murcha-de-fusário e a podridão do

colo, doenças de difícil controle causadas por fitopatógenos que sobrevivem no solo, ocasionando a inviabilidade da área para o plantio (Fischer et al., 2010). Outro fator que inviabiliza a manutenção dos pomares no Brasil é o tamanho das áreas utilizadas para o plantio, o que torna mais difícil a proteção contra o ataque desses patógenos e pragas (Lima et al., 2004). Diante disto, uma alternativa viável para contornar esses problemas fitossanitários seria a utilização de espécies silvestres resistentes como porta-enxerto ou em cruzamentos em programas de melhoramento genético de *P. edulis* (Santos et al., 2012).

Algumas espécies silvestres, como a *P. mucronata*, apresentam resistência à morte prematura e a certas doenças causadas por patógenos de solo (Oliari et al., 2016). Essa espécie é citada como fonte de resistência a *Fusarium solani* (Fischer et al., 2005), à bacteriose nas folhas e à antracnose nos frutos e ramos (Junqueira et al., 2005), representando uma importante alternativa para uso potencial como porta-enxerto e, ou em cruzamentos com *P. edulis* ou outras espécies de interesse econômico (Meletti et al., 2011). Na literatura há um trabalho de minienxertia relatando 80% de pegamento dos enxertos de *P. edulis* sobre *P. mucronata*, evidenciando o potencial uso de *P. mucronata* como porta-enxerto de *P. edulis* (Alexandre et al., 2013).

Entretanto, a falta de informação científica quanto a diversidade, compatibilidade genética, fenologia, formas de propagação e de cultivo, potencial medicinal, ataque de pragas e doenças, biologia reprodutiva, armazenamento e germinação de sementes, torna mais difícil a utilização de *P. mucronata* em programas de melhoramento genético (Junqueira et al., 2005).

Sementes recém-colhidas de *P. mucronata* apresentam alto potencial germinativo, mas a germinação decresce com o passar do tempo, chegando a zero aos doze meses de armazenamento. Além disso, a germinação não é uniforme, o que compromete a padronização das mudas (Santos et al., 2012).

A biotecnologia pode contribuir na melhoria da produção dessas mudas por possibilitar a obtenção de cultivares com características de interesse. A cultura de tecidos vegetais é uma parte da biotecnologia de grande importância tanto para os programas de melhoramento genético vegetal, quanto para a produção de mudas uniformes, com alta qualidade genética e fitossanitária (Felismino, 2005; Pádua, 2012). O sucesso desta tecnologia está diretamente associado à capacidade morfogênica da espécie.

No entanto, muitas espécies ainda não possuem resultados concretos no que tange às respostas aos protocolos de estabelecimento, desenvolvimento, regeneração e conservação *in vitro* (Faria, 2007). Considerando que as espécies de maracujazeiro apresentam grande potencial morfogênico e respondem de diferentes formas aos estímulos visando à morfogênese, torna-se evidente a necessidade de realizar estudos que busquem avaliar os protocolos mais eficientes para a propagação *in vitro*, regeneração, manutenção e conservação do germoplasma (Soares et al., 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Gênero *Passiflora*: Origem, aspectos botânicos e propagação

Acredita-se que a origem da família *Passifloraceae* seja na África, posteriormente se dispersou pela Europa e a Ásia, e finalmente chegou ao Novo Mundo por pontes de terra, se diversificou rapidamente e se dispersou por regiões tropicais e subtropicais, apresentando ampla variedade em sua morfologia, no conteúdo genético e na adaptabilidade climática (Freitas et al., 2011; Muschner et al., 2012; Costa et al., 2016).

O Brasil é detentor de grande diversidade de recursos genéticos, em especial de espécies pertencentes à família *Passifloraceae*, o país é considerado o maior centro de diversidade do gênero *Passiflora*, sendo reconhecidas 146 espécies, das quais 85 são endêmicas. As espécies do gênero *Passiflora* são conhecidas como maracujazeiro (Bernaci et al., 2008).

As plantas do gênero *Passiflora* são caracterizadas por serem trepadeiras lenhosas ou herbáceas com presença de gavinhas axilares bem desenvolvidas. Possuem folhas polimórficas, estípulas e brácteas pequenas ou foliáceas alternas que são variáveis entre as espécies. As flores são caracterizadas por serem bissexuais, actinomorfas, solitárias ou inflorescências com corona filamentosa em uma a várias séries. O gineceu possui três carpelos e o androceu é composto por cinco estames livres ou conados e o ovário é tricarpelar com placentação parietal (Feuillet, 2004). Os frutos são carnosos do tipo baga indeiscente, ricos em sais minerais e vitaminas, sendo reconhecidos pelas propriedades farmacológicas,

nutricionais e ornamentais (Ulmer e MacDougal, 2004; Zucareli et al., 2009). As sementes são comprimidas, com arilo carnosos colorido e testa reticulada, pontuada ou alveolada (Short, 2011).

A propagação comercial do maracujazeiro é feita quase que exclusivamente por meio de sementes, devido à facilidade de execução e à baixa infraestrutura empregada na montagem dos viveiros, porém problemas relacionados à germinação, como a alta variabilidade genética entre as espécies do gênero *Passiflora*, comprometem a formação de mudas, devido à desuniformidade da germinação (Meletti, 2002).

Por outro lado, a propagação vegetativa realizada por meio de métodos de estaquia, enxertia e o cultivo *in vitro*, garante a manutenção de plantas com estabilidade genética, o que resulta em plantios mais uniformes e homogêneos, além de tornar possível a multiplicação de plantas tolerantes e resistentes a pragas e doenças (Oliveira et al., 2002; Meletti, 2002; Negreiros et al., 2006; Alexandre et al., 2009).

Doenças provocadas por patógenos do solo representam um dos problemas enfrentados pela cultura do maracujazeiro no Brasil. Uma alternativa de controle dessas doenças seria a utilização de espécies silvestres resistentes como porta-enxertos (Chaves et al., 2004). Espécies nativas apresentam grande diversidade genética, o que contribui para aumentar o grau de resistência das cultivares comerciais a doenças por meio de hibridizações interespecíficas (Faleiro et al., 2005).

No entanto, para se obter sucesso é necessário conhecer mais sobre o germoplasma do maracujazeiro em estudo, quanto a sua diversidade e compatibilidade genética, assim como tipos e graus de resistência a pragas e doenças e a variabilidade dos patógenos que os acometem (Faleiro et al., 2005).

2.2. Sistema de análise de sementes (SAS) para a quantificação da diversidade genética em *Passiflora* spp.

O equipamento Groundeye® foi desenvolvido em 2011, pela Tbit Tecnologia e Sistemas, tendo como objetivo avaliar a qualidade física e fisiológica das sementes, por meio da captura de imagens de alta resolução, histogramas e gráficos, que permitem a extração de informações como cor, textura e geometria, além do fornecimento de dados referentes a índices de

crescimento e uniformidade de mudas (Andrade, 2014; Pinto et al., 2015). A análise de imagens é um método rápido, objetivo, pouco oneroso e compacto, sendo também um método não destrutivo aplicado nas indústrias de alimento e na agricultura (Andrade, 2014). O emprego desta técnica para a análise de sementes facilita o trabalho de identificação de cultivares, determinação de sementes de diferentes cores, danos mecânicos e classificação de diferentes tamanhos de sementes (Andrade, 2014).

O equipamento utilizado para a avaliação das sementes é composto por um módulo de captação e um software de análise, em que existem três versões disponíveis desse equipamento, Groundeye® Mini, Groundeye® Pro e o Groundeye® Advanced. As sementes a serem avaliadas são colocadas sobre uma bandeja acrílica no módulo de captação e a imagem é capturada por uma ou mais câmeras. A imagem pode ser capturada e analisada ao mesmo tempo ou capturada e analisada posteriormente. Para as avaliações são necessárias configurações no plano de fundo do Groundeye®, tendo como modelos de cor HSV, YCbCr e CIELab. Estes modelos são utilizados de acordo com o material que se deseja analisar (Andrade, 2014).

O sistema de análise de sementes pode ser utilizado para separar sementes com diferentes características presentes em um mesmo lote. Espécies como soja e lentilha já foram selecionadas a partir do uso do Groundeye® (Khatchatourian e Padilha, 2008). Outros trabalhos encontrados na literatura, abordam a utilização do Groundeye® para avaliações do vigor e do potencial fisiológico de sementes de soja e milho (Pinto et al., 2015; Ávila, 2017) e avaliações da quantificação da diversidade genética de famílias de goiabeira (Krause et al., 2017) e *Passiflora* (Torres, 2018).

O estudo da diversidade genética entre diferentes populações é de extrema importância para programas de melhoramento genético, pois busca a identificação de genótipos com características contrastantes, com o objetivo de realizar cruzamentos entre esses materiais, identificando o maior número possível de heterose (Silva et al., 2014).

Alguns trabalhos de diversidade genética foram realizados recentemente com a utilização do equipamento Groundeye®. Krause et al. (2017) avaliaram a eficiência da análise de imagens digitais de sementes para quantificação da diversidade genética entre genótipos de famílias

endogâmicas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) e observaram que a análise digital de imagens foi eficiente para a quantificação da diversidade genética em famílias de goiabeira. Resultados contrastantes foram encontrados por Torres (2018), que caracterizando 110 genótipos de cruzamentos entre populações segregantes de *P. edulis* x *P. setacea*, observou que o equipamento Groundeye® por si só, não é eficaz para separação dos genótipos por meio dos caracteres de sementes, sendo necessários testes de bancada para haver uma comparação com mais eficácia para a avaliação da divergência genética.

2.3. Importância econômica da cultura do maracujazeiro

A fruticultura brasileira se caracteriza como um dos segmentos da economia que mais cresce no País (IBRAF, 2016). O Brasil tem obtido grandes avanços na melhoria da qualidade das frutas produzidas, nas condições ambientais de cultivo e no aumento da produtividade, com o emprego de modernas técnicas agrônomicas e grande investimento em alta tecnologia (ABF, 2015).

No Brasil, as espécies de maracujazeiro com maior expressão comercial são a *P. edulis* (maracujazeiro azedo) e a *P. alata* (maracujazeiro doce) que correspondem à grande parte da área plantada de maracujazeiro comercial no país (Meletti e Bruckner, 2001). Espécies como *P. edulis* e *P. alata* são cultivadas pelas propriedades alimentícias, medicinais e ornamentais, além de consumidas *in natura* pela qualidade de seus frutos (Meletti, 2011). O maracujazeiro azedo é o mais conhecido, cultivado e comercializado, devido à qualidade de seus frutos. O maracujazeiro doce tem sua comercialização e produção limitada devido à falta de hábito de consumo pela população, sendo consumido exclusivamente como fruta fresca (Souza e Melletti; 1997).

A qualidade dos frutos produzidos no Brasil fez com que o país se tornasse o maior produtor e consumidor mundial de maracujá. Em 2017, as principais regiões produtoras no Brasil foram Nordeste e Sudeste, sendo a região Nordeste responsável por mais de 70% da produção nacional, com destaque para os Estados da Bahia e Ceará (IBGE, 2018).

A partir da década de 80, passou a assumir uma importância econômica significativa com o aumento do consumo, o que impulsionou o aumento da área

cultivada e da produção dos frutos, levando a uma maior profissionalização da atividade (Ribeiro et al., 2013).

O maracujazeiro possui uma grande importância econômica para o Brasil. Espécies como *P. edulis* e *P. alata* são cultivadas pelas propriedades alimentícias, medicinais e ornamentais, além de consumidas *in natura* pela qualidade de seus frutos (Meletti, 2011).

A maior parte da produção do maracujazeiro se destina ao consumo de frutas frescas, sendo a restante destinada às agroindústrias de processamento para a fabricação de sucos. O suco de maracujá tem se mantido em terceiro lugar em produção no país, atrás apenas dos sucos de laranja e caju (Meletti, 2011; Aguiar e Santos, 2001). Entretanto, mesmo sendo o maior produtor e o maior consumidor mundial da fruta, o Brasil ainda não produz excedentes exportáveis significativos, sendo inclusive eventual importador de países sul-americanos (Pires e Mata, 2004).

O maracujazeiro é cultivado também para fins ornamentais, devido ao fato de suas flores possuírem uma beleza exótica, com forma e cores peculiares, exercendo atração pelo tamanho e originalidade de suas formas (Souza e Meletti, 1997).

Além das propriedades alimentícias e ornamentais de *P. edulis* e *P. alata*, algumas espécies silvestres do gênero *Passiflora* estão entre os fitoterápicos mais utilizados pela população, seja no tratamento da asma e da icterícia, bem como na forma de emplastos para as erisipelas e doenças de pele com inflamação. Podem ainda ser utilizadas a fim de combater enfermidades como verminoses e tumores gástricos (Marlière et al., 2008; Costa e Tupinambá, 2005). Dentre os principais fitoconstituintes desta planta, encontram-se alcaloides, fenóis, flavonoides e compostos glicosídicos cianogênicos (Dhawan et al., 2004). Além destas espécies citadas o gênero tem uma grande diversidade de espécies que merecem ser exploradas, como o *P. mucronata*.

2.4. *Passiflora mucronata* Lam.

Conhecida popularmente como maracujá de restinga, sururu ou maracujá pintado, *P. mucronata* é uma espécie nativa da Mata Atlântica, com grande potencial ornamental, que ocorre do litoral sul da Bahia, até o litoral norte de São Paulo (Lorenzi et al., 2006; Bernacci et al., 2008). Nos Estados do Espírito Santo

e do Rio de Janeiro, em vegetações predominantemente arbustivas, de restinga, também é detectada a presença da espécie (Magnago et al., 2011).

Morfológicamente, a espécie é considerada uma trepadeira herbácea, com caule delgado não lenhoso, volúvel e que se enrosca em torno de um suporte de maneira espiralada. Possuem pecíolos de 1 a 2 centímetros, com duas a quatro glândulas com coloração obscura. As folhas têm de três a cinco nervuras, são ovado-cordadas, subpeltadas a codiformes na base e arredondadas no ápice. Os pedúnculos solitários, robustos e cilíndricos, medindo até oito centímetros de comprimento ficam articulados a base floral. As flores são brancas e fosforescentes, com floração intensa e quase contínua durante todo o ano, sendo máxima nos meses de fevereiro a maio. Esta espécie possui antese noturna, e se difere de outras do gênero, por possuir polinização realizada por quirópteros (morcegos). Um outro detalhe é a formação de um semicírculo pelo agrupamento de estigmas e anteras durante a abertura das flores, o que torna a flor zigomorfa em relação ao androceu e gineceu, característica incomum em *Passifloras* (Cervi, 1997; Barros et al., 2009; Meletti et al., 2011; Alexandre et al., 2014).

Os frutos de *P. mucronata* são ovoides e apresentam uma média de 136 a 321 sementes maduras por fruto, possuem polpa pouco succulenta com arilo aderido às sementes. Entretanto, para que ocorra a frutificação, é fundamental a presença de mais de um indivíduo de genótipos diferentes, pois existe expressiva autoincompatibilidade na espécie (Suassuna et al., 2003; Meletti et al., 2011). Essa espécie possui o número de cromossomos $2n=18$ (Souza et al., 2003). As sementes de *P. mucronata* são achatadas e quando recém-colhidas apresentam grande potencial de germinação (79,54%), porém, à medida que se prolonga o armazenamento, a germinação decresce, perdendo a viabilidade após um período de 4 a 12 meses de armazenamento (Cervi, 1997; Santos et al., 2012).

O estudo da espécie indicou que ela possui resistência à bacteriose nas folhas e à antracnose nos frutos e ramos, além de possuir características para fins medicinais com capacidade sedativa e potencial para o tratamento da tuberculose, especificamente relacionado à atividade antimicrobacteriana e anti-inflamatória (Araújo, 2017). Por outro lado, seu uso também se destaca por meio de crenças populares em combate a vermes e hemorroidas (Junqueira et al., 2005; Boscolo e Valle, 2008).

Embora a espécie apresente grande importância, ainda são incipientes as informações científicas a seu respeito. Há necessidade de avanços em estudos básicos sobre a morfologia, fisiologia e anatomia de *P. mucronata*, para se conhecer melhor o potencial da espécie.

2.5. Cultura de tecido vegetal ligada à cultura do maracujazeiro

A biotecnologia refere-se ao conjunto de técnicas específicas para a modificação e melhoria dos sistemas biológicos, organismos vivos e seus derivados para uso específico (Carvalho, 2011). As técnicas biotecnológicas têm revolucionado a agricultura moderna por meio de tecnologias que permitem melhorar ou obter características agrônômicas e nutricionais desejáveis no cultivo de plantas (Carrer e Barbosa, 2010). Entre estas técnicas, destaca-se a cultura de tecidos vegetais ou cultivo *in vitro*, que segundo Carvalho (2011), é definida como uma cultura em meio nutritivo desenvolvida em condições assépticas, com o uso de células, tecidos ou órgãos de plantas em condições controladas de densidade de fluxo de fótons, fotoperíodo, temperatura, dentre outros fatores. A utilização do cultivo *in vitro* tem se destacado na recuperação de plantas livres de vírus e outros agentes causadores de doenças, na conservação e intercâmbio de germoplasma *in vitro*, na propagação *in vitro* de plantas, na recuperação de híbridos interespecíficos de cruzamentos com incompatibilidade pós-zigótica; na produção de haploides; transformação genética, dentre outras.

Os primeiros trabalhos com cultura de tecidos em passifloras iniciaram com Nakayama em 1966, trabalhando com tecidos de *P. caerulea*, seguido por Moran Robles, que desenvolveu em 1978, diferentes meios de cultura para obtenção da parte aérea e da raiz de *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. molissima*. A partir daí, outros trabalhos foram desenvolvidos com o uso da técnica de cultura de tecidos vegetais, a fim de verificar qual o melhor protocolo para o estabelecimento *in vitro*, conservação e multiplicação das mais diferentes espécies de maracujazeiro.

Apesar de serem encontrados na literatura trabalhos sobre o cultivo *in vitro* com o maracujazeiro, apenas 3% das espécies do gênero *passiflora* já foram cultivadas *in vitro*, demonstrando carência de estudos sobre outras espécies do gênero (Melleti et al., 2002; Lima et al., 2004).

Os trabalhos encontrados na literatura descrevem diferentes comportamentos *in vitro* das espécies de *Passiflora*, geradas a partir dos protocolos estabelecidos, tipos de explantes utilizados e concentrações dos nutrientes no meio de cultura (Monteiro et al., 2000; Vieira et al., 2014).

A resposta *in vitro* de diferentes espécies do gênero *Passiflora*, demonstrou que cada espécie apresenta características específicas na regeneração *in vitro*, mas em todas elas, os segmentos nodais foram os mais responsivos (Faria et al., 2007). Da mesma forma, Shekhawat et al., (2015) usaram segmentos nodais de *P. edulis* para aprimorar um protocolo de enraizamento *ex vitro* desta mesma espécie.

O maracujazeiro, assim como a maioria dos vegetais, é cultivado *in vitro* em meio de cultura MS, que foi desenvolvido para tabaco (Murashige e Skoog, 1962). Monteiro et al. (2000) desenvolveram um meio de cultura que atendesse aos requerimentos nutricionais de *Passiflora edulis*, denominado MSM. Este meio foi desenvolvido a partir de ajustes nos níveis de sais minerais considerados adequados para esta espécie.

Em segmentos nodais de *P. setacea* recomenda-se para a morfogênese *in vitro* a utilização do meio MSM suplementado com BA (Araújo, 2017).

É possível notar que cada espécie responde de forma diferente às condições de cultivo, onde a morfogênese é fortemente influenciada pela escolha do explante, do protocolo estabelecido e do genótipo a ser utilizado. Assim sendo, são necessárias pesquisas para cada genótipo, a fim de estabelecer um protocolo e um explante que garantam as respostas mais eficientes *in vitro* (Pinto et al., 2010).

Outro fator que interfere diretamente no cultivo *in vitro* é a composição e a concentração dos fitorreguladores. O balanço entre auxinas e citocininas é responsável pela morfogênese nos tecidos vegetais, em que uma quantidade superior de auxina sobre citocinina estimula a formação de raízes e o contrário leva a formação das partes aéreas. Já em níveis intermediários, leva a formação de calos (Skoog e Miller, 1957).

Contudo, ainda são escassos os trabalhos de cultivo, conservação e propagação *in vitro* no gênero *Passiflora*. Há necessidade de avanços nos estudos básicos para o estabelecimento de protocolos de cultivo *in vitro* adequados para espécies deste gênero (Faleiro et al., 2011).

2.6. Cultivo *in vitro* de embriões cotiledonares

A técnica de cultivo de embriões cotiledonares vem sendo utilizada com sucesso para inúmeras culturas, a fim de permitir a superação de barreiras germinativas. Em *Passiflora*, a técnica possibilita um maior índice de germinação, se comparado com sementes intactas (Generoso, 2018). Alguns trabalhos encontrados na literatura relatam a dificuldade de germinação de algumas espécies do gênero *Passiflora* (Zucareli et al., 2009; Zucareli et al., 2014; Generoso et al., 2018). Esta dificuldade está associada a dois fatores: A presença de inibidores químicos no endosperma das sementes e a resistência mecânica do tegumento a entrada de água e nutrientes no interior das sementes. (Ellis et al., 1985; Tsuboi e Nakagawa, 1992). Com a remoção dessas duas influências, inibidores presentes no endosperma e rigidez do tegumento, o embrião consegue germinar, em período de tempo mais rápido, gerando plântulas normais (Bridgen, 1994).

São vários os fatores que podem interferir no sucesso da técnica do cultivo de embriões, como o genótipo, o estágio embrionário, a maturidade fisiológica da semente, a desinfestação da semente, a remoção inadequada do embrião, a escolha do meio nutritivo adequado, os fitorreguladores utilizados, as substâncias fenólicas liberadas e as condições ambientais de cultivo (Carvalho e Araújo, 2007; Generoso, 2018).

As exigências nutricionais para que ocorra o crescimento *in vitro* do embrião variam de acordo com a espécie. O requerimento nutricional está ligado ao estágio de desenvolvimento embrionário, pois quanto mais jovens os embriões, maiores são as exigências nutricionais e hormonais. Quando os embriões são capazes de sintetizar as substâncias necessárias para o seu crescimento na fase autotrófica, o meio de cultura é mais simples, composto basicamente por sais minerais e sacarose (Carvalho e Araújo, 2007; Walter et al., 2018). Somente a partir do desenvolvimento dos cotilédones é que o embrião começa a se tornar independente, passando para o estágio autotrófico (Raghavan e Torrey, 1964).

Na preparação do meio de cultura para o cultivo de embriões, os fitorreguladores mais usados são as citocininas, as auxinas e as giberelinas. O uso das citocininas é feito em combinação com alguma auxina, a fim de permitir o crescimento e posteriormente a diferenciação dos embriões. O uso

das auxinas promove o crescimento do embrião, a formação das raízes primárias, hipocótilos e cotilédones. As giberelinas permitem a germinação de forma precoce e o crescimento do embrião (Raghavan, 2003; Manzur et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Quantificar a diversidade genética em *Passiflora* spp. por meio da fenotipagem digital de sementes em diferentes acessos, avaliar a germinação *in vitro* e *ex vitro* de dez genótipos de *P. mucronata* e determinar o tipo de explante (endosperma, epicótilo, segmento nodal ou folha) que apresenta a maior regeneração de plantas *in vitro*.

3.2. Objetivos Específicos

- I. Avaliar o uso da análise digital de imagens de sementes, obtidas via GroundEye® System, para a quantificação da diversidade genética em *Passiflora* spp.;
- II. Determinar os genótipos de *P. mucronata* e o tipo de explante (sementes intactas, sem tegumento ou embriões isolados) que apresentam maior germinação e vigor das sementes *in vitro*;
- III. Verificar o efeito de diferentes concentrações de TDZ, sobre a cultura de endosperma do híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*, *P. setacea*, *P. edulis* e *P. mucronata*, para a regeneração de plantas triploides;
- IV. Determinar o tipo de explante (segmento nodal, intermodal e discos foliares) e as concentrações BA e TDZ que induzam maior resposta morfogênica *in vitro* em *P. mucronata*;

V. Estabelecer um protocolo eficiente para morfogênese *in vitro* que promova maior multiplicação e regeneração das plantas em *P. mucronata*.

4. TRABALHOS

4.1. FENOTIPAGEM DIGITAL NA DIVERSIDADE GENÉTICA DE SEMENTES DE *Passiflora* spp.

RESUMO

Devido à grande heterogeneidade dentro do gênero *Passiflora*, o estudo da diversidade genética em maracujazeiro possui grande importância para o fornecimento de informações sobre os recursos genéticos disponíveis para a caracterização de cada espécie. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência da análise digital de imagens de sementes para a quantificação da diversidade genética em *Passiflora* spp. Foram utilizadas sementes de *P. edulis* e *P. setacea* pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético de *Passiflora* da UENF, nove populações de *P. mucronata* da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e uma população de *P. mucronata* proveniente do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura. O experimento foi conduzido em DIC com 12 tratamentos (10 populações de *P. mucronata*, um genótipo de *P. edulis* e um genótipo de *P. setacea*) com quatro repetições, sendo cada repetição composta por 50 sementes. O equipamento Groundeye® System Mini foi utilizado para capturar e analisar as imagens digitais das sementes. O Groundeye® gerou

uma planilha com valores médios de cada população para as variáveis analisadas. Foram obtidas 334 variáveis, sendo 51 referentes a cor, 48 a geometria, 43 a textura e 192 a histogramas. Após uma triagem, restaram 246 variáveis. Para a quantificação de divergência genética foi estimada a matriz de dissimilaridade genética pela distância generalizada de Mahalanobis. A partir dessa matriz foi realizado o agrupamento das populações utilizando o método hierárquico da ligação média entre grupo (Unweighted Pair-Group Average – UPGMA). Foi estimada a importância relativa dos caracteres para a dissimilaridade pelo método do Singh. Após, foram selecionados 10% dos descritores que apresentaram as maiores contribuições relativas para a diversidade genética entre as populações, e foi construído um dendograma com base nesses descritores e um outro dendograma com base em 20% dos descritores com as maiores contribuições relativas. Na “super” característica histograma, houve um maior número de descritores capazes de contribuir significativamente para a diversidade genética em populações de *Passiflora* spp. Com apenas 10 e 20% das variáveis obtidas por meio da análise digital de sementes é possível explorar a diversidade genética entre as populações de *Passiflora* spp.

ABSTRACT

Due to the great heterogeneity within the genus *Passiflora*, the study of the genetic diversity in passion fruit is very important to provide information about the available genetic resources for the characterization of each species. Therefore, the objective of this work was to evaluate the efficiency of the digital analysis of seed images for the quantification of the genetic diversity in *Passiflora* spp. Seeds of *P. edulis* and *P. setacea* belonging to the Passionflower Breeding Program of the UENF, nine *P. mucronata* populations of the Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) and a population of *P. mucronata* from the germplasm bank of Embrapa Cassava and Fruticulture. The experiment was conducted in ICD with 12 treatments (10 populations of *P. mucronata*, one genotype of *P. edulis* and one genotype of *P. setacea*) with four replicates, each replicate being composed of 50

seeds. Groundeye® System Mini was used to capture and analyze the digital images of the seeds. Groundeye® generated a spreadsheet with mean values of each population for the analyzed variables. A total of 334 variables were obtained, being 51 referring to color, 48 to geometry, 43 to texture and 192 to histograms. After a screening, 246 variables remained. For the quantification of genetic divergence the genetic dissimilarity matrix was estimated by the generalized distance of Mahalanobis. From this matrix, the population grouping was performed using the hierarchical method of the Unweighted Pair-Group Average (UPGMA). The relative importance of characters for dissimilarity was estimated by the Singh method. Afterwards, 10% of the descriptors that had the highest relative contributions for genetic diversity between the populations were selected, and a dendrogram based on these descriptors and another dendrogram based on 20% of the descriptors with the highest relative contributions were constructed. In the "super" characteristic histogram, there was a greater number of descriptors able to contribute significantly to the genetic diversity in populations of *Passiflora* spp. With only 10 and 20% of the variables obtained through the digital seed analysis it is possible to explore the genetic diversity among the populations of *Passiflora* spp.

4.1.1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* possui uma grande variabilidade genética, a qual pode ser explorada por meio de programas de melhoramento genético vegetal, visando à obtenção de variedades mais produtivas e resistentes aos estresses bióticos e abióticos. O conhecimento e a identificação dessa variabilidade entre as espécies são de extrema importância, visto que podem ser encontrados e selecionados genótipos, principalmente com relação a características de interesse agrônomo (Godoy et al., 2015; Guimarães Silva et al., 2016; Torres, 2018).

No Brasil, a espécie mais explorada comercialmente é o maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis*) em virtude da qualidade dos frutos e do maior rendimento industrial, o que têm possibilitado o surgimento de novas áreas para o cultivo e a expansão da cultura. Com a intensificação dos plantios comerciais,

ocorreu o aparecimento de diversos problemas fitossanitários, causados por fungos, bactérias e vírus, o que levou a uma maior atenção às espécies silvestres, como em *Passiflora mucronata* e *Passiflora setacea* por possuírem genes que apresentam resistência a doenças e pragas, além de apresentarem potencial ornamental (Junqueira e Braga, 2005).

Trabalhos de diversidade genética, já foram relatados anteriormente para nove populações de *P. mucronata*, foram verificadas diferentes respostas de enraizamento e crescimento entre os materiais, causadas pela indução exógena de auxina. As diferentes respostas quanto ao enraizamento e crescimento radicular na presença do fitorregulador, acarretaram divergência intraespecífica entre as populações de *P. mucronata* (Franca et al., 2018).

Devido a essa heterogeneidade entre as espécies do gênero *Passiflora* o estudo da diversidade genética em maracujazeiro possui grande importância para o fornecimento de informações sobre os recursos genéticos disponíveis para a caracterização de cada espécie. Essas características podem ser avaliadas por meio de técnicas multivariadas, como a análise por agrupamento e por componentes principais a partir da utilização do método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*). A partir desta análise é possível obter genótipos com características similares dentro de grupo e divergentes entre grupos (Peçanha et al., 2011; Guimarães Silva et al., 2016).

As sementes do maracujazeiro podem ser utilizadas para investigar a diversidade genética do gênero e esses estudos podem contribuir para a melhoria da qualidade fisiológica das sementes a partir de estratégias de seleção (Cardoso et al., 2009). Outras partes da planta, como a folha, flor e frutos também podem ser utilizadas para o estudo da diversidade do gênero, no entanto, a importância das sementes frente aos demais órgãos, está associada aos processos de dispersão e reprodução vegetal que acontecem a partir da fecundação do óvulo em plantas superiores (Gustin e Settles, 2015). Deste modo, o uso de descritores voltados para as características das sementes pode representar uma estratégia relevante para auxiliar na seleção de genótipos em programas de melhoramento genético vegetal, uma vez que é possível determinar a diversidade genética para as variáveis relacionadas à semente (Gustin e Settles, 2015; Ferreira et al., 2018).

A fenotipagem digital de sementes pode ser utilizada para quantificar a diversidade genética entre os genótipos de uma mesma espécie. Essa

quantificação acontece por meio da captura e análise de imagens que possibilitam a elaboração de planilhas e gráficos sobre o material estudado (Torres, 2018). No Brasil, com a finalidade de realizar capturas de imagens, histogramas e gráficos que facilitem a análise de sementes e plântulas, a empresa Tbit desenvolveu o equipamento Groundeye® System Mini em 2011 (Andrade et al., 2016; Ferreira et al., 2018).

Com este equipamento pode-se quantificar a diversidade de populações, com auxílio de técnicas de análise multivariadas, no qual quantificam as medidas de dissimilaridade permitindo expressar o grau de diversidade genética entre as populações que estão sendo analisadas. Características como cor, geometria e textura das sementes, além de histogramas que são calculados a partir dessas variáveis, possibilitam o estudo da diversidade genética (Cruz et al., 2004; Fiorani e Schurr, 2013).

Sementes de maracujazeiro azedo foram investigadas por meio de análise digital de imagens, para o estudo da divergência genética, sendo possível a partir de cinco descritores de cor, seis de textura e seis de geometria, discriminar e estimar a divergência genética em 35 famílias de irmãos completos (Ferreira et al., 2018). Entretanto, ainda não se tem informações sobre a utilização de imagem digital para a quantificação da diversidade genética em populações comerciais e silvestres do gênero *Passiflora*, utilizando características das sementes como tamanho, forma, cor, textura e histogramas.

4.1.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.2.1. Caracterização do local e delineamento estatístico

A pesquisa foi realizada de agosto a setembro de 2018, no Setor de Produção e Tecnologia de Sementes do Laboratório de Fitotecnia (LFIT), no Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 12 tratamentos (10 populações de *P.mucronata*, um genótipo de

P. edulis e um genótipo de *P. setacea*) com quatro repetições, sendo cada repetição composta por 50 sementes.

4.1.2.2. Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de *P. edulis* e *P. setacea* pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético de *Passiflora* da UENF, nove populações de *P. mucronata* da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e uma população de *P. mucronata* proveniente do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Figura 1). As sementes de *P. edulis* e *P. setacea*, foram utilizadas como controle no experimento, visto que apresentam características contrastantes, fáceis de serem observadas.

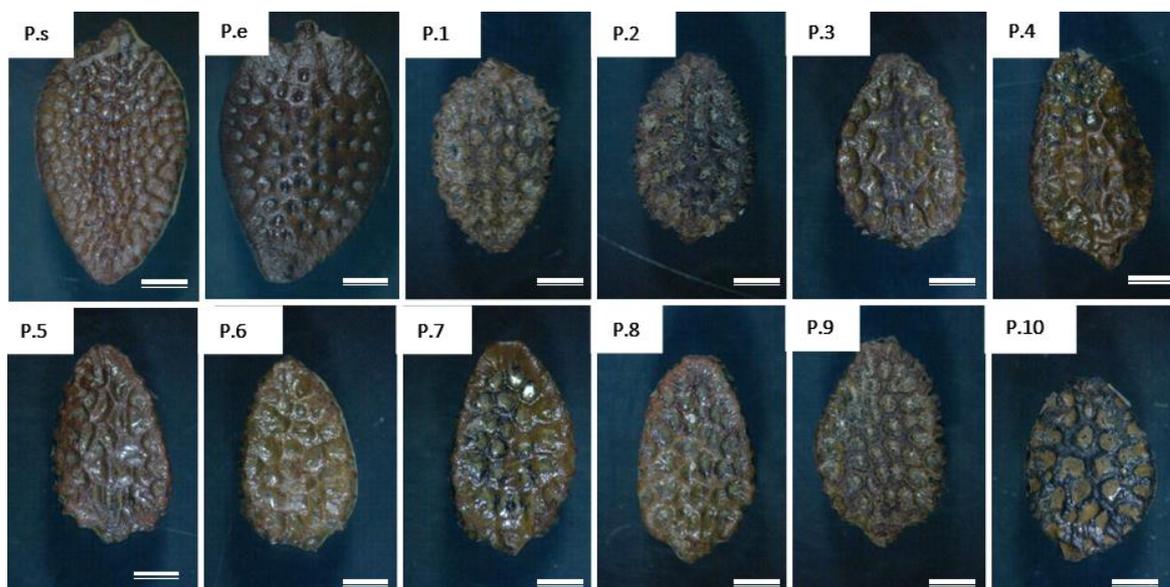


Figura 1. Sementes de *P. setacea*, *P. edulis* e *P. mucronata*, avaliadas pelo equipamento Graundeye® System. P.s = *Passiflora setacea*; P.e = *Passiflora edulis*; P1 - P10 = *Passiflora mucronata*. Barra = 1,6 mm.

4.1.2.3. Captura e análise de imagens de sementes de *Passiflora* spp.

O equipamento Groundeye® System Mini foi utilizado para capturar e analisar as imagens digitais das sementes. O equipamento é composto por um módulo de captação de imagem e um software para análise. O módulo de captação é composto por uma bandeja de acrílico na qual o objeto de estudo é inserido para a captura das imagens por meio de duas câmeras de alta resolução

(Figura 2-a). As sementes foram dispostas na bandeja de acrílico para a captura das imagens (Figura 2-b).

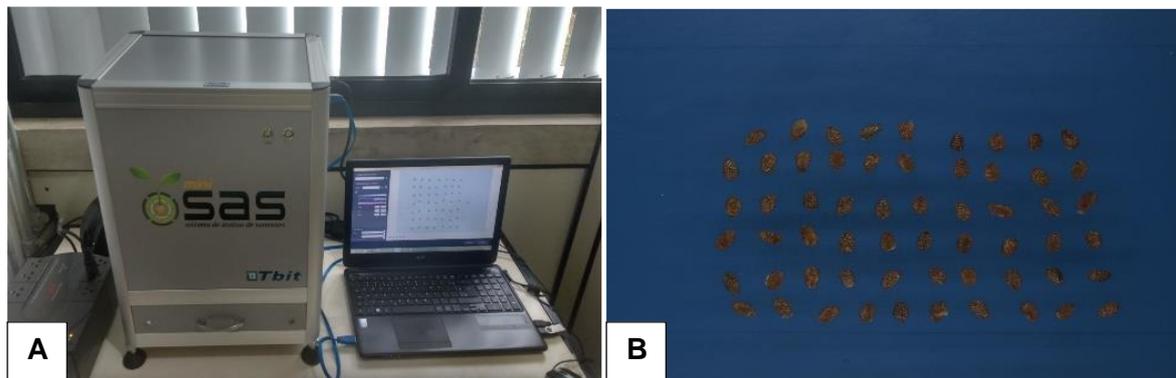


Figura 2. Equipamento Groundeye® System Mini: (A) Visão geral do equipamento; (B) Módulo de captura de imagens.

O Groundeye® System gerou as imagens e uma planilha com valores médios de cada tratamento, para as variáveis cor, geometria e textura, além dos histogramas calculados a partir das características extraídas das variáveis analisadas (Figura 3).

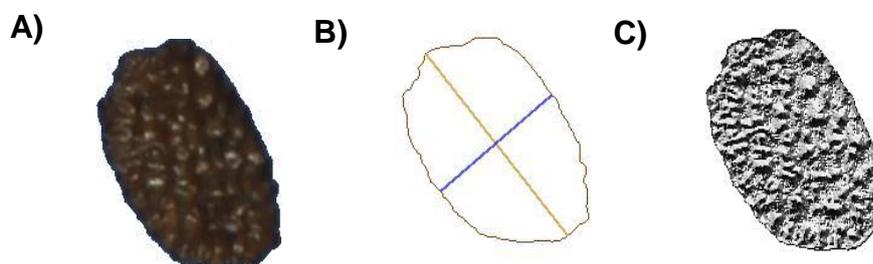


Figura 3. Imagens geradas pelo programa: (A) Aspecto geral da semente de *Passiflora*. (B) Área geométrica da semente de *Passiflora*. (C) Textura da semente de *Passiflora*.

O Groundeye® gerou uma planilha com valores médios de cada população para as variáveis analisadas. Neste estudo foram obtidas 334 variáveis, sendo 51 referentes a cor, 48 a geometria, 43 a textura e 192 a histogramas. Após uma triagem, restaram 246 variáveis, sendo 36 referentes a cor (Tabela 1), 46 a geometria (Tabela 2), 31 a textura (Tabela 3) e 133 a histogramas (Tabela 4). A triagem consistiu na remoção de variáveis com valores iguais a zero (Torres, 2018).

Tabela 1. Descrição das variáveis relacionadas à cor. Dados fornecidos pelo Groundeye® System. Campos dos Goytacazes – RJ, 2019

Código	Variável	Código	Variável
C 01	Abaixo do Otsu: Canal azul	C 19	CIELab: Dispersão de L
C 02	Abaixo do Otsu: Canal verde	C 20	CIELab: L
C 03	Abaixo do Otsu: Canal vermelho	C 21	Concentração da matiz
C 04	Abaixo do Otsu: CIELab: a	C 22	Dominância laranja
C 05	Abaixo do Otsu: CIELab: b	C 23	Dominância preta
C 06	Abaixo do Otsu: CIELab: L	C 24	Dominância vermelha
C 07	Acima do Otsu: Canal azul	C 25	Intensidade
C 08	Acima do Otsu: Canal verde	C 26	Luma
C 09	Acima do Otsu: Canal vermelho	C 27	Luminosidade
C 10	Acima do Otsu: CIELab: a	C 28	Matiz
C 11	Acima do Otsu: CIELab: b	C 29	Média: Canal azul
C 12	Acima do Otsu: CIELab: L	C 30	Média: Canal verde
C 13	Brilho	C 31	Média: Canal vermelho
C 14	CIELab: b	C 32	Predominante: Canal azul
C 15	CIELab: Concentração	C 33	Predominante: Canal verde
C 16	CIELab: Dispersão	C 34	Predominante: Canal vermelho
C 17	CIELab: Dispersão de a	C 35	Cor: Saturação
C 18	CIELab: Dispersão de b	C 36	Variância da matiz

Tabela 2. Descrição das variáveis relacionadas à geometria. Dados fornecidos pelo Groundeye® System. Campos dos Goytacazes – RJ, 2019

Código	Variável	Código	Variável
G 01	Afinamento	G 24	Mudança no perímetro
G 02	Área	G 25	Número de lacunas
G 03	Área convexa	G 26	Número de quinas por Harris
G 04	Circularidade	G 27	Número de quinas por Susan
G 05	Circularidade por fator de forma	G 28	Perímetro
G 06	Circularidade por FFCg	G 29	Perímetro convexo
G 07	Circularidade por FFCm	G 30	Quociente de aspecto
G 08	Complexidade da forma	G 31	Rácio de modificação
G 09	Compressão	G 32	Retângulos circunscritos: Área média
G 10	Convexidade do contorno	G 33	Retângulos circunscritos: Lado oposto à maior aresta
G 11	Deformação do contorno	G 34	Retângulos circunscritos: Lado oposto à menor aresta
G 12	Diâmetro contido	G 35	Retângulos circunscritos: Maior área
G 13	Diâmetro de Feret	G 36	Retângulos circunscritos: Maior aresta
G 14	Diâmetro máximo	G 37	Retângulos: Maior perímetro

Tabela 2, Cont.

G 15	Diâmetro máximo lateral	G 38	Retângulos circunscritos: Média das maiores arestas
G 16	Diâmetro mínimo	G 39	Retângulos circunscritos: Média das menores arestas
G 17	Distâncias convexas	G 40	Retângulos circunscritos: Menor área
G 18	Esfericidade da forma	G 41	Retângulos circunscritos: Menor aresta
G 19	Esfericidade da forma modificada	G 42	Retângulos circunscritos: Menor perímetro
G 20	Extensão	G 43	Retângulos circunscritos: Perímetro médio
G 21	Índice de variação vertical	G 44	Solidez do contorno
G 22	Irregularidade do contorno	G 45	SURF
G 23	Mudança de segmentos de retas no perímetro	G 46	Variância elíptica

Tabela 3. Descrição das variáveis relacionadas à textura. Dados fornecidos pelo Groundeye® System. Campos dos Goytacazes – RJ, 2019

Código	Variável	Código	Variável
T 01	Fourier: Média das fases	T 16	Laws: LW
T 02	Fourier: Média de magnitudes	T 17	Laws: RW
T 03	Haralick: Contraste	T 18	Laws: SR
T 04	Haralick: Correlação	T 19	Laws: SW
T 05	Haralick: Dissimilaridade	T 20	Run Length: GLD
T 06	Haralick: Energia	T 21	Run Length: GLNU
T 07	Haralick: Entropia	T 22	Run Length: HGRE
T 08	Haralick: Homogeneidade	T 23	Run Length: LRE
T 09	Haralick: Média	T 24	Run Length: LRHGE
T 10	Laws: ER	T 25	Run Length: RLD
T 11	Laws: ES	T 26	Run Length: RLNU
T 12	Laws: EW	T 27	Run Length: SRE
T 13	Laws: LE	T 28	Run Length: SRHGE
T 14	Laws: LR	T 29	SFM: Medida do espaço de frequência
T 15	Laws: LS	T 30	SFM: Medida do espaço de frequência modificado
		T 31	Haralick: Variância

Tabela 4. Descrição das variáveis relacionadas a histograma. Dados fornecidos pelo Groundeye® System. Campos dos Goytacazes – RJ, 2019

Código	Variável	Código	Variável
H 01	Azul: Cumes	H 67	NDLPQ: Mediana
H 02	Azul: Desvio padrão	H 68	NDLPQ: Valor máximo
H 03	Azul: Entropia	H 69	NDLPQ: Variância
H 04	Azul: Índice máximo	H 70	Verde: Cumes
H 05	Azul: Média	H 71	Verde: Desvio padrão
H 06	Azul: Mediana	H 72	Verde: Entropia
H 07	Azul: Valor máximo	H 73	Verde: Índice máximo
H 08	Azul: Variância	H 74	Verde: Média
H 09	HSL: Luminosidade: Cumes	H 75	Verde: Mediana
H 10	HSL: Luminosidade: Desvio padrão	H 76	Verde: Valor máximo
H 11	HSL: Luminosidade: Entropia	H 77	Verde: Variância
H 12	HSL: Luminosidade: Índice máximo	H 78	Vermelho: Cumes
H 13	HSL: Luminosidade: Média	H 79	Vermelho: Desvio padrão
H 14	HSL: Luminosidade: Mediana	H 80	Vermelho: Entropia
H 15	HSL: Luminosidade: Valor máximo	H 81	Vermelho: Índice máximo
H 16	HSL: Luminosidade: Variância	H 82	Vermelho: Média
H 17	HSL: Matiz: Cumes	H 83	Vermelho: Mediana
H 18	HSL: Matiz: Desvio padrão	H 84	Vermelho: Valor máximo
H 19	HSL: Matiz: Entropia	H 85	Vermelho: Variância
H 20	HSL: Matiz: Índice máximo	H 86	YCbCr: Brilho: Cumes
H 21	HSL: Matiz: Índice mínimo	H 87	YCbCr: Brilho: Desvio padrão
H 22	HSL: Matiz: Média	H 88	YCbCr: Brilho: Entropia
H 23	HSL: Matiz: Mediana	H 89	YCbCr: Brilho: Índice máximo
H 24	HSL: Matiz: Valor máximo	H 90	YCbCr: Brilho: Média
H 25	HSL: Matiz: Variância	H 91	YCbCr: Brilho: Mediana
H 26	HSL: Saturação: Cumes	H 92	YCbCr: Brilho: Valor máximo
H 27	HSL: Saturação: Desvio padrão	H 93	YCbCr: Brilho: Variância
H 28	HSL: Saturação: Entropia	H 94	YCbCr: Intensidade do azul: Cumes
H 29	HSL: Saturação: Índice máximo	H 95	YCbCr: Intensidade do azul: Desvio padrão
H 30	HSL: Saturação: Índice mínimo	H 96	YCbCr: Intensidade do azul: Entropia
H 31	HSL: Saturação: Média	H 97	YCbCr: Intensidade do azul
H 32	HSL: Saturação: Mediana	H 98	YCbCr: Intensidade do azul: Média
H 34	HSL: Saturação: Variância	H 100	YCbCr: Intensidade do azul: Valor máximo
H 35	LBP: Cumes	H 101	YCbCr: Intensidade do azul: Variância
H 36	LBP: Desvio padrão	H 102	YCbCr: Intensidade do vermelho: Desvio padrão

Tabela 4, Cont.

H 37	LBP: Entropia	H 103	YCbCr: Intensidade do vermelho: Entropia
H 38	LBP: Índice máximo	H 104	YCbCr: Intensidade do vermelho: Índice máximo
H 39	LBP: Índice mínimo	H 105	YCbCr: Intensidade do vermelho: Média
H 40	LBP: Média	H 106	YCbCr: Intensidade do vermelho: Mediana
H 41	LBP: Mediana	H 107	YCbCr: Intensidade do vermelho: Valor máximo
H 42	LBP: Valor máximo	H 108	YCbCr: Intensidade do vermelho: Variância
H 43	LBP: Variância	H 109	YIQ: Componente I: Cumes
H 44	LPQ: Cumes	H 110	YIQ: Componente I: Desvio padrão
H 45	LPQ: Desvio padrão	H 111	YIQ: Componente I: Entropia
H 46	LPQ: Entropia	H 112	YIQ: Componente I: Índice máximo
H 47	LPQ: Índice máximo	H 113	YIQ: Componente I: Média
H 48	LPQ: Índice mínimo	H 114	YIQ: Componente I: Mediana
H 49	LPQ: Média	H 115	YIQ: Componente I: Valor máximo
H 50	LPQ: Mediana	H 116	YIQ: Componente I: Variância
H 51	LPQ: Valor máximo	H 117	YIQ: Componente Q: Assimetria
H 52	LPQ: Variância	H 118	YIQ: Componente Q: Desvio padrão
H 53	Luminância: Cumes	H 119	YIQ: Componente Q: Entropia
H 54	Luminância: Desvio padrão	H 120	YIQ: Componente Q: Índice máximo
H 55	Luminância: Entropia	H 121	YIQ: Componente Q: Kurtosis
H 56	Luminância: Índice máximo	H 122	YIQ: Componente Q: Média
H 57	Luminância: Média	H 123	YIQ: Componente Q: Mediana
H 58	Luminância: Mediana	H 124	YIQ: Componente Q: Valor máximo
H 59	Luminância: Valor máximo	H 125	YIQ: Componente Q: Variância
H 60	Luminância: Variância	H 126	YIQ: Intensidade: Cumes
H 61	NDLPQ: Cumes	H 127	YIQ: Intensidade: Desvio padrão
H 62	NDLPQ: Desvio padrão	H 128	YIQ: Intensidade: Entropia
H 63	NDLPQ: Entropia	H 129	YIQ: Intensidade: Índice
H 64	NDLPQ: Índice máximo	H 130	YIQ: Intensidade: Média
H 65	NDLPQ: Índice mínimo	H 131	YIQ: Intensidade: Mediana
H 66	NDLPQ: Média	H 132	YIQ: Intensidade: Valor máximo
		H 133	YIQ: Intensidade: Variância

4.1.2.4. Análise multivariada

Para a quantificação de divergência genética foi estimada a matriz de dissimilaridade genética pela distância generalizada de Mahalanobis. A partir dessa matriz foi realizado o agrupamento das populações utilizando o método hierárquico da ligação média entre grupo (Unweighted Pair-Group Average – UPGMA). Foi estimada a importância relativa dos caracteres para a dissimilaridade pelo método do Singh. A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa Genes (Cruz et al., 2012).

Os descritores das variáveis (cor, geometria, textura e histograma) foram avaliados separadamente. Para cada uma dessas variáveis foi construído um dendograma. Após, foram selecionados 10% dos descritores que apresentaram as maiores contribuições relativas (Singh) para a diversidade genética entre as populações, e foi construído um dendograma com base nestes descritores e um outro dendograma com base em 20% dos descritores com as maiores contribuições relativas. Essa estratégia de avaliação, permitiu o uso de um número menor de variáveis, para a quantificação da diversidade genética entre os genótipos de *Passiflora* estudados.

Os dendogramas foram contruídos com base na matriz de distância de Mahalanobis e o método de agrupamento UPGMA.

Na construção dos dendogramas, para identificação das populações, foram utilizadas nomenclaturas. Para *P. edulis* foi utilizado (P.e), para *P. setacea* (P.s) e para as dez populações de *P. mucronata* foi utilizado (P.1); (P.2); (P.3); (P.4); (P.5); (P.6); (P.7); (P.8); (P.9) e (P.10).

4.1.2.5. Análise estatística

Os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância univariada. As médias foram agrupadas pelo teste F em nível de 1% de probabilidade.

4.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.3.1. Análise de variância

A análise de variância demonstrou resultados significativos em 1% de probabilidade pelo teste F, entre os genótipos, para todas as características avaliadas, indicando variabilidade genética entre os materiais avaliados. O coeficiente de variação (%) para característica cor, variou de 0,89 a 23,64, para geometria 0,29 a 176,10; para textura 0,54 a 13,53; para histograma 0,10 a 34,63. A alta variação no coeficiente de variação da geometria das sementes pode ser explicada devido à grande irregularidade na simetria das sementes dos genótipos estudados, causando instabilidade na mensuração das variáveis.

4.1.3.2. Contribuição dos caracteres para a diversidade genética por distância generalizada de Mahalanobis

Das 334 variáveis das sementes de *P. setacea*, *P. edulis* e *P. mucronata* avaliadas pelo equipamento Groundeye® System 88 foram descartadas por não haver variação. Assim, 246 variáveis foram analisadas, sendo 36 referentes a cor (Tabela 5), 46 a geometria (Tabela 6), 31 a textura (Tabela 7) e 133 a histogramas (Tabela 8).

A eliminação de descritores pode ser feita sem a perda de informação, visto que os mesmos podem estar relacionados a outras variáveis que permaneceram na análise (Pinto et al., 2010). Dessa forma, o restante das variáveis, que apresentaram as maiores contribuições fenotípicas, foi capaz de contribuir para a diversidade genética entre as populações de *Passiflora* spp.

A análise digital de imagens de sementes de 35 famílias de maracujazeiro azedo reduziu o número de descritores de sementes, selecionando cinco variáveis de cor, seis de textura e seis de geometria, e com apenas 17 descritores estimou a divergência genética entre as famílias (Ferreira et al., 2018).

Em diferentes genótipos de goiabeira (*Psidium guajava* L.), a análise da diversidade genética das sementes, por meio de 31 variáveis de cor, 40 de geometria e 21 de textura, teve como estratégia utilizar 10, 20 e 30% dos

descritores que mais contribuíram para a divergência genética, em que o número de grupos se manteve em todas as avaliações (Kruse et al., 2017). Estes resultados mostraram que mesmo com a utilização de nove descritores, foi possível quantificar a diversidade genética entre as famílias de goiabeira. Neste estudo as análises demonstraram que as variáveis relacionadas à geometria foram as que mais contribuíram para a diversidade genética. As informações oriundas da variável geometria das sementes, foram precisas e eficazes, pois auxiliaram na avaliação da variabilidade entre os genótipos em estudo (Torres, 2018).

Resultados contrastantes foram encontrados por Torres (2018), que caracterizando genótipos de cruzamentos entre populações segregantes de *P. edulis* x *P. setacea*, observou que a ferramenta Groundeye® não foi eficaz para a separação dos genótipos por meio de 37 variáveis relacionadas a cor, 41 a geometria e 29 a textura. Neste trabalho foi utilizado um maior número de variáveis de geometria nas análises, porém as que mais contribuíram para a divergência entre os genótipos foram as variáveis de textura.

Dentro da variável textura foram encontrados os descritores com as maiores contribuições fenotípicas, T.22 = 49,45% e T.25 = 48,06% (Tabela 7). As características baseadas nesses descritores, foram calculadas a partir de matrizes de co-ocorrências baseadas em sequências de tons de cinza para um certo comprimento. A T.22 se referiu ao comprimento de escala de cinza e o T.25 à distribuição de cinza no tegumento das sementes.

Tabela 5. Contribuição dos caracteres de cor para a diversidade genética por distância generalizada de Mahalanobis em *Passiflora* spp. Campos dos Goytacazes – RJ, 2019

Variável	Contribuição	Variável	Contribuição	Variável	Contribuição
C 01	4,55	C 13	0,25	C 25	0,17
C 02	5,84	C 14	1,65	C 26	0,16
C 03	6,44	C 15	1,01	C 27	0,29
C 04	0,22	C 16	5,12	C 28	0,2
C 05	1,22	C 17	0,86	C 29	0,27
C 06	3,98	C 18	4,43	C 30	2,13
C 07	2,92	C 19	6,11	C 31	1,32
C 08	2,37	C 20	6,46	C 32	2,8
C 09	5,95	C 21	5,84	C 33	5,07
C 10	0,94	C 22	1,93	C 34	0,93
C 11	9,2	C 23	1,2	C 35	0,85
C 12	5,84	C 24	0,56	C 36	0,74

Tabela 6. Contribuição dos caracteres de geometria para a diversidade genética por distância generalizada de Mahalanobis em *Passiflora* spp. Campos dos Goytacazes – RJ, 2019

Variável	Contribuição	Variável	Contribuição	Variável	Contribuição
G 01	2,75	G 16	0,44	G 31	0,71
G 02	3,77	G 17	0,87	G 32	2,81
G 03	0,82	G 18	0,03	G 33	1,77
G 04	0,93	G 19	0,71	G 34	1,47
G 05	1,24	G 20	0,02	G 35	1,57
G 06	1,95	G 21	0,04	G 36	2,75
G 07	0,32	G 22	0,81	G 37	11,45
G 08	0,37	G 23	0,13	G 38	10,43
G 09	0,44	G 24	0,006	G 39	0,08
G 10	1,35	G 25	0,01	G 40	2,01
G 11	3,34	G 26	1,29	G 41	0,15
G 12	6,41	G 27	0,19	G 42	4,03
G 13	9,44	G 28	3,75	G 43	5,6
G 14	5,04	G 29	5,87	G 44	0,68
G 15	0,33	G 30	0,38	G 45	0,72
				G 46	0,47

Tabela 7. Contribuição dos caracteres de textura para a diversidade genética por distância generalizada de Mahalanobis em *Passiflora* spp. Campos dos Goytacazes – RJ, 2019

Variável	Contribuição	Variável	Contribuição	Variável	Contribuição
T 01	0,0007	T 11	0,038	T 21	0,09
T 02	0,0007	T 12	0,0503	T 22	49,45
T 03	0,031	T 13	0,0113	T 23	0,01
T 04	0,0015	T 14	0,061	T 24	0,31
T 05	0,075	T 15	0,0051	T 25	48,06
T 06	0,0006	T 16	0,02	T 26	0,01
T 07	0,0078	T 17	0,03	T 27	0,003
T 08	0,0064	T 18	0,13	T 28	1,13
T 09	0,1122	T 19	0,14	T 29	0,006
T 10	0,0393	T 20	0,1	T 30	0,001
				T 31	0,004

Tabela 8. Contribuição dos caracteres de histograma para a diversidade genética por distância generalizada de Mahalanobis em *Passiflora* spp. Campos dos Goytacazes – RJ, 2019

Variável	Contribuição	Variável	Contribuição	Variável	Contribuição
H 01	0,06	H 45	0,0005	H 89	1,29
H 02	0,63	H 46	0,0001	H 90	1,22
H 03	0,02	H 47	0,01	H 91	0,92
H 04	0,12	H 48	0,03	H 92	0,0004
H 05	0,95	H 49	0,001	H 93	9,86
H 06	0,13	H 50	0,01	H 94	0,004
H 07	0,001	H 51	0,01	H 95	0,37
H 08	5,14	H 52	0,02	H 96	0,004
H 09	0,02	H 53	0,05	H 97	0,67
H 10	0,1	H 54	0,46	H 98	0,52
H 11	0,002	H 55	0,01	H 99	0,68
H 12	0,84	H 56	0,92	H 100	0,01
H 13	0,53	H 57	1,31	H 101	5,007
H 14	1,35	H 58	0,81	H 102	0,23
H 15	0,002	H 59	0,001	H 103	0,34
H 16	3,15	H 60	1,82	H 104	0,39
H 17	0,3	H 61	0,05	H 105	0,50
H 18	4,57	H 62	0,45	H 106	0,9
H 19	0,03	H 63	0,008	H 107	0,004
H 20	0,01	H 64	0,008	H 108	2,09
H 21	0,15	H 65	0,06	H 109	0,29
H 22	1,93	H 66	0,01	H 110	0,03
H 23	0,17	H 67	0,08	H 111	0,04
H 24	0,002	H 68	0,0004	H 112	2,01
H 25	6,21	H 69	0,15	H 113	0,69
H 26	0,31	H 70	0,043	H 114	1,1
H 27	0,59	H 71	0,11	H 115	0,01
H 28	0,04	H 72	0,36	H 116	7,48

Tabela 8, Cont.

H 29	1,1	H 73	1,07	H 117	0,007
H 30	0,0009	H 74	0,46	H 118	0,04
H 31	0,53	H 75	0,04	H 119	0,03
H 32	1,02	H 76	0,0003	H 120	0,40
H 33	0,01	H 77	4,57	H 121	0,001
H 34	1,35	H 78	0,05	H 122	0,18
H 35	0,001	H 79	0,21	H 123	0,02
H 36	0,22	H 80	0,01	H 124	0,02
H 37	0,002	H 81	0,56	H 125	0,01
H 38	0,13	H 82	0,66	H 126	0,009
H 39	0,01	H 83	0,51	H 127	0,78
H 40	0,28	H 84	0,002	H 128	0,006
H 41	0,18	H 85	8,1	H 129	1,39
H 42	0,002	H 86	0,02	H 130	0,27
H 43	0,31	H 87	0,28	H 131	0,26
H 44	0,37	H 88	0,006	H 132	0,0004
				H 133	4,62

Foram realizadas análises com 10% das variáveis que apresentaram as maiores contribuições relativas (Singh) para a diversidade genética em sementes de *P. setacea*, *P. edulis* e *P. mucronata*. Foram avaliadas 25 variáveis, sendo quatro referentes a cor, cinco referentes a geometria, três referentes a textura e 13 referentes a histograma (Tabela 9). Os valores de contribuição relativa dos caracteres para a diversidade, variaram entre 6,11 a 9,20% para cor, 5,87 a 11,45 para geometria, 1,39 a 9,86% para histograma.

Nas análises com 20% das variáveis com as maiores contribuições relativas, foram avaliadas 48 variáveis, sendo oito referente a cor, nove referentes a geometria, seis referentes a textura e 25 referentes a histograma. Foram obtidos valores de contribuição relativa dos caracteres para a diversidade, variando entre 5,84 a 9,20% para cor, 3,77 a 11,45% para geometria, 0,13 a 49,45% para textura e 0,96 a 9,86% para histograma (Tabela 10).

Dos 48 descritores encontrados nas análises de 20% de contribuição para a diversidade genética em *Passiflora*, o descritor de cor C.03 e geometria G.29, já haviam sido mensurados por Ferreira et al., (2018) como duas das 17 variáveis que mais contribuíram para a diversidade genética em 35 famílias de maracujazeiro azedo. Nas análises de 10% o único descritor comum foi C.03.

Tabela 9. 10% do total dos caracteres que mais contribuem para a diversidade genética em *Passiflora* spp. Campos dos Goytacazes – RJ, 2019

Código	Contribuição	Código	Contribuição	Código	Contribuição
C 03	6,44	G 38	10,43	H 77	4,57
C 11	9,20	T 22	49,45	H 85	8,10
C 19	6,11	T 25	48,06	H 93	9,86
C 20	6,46	T 28	1,13	H 101	5,00
G 12	6,41	H 08	5,14	H 108	2,09
G 13	9,44	H 16	3,15	H 112	2,01
G 29	5,87	H 18	4,57	H 116	7,48
G 37	11,45	H 25	6,21	H 129	1,39
				H 133	4,62

Tabela 10. 20% do total dos caracteres que mais contribuíram para a diversidade genética por distância generalizada de Mahalanobis em *Passiflora* spp. Campos dos Goytacazes – RJ, 2019

Código	Contribuição	Código	Contribuição	Código	Contribuição
C 02	5,84	G 43	5,6	H 34	1,35
C 03	6,44	T 18	0,13	H 56	0,96
C 09	5,95	T 19	0,14	H 57	1,31
C 11	9,20	T 22	49,45	H 60	1,82
C 12	5,84	T 24	0,31	H 73	1,07
C 19	6,11	T 25	48,06	H 77	4,57
C 20	6,46	T 28	1,13	H 85	8,10
C 21	5,84	H 05	0,95	H 89	1,29
G 02	3,77	H 08	5,14	H 93	9,86
G 12	6,41	H 14	1,35	H 101	5,00
G 13	9,44	H 16	3,15	H 108	2,09
G 14	5,04	H 18	4,57	H 112	2,01
G 29	5,87	H 22	1,93	H 114	1,10
G 37	11,45	H 25	6,21	H 116	7,48
G 38	10,43	H 29	1,10	H 129	1,39
G 42	4,03	H 32	1,02	H 133	4,62

4.1.3.3. Diversidade genética

Foram formados quatro grupos para todas as variáveis de descritores de sementes obtidas por meio de análise digital de imagens. O número de populações por grupo variou de acordo com as variáveis analisadas (cor, geometria, histograma e textura).

Para a variável cor, quatro grupos foram formados e verificou-se, que as espécies *P. edulis* e *P. setacea* se separaram. *P. setacea* apresentou característica de cor próxima das populações P.4 e P.1. A população P.10

melhorada pela Embrapa, ficou isolada de todas as populações, sendo um possível indicativo de que a cor da semente é uma característica que se divergiu entre a população melhorada e as populações silvestres (Figura 4).

A diferença existente na coloração do tegumento da população melhorada e as populações silvestres de *P. mucronata*, pode estar associada à perda de material genético dessas populações. Fatores como o isolamento do habitat, distúrbios no ambiente e desastres naturais como seca e enchentes, podem levar ao desaparecimento de algumas características em função da perda da variabilidade genética (Ferreira, 2005).

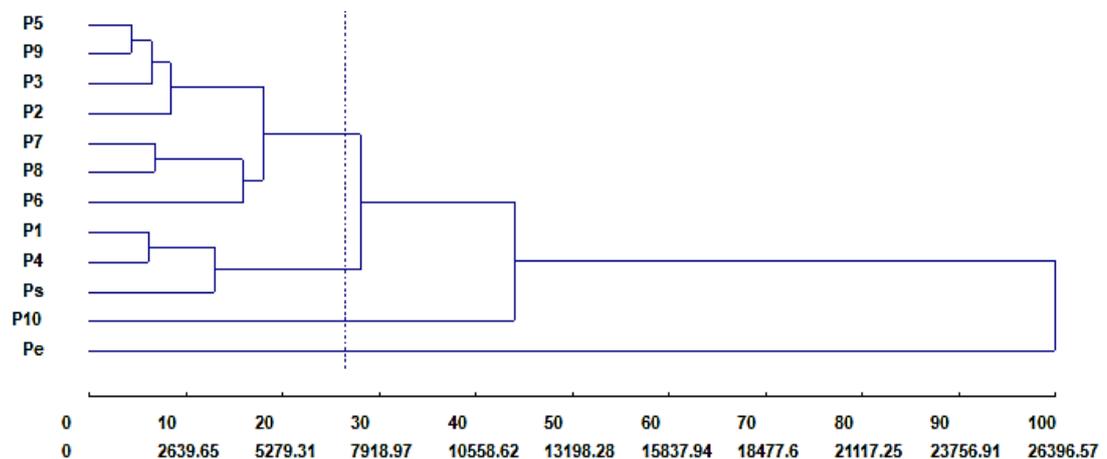


Figura 4. Dendrograma de dissimilaridade genética em espécies de *Passifora*, da variável cor, com base em descritores de sementes, utilizando a distância generalizada de Mahalanobis, com o método UPGMA.

Quando analisada a geometria das sementes, o número de grupos se manteve, modificando-se a formação dos grupos. Apenas a população P.2 se separou das demais populações silvestres, apresentando características geométricas iguais à população 10 da Embrapa. As espécies *P. setacea* e *P. edulis* se mantiveram isoladas entre si e entre as demais (Figura 5). Esses resultados demonstraram, que as populações de *P. setacea* e *P. edulis* analisadas neste trabalho apresentam variabilidade genética para a característica de geometria das sementes.

Além de diferenças entre as sementes, estudos indicaram que as espécies *P. setacea* e *P. edulis* apresentam traços morfoagronômicos que diferem uma espécie da outra. Santos et al., (2014) avaliaram a diversidade genética em 10

genótipos de *P. edulis*, 10 genótipos de *P. setacea* e 118 híbridos. Seus resultados indicaram a formação de três grupos homogêneos. O primeiro grupo com os 10 genótipos de *P.edulis*, o segundo com 10 genótipos de *P.setacea* e o terceiro grupo com os 118 híbridos.

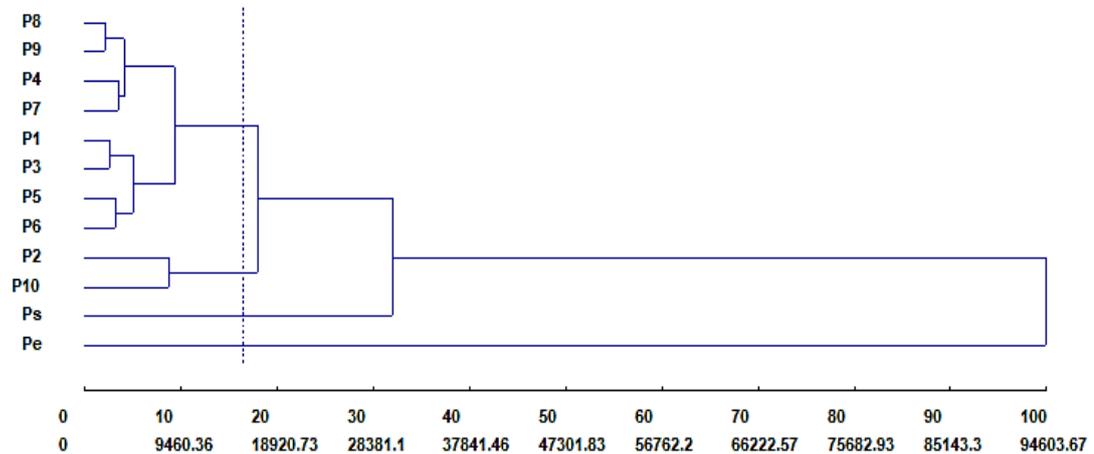


Figura 5. Dendrograma de dissimilaridade genética em espécies de *Passifora*, da variável geometria, com base em descritores de sementes, utilizando a distância generalizada de Mahalanobis, com o método UPGMA.

Assim como para a geometria das sementes, a população P.2 apresentou textura diferente das outras populações silvestres de *P. mucronata*, o que a manteve sozinha dentro de um grupo. Essa característica de textura das sementes foi a que possibilitou o agrupamento da população P.10 a um número maior de populações da mesma espécie (Figura 6).

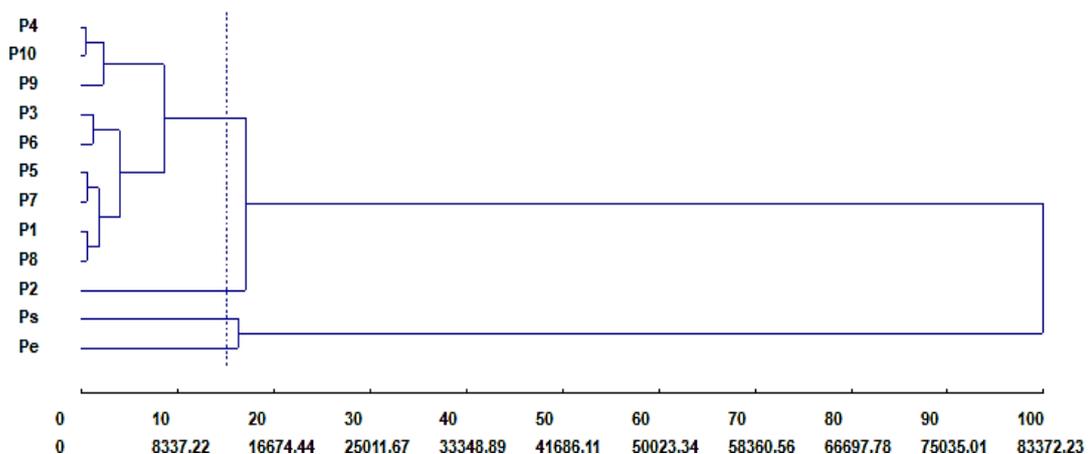


Figura 6. Dendrograma de dissimilaridade genética em espécies de *Passifora*, da variável textura, com base em descritores de sementes, utilizando a distância generalizada de Mahalanobis, com o método UPGMA.

Os histogramas formaram um conjunto de dados calculados com base nas características de cor, textura e geometria das sementes. Foi observada uma maior precisão nos resultados apresentados por esta variável de histograma. O dendograma formado a partir dos descritores do histograma, foi o que mais representou os dados das observações fenotípicas das sementes percebidas visualmente. As características contrastantes observadas nas sementes das populações de *P. mucronata* silvestre e melhorada, de *P. edulis* e *P. setacea*, foram confirmadas por meio da análise no equipamento Groundeye® System.

Dos quatro grupos formados, as populações silvestres de *P. mucronata* ficaram em um mesmo grupo, se mantendo próximas, porém separadas da população P.10 melhorada pela Embrapa. As espécies de *P. setacea* e *P. edulis* se mantiveram isoladas entre si e entre as demais (Figura 7).

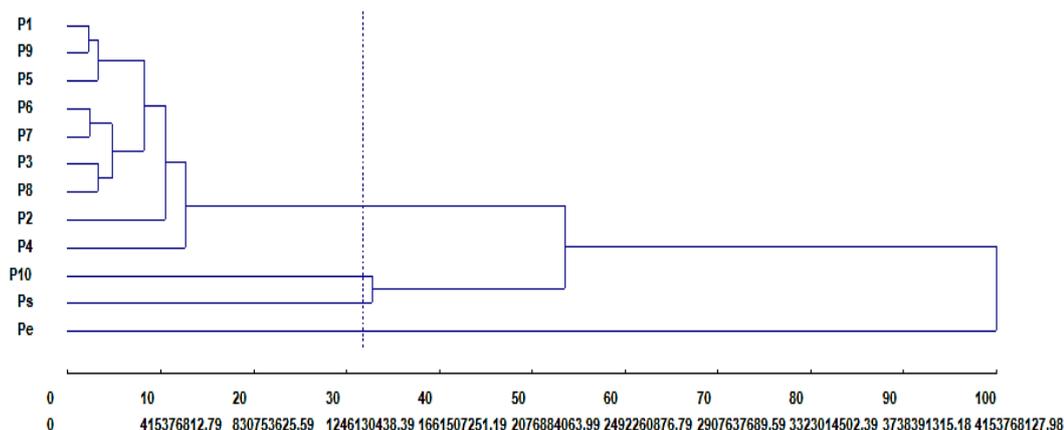


Figura 7. Dendograma de dissimilaridade genética em espécies de *Passiflora*, da variável histograma, com base em descritores de sementes, utilizando a distância generalizada de Mahalanobis, com o método UPGMA.

Ao utilizar 10% das variáveis que mais contribuiriam para a diversidade genética, formaram-se três grupos (Figura 8). Verificou-se que não houve separação entre as espécies de *P. setacea* e *P. edulis*, e que os genótipos silvestres de *P. mucronata* se mantiveram isolados, com exceção da população P.2.

A população P.2 de *P. mucronata* permaneceu em um mesmo agrupamento que a população P.10. Este resultado já havia sido observado quando a variável geometria das sementes foi analisada.

Como as espécies de *P. setacea* e *P. edulis* apresentam características fenotipicamente contrastantes e não se separaram, foi utilizado um novo critério

para a construção do dendograma, com base em 20% dos descritores que mais contribuíram para a diversidade fenotípica entre as populações.

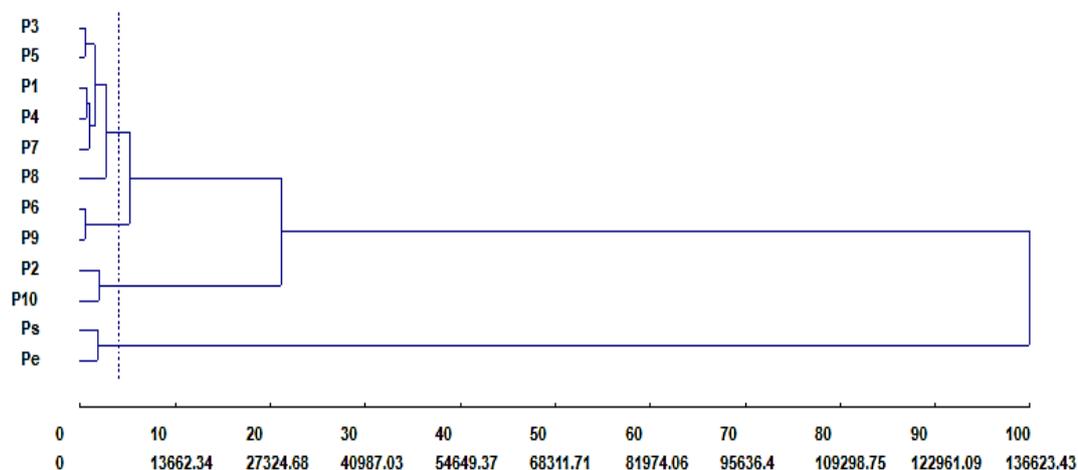


Figura 8. Dendograma UPGMA de dissimilaridade genética de 10% das variáveis, entre doze populações de *Passiflora* spp.

Na avaliação em que foram utilizados 20% dos descritores que mais contribuíram para a divergência genética em *Passiflora* o dendograma apresentou a formação de quatro grupos. Os grupos formados pelas populações de *Passiflora*, foram similares com os encontrados para o dendograma formado a partir das variáveis de histograma.

Um primeiro grupo foi formado pelas nove populações silvestres de *P. mucronata*, o segundo pela população de *P. mucronata* melhorada pela Embrapa, o terceiro por *P. edulis* e o quarto por *P. setacea*. Assim como para a variável histograma, nesse dendograma, foi observada a separação das populações que apresentam características fenotípicas visualmente contrastantes (Figura 8).

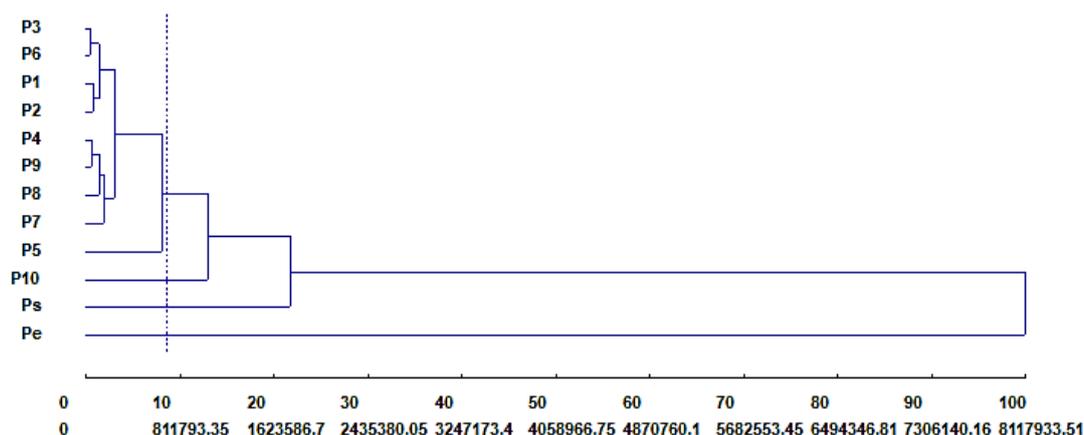


Figura 9. Dendrograma UPGMA de dissimilaridade genética de 20% da variável histograma entre doze populações de *Passiflora* spp.

Quando a estratégia de avaliação foi utilizar 10% dos caracteres que mais contribuíram para a diversidade genética entre as populações, houve a formação de três grupos. As espécies *P. setacea* e *P. edulis* ficaram em um mesmo grupo, não havendo separação de duas espécies visualmente distintas. Foi o que Torres (2018) encontrou ao utilizar o Groundeye® para a avaliação da diversidade genética em *Passiflora*. Os resultados obtidos não separaram *P. setacea* de *P. edulis*, espécies visualmente contrastantes, com isso, sugeri que fossem feitos testes de germinação das espécies junto das avaliações do Groundeye®, a fim de realizar uma comparação com mais eficácia para a avaliação da divergência genética.

Ao analisar de forma separada os dendogramas das variáveis cor, geometria, textura e histograma, foi possível observar a existência de diversidade genética entre as populações. Das dez populações de *P. mucronata*, a população P.10 melhorada pela Embrapa, permaneceu isolada das demais populações para a variável cor e o conjunto de dados de histograma. Essa diferença na coloração entre as populações de *P. mucronata*, demonstra a importância da análise digital, pois diferencia a população melhorada das demais populações silvestres da mesma espécie.

Em uma análise visual, a avaliação da cor das sementes levaria a resultados que não poderiam ser totalmente confiáveis, visto que dependeriam de uma avaliação criteriosa e homogênea do avaliador. Entretanto, com a análise de imagens digitais obtidas via Groundeye®, a medição da cor das sementes se tornou precisa e eficiente, o que facilitou a utilização dessa variável na

quantificação da diversidade genética entre as populações melhoradas e as silvestres.

Em sementes de 18 famílias de goiabeiras (*P. guajava*) verificou-se 49 variáveis relacionadas a cor, 44 a geometria e 43 a textura e confirmou a eficiência do equipamento Groundeye® na quantificação da diversidade genética entre os genótipos de famílias de goiabeira (Krause et al., 2017).

Em sementes de 35 famílias de irmãos completos de maracujazeiro azedo, foram selecionados cinco descritores de cor, seis de geometria e seis de textura, o que demonstrou que a análise digital de imagens é uma ferramenta viável e eficiente na mensuração de descritores (Ferreira et al., 2018).

Os resultados desse trabalho mostram que o equipamento Groundeye® pode ser recomendado para o estudo da diversidade genética em *Passiflora*.

4.1.4. CONCLUSÕES

- O uso dos descritores de sementes obtidos por meio de análise digital utilizando o Sistema Groundeye® foi eficiente para a quantificação da divergência genética em populações de *Passiflora* spp.;
- Na “super”característica histograma, houve um maior número de descritores capazes de contribuir significativamente para a diversidade genética em populações de *Passiflora* spp.;
- Com apenas 10 e 20% das variáveis obtidas por meio da análise digital de sementes é possível explorar a diversidade genética entre as populações de *Passiflora* spp.;
- Utilizando 20% das variáveis obtêm-se resultados mais precisos na análise de diversidade genética em populações de *Passiflora* spp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, D. B., Oliveira, A. S., Pinto, C. A. G., Pires, R. M. O., Oliveira, A. S., Silva, M. A., Carvalho, M. L. M. (2016) Detection of green seeds in soybean lots by the seed analysis system (SAS). *International Journal of Current Research*. 8 (2):26462-26465.
- Cardoso, D. L., Silva, R. F., Pereira, M. G., Viana, A.P., Araújo, E. F. (2009) Diversidade genética e parâmetros genéticos relacionados à qualidade fisiológica de sementes em germoplasma de mamoeiro. *Revista Ceres*. 56:5- 572.
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J., Carneiro, P. C. S. (2004) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 3. ed. Viçosa: UFV, 480p.
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J., Carneiro, P. C. S. (2012) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV, 514p.
- Ferreira, A. F. N., Krause, W., Faleiro, A. C., Miranda, A. F., Acha, A. J (2018) Seleção de descritores de sementes de Macarujazeiro azedo utilizado fenotipagem digital. *Agrarian Academy*. 5:181-190.
- Ferreira, F. R. (2005) Recursos genéticos de Passiflora. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético, *Embrapa Cerrados*, Planatina, DF, 41-50.
- Fiorani, F., Schurr, U. (2013) Future scenarios for plant phenotyping. *Annual Review of Plant Biology*, 64:267-91.
- Franca, J. M., Venial, L. R., Costa, E. B., Schmildt, E. R., Schmildt, Bernardes, P. M., Alexandre, R. S. (2018) Morphophysiology, Phenotypic and Molecular Diversity of Auxin-induced *Passiflora mucronata* Lam. (Passifloraceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90 (2):1799-1814.
- Godoy, R. C. B., Ledo, C. A. D. S., Santos, A. P., Matos, E. L. S., Lima, A. D. A., Waszczyński, N. (2015) Diversidade genética entre acessos de maracujazeiro amarelo avaliada pelas características físico-químicas dos frutos. *Ceres*, 54 (316):541-547.
- Guimarães Silva, D. F., de Jesus Coelho, C., Romanek, C., Gardingo, J. R., da Silva, A. R., Graczyki, B. L., Rodrigues M. R. (2016) Dissimilaridade

- genética e definição de grupos de recombinação em progênies de meios-irmãos de milho-verde. *Bragantia*, 75 (4):401-410.
- Gustin, J. L., Settles, A. M. (2015) Seed phenomics. In: Fritsche-Neto, R. Borém, A. Phenomics: How Next-Generation Phenotyping is Revolutionizing Plant Breeding. Viçosa, 1:65-79.
- Junqueira, N. T. V., Braga, M. F., Faleiro, F. G., Peixoto, J. R., Bernacci, L. C. (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. *Embrapa Cerrados*, Planaltina, DF, 81-108.
- Krause, W., Viana, A. P., Cavalcante, N. R., Ambrósio, M., Santos, E. A., Vieira, H. D. (2017) Digital phenotyping for quantification of genetic diversity in inbred guava (*Psidium guajava*) families. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 16 (1):1-12.
- Pessanha, P. D. O., Viana, A. P., Junior, A. T. A., Souza, R. D., Teixeira, M. C., Pereira, M. G. (2011) Avaliação da Diversidade Genética em Acessos de *Psidium* ssp. Via marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33 (1):129-136.
- Pinto, J. F. N., Reis, E. F., Faleiro, F. G., Barbosa, E. C. C., Nunes, H. F., Pinto, J. F. N. (2010) Seleção de descritores vegetativos para caracterização de acessos de guariroba (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32 (3):832-840.
- Santos, E. A., Viana, A. P., Freitas, J. C. O., Souza, M. M., Paiva, C. L., Rodrigues, D.L., Tavares, R. F. (2014) Phenotyping of *Passiflora edulis*, *P. setacea*, and their hybrids by a multivariate approach. *Genetics and Molecular Research*, 13 (4):828-984.
- Torres, G. X. (2018) Diversidade genética em população segregante de *Passiflora* via características de sementes. Tese (Mestrado em Produção vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 70p.

4.2. GERMINAÇÃO *IN VITRO* E *EX VITRO* DE SEMENTES RECÉM-COLHIDAS E ARMAZENADAS DE DEZ POPULAÇÕES DE *Passiflora mucronata*

RESUMO

A espécie *P. mucronata* produz sementes com alta viabilidade inicial, mas que perdem o potencial germinativo com o passar do tempo, podendo chegar a zero após quatro meses de armazenamento. A dormência em sementes de maracujazeiro azedo ocorre não somente na presença do tegumento, mas também no endosperma das sementes. Diante deste quadro, o objetivo do trabalho foi analisar a porcentagem de germinação e vigor *in vitro* e *ex vitro* em sementes recém-colhidas e armazenadas de diferentes populações de *P. mucronata*. O material vegetal utilizado foi constituído por dez populações de *P. mucronata*. Um dos materiais foi oriundo do banco de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas-BA, as demais sementes foram obtidas a partir de frutos coletados de nove populações distintas de *P. mucronata* estabelecidas em campo no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre-ES. Os testes de germinação e vigor foram conduzidos com sementes de dez populações de *P. mucronata* recém-colhidas e após o armazenamento por um período de doze meses. O experimento *ex vitro* foi conduzido em DIC, com quatro repetições de 50 sementes para cada população de *P. mucronata*. As sementes foram

transferidas para câmara do tipo B.O.D. com temperatura de 20 °C (noite) e 30 °C (dia) e fotoperíodo de 8:16 horas, escuro/luz, respectivamente. O experimento *in vitro* foi realizado em DIC, em esquema fatorial 3x10, sendo testada a germinação de sementes intactas, de sementes sem tegumentos e de embriões isolados das dez populações, com seis repetições. Ao 12^o mês de armazenamento, as sementes de *P. mucronata* foram submetidas aos mesmos testes quando recém-colhidas, em B.O.D. e *in vitro*. Após 28 dias de cultivo, foram consideradas germinadas as plântulas que apresentaram raiz e parte aérea expandidas. O índice de velocidade de germinação foi avaliado diariamente observando o número de sementes emitindo a raiz primária. O maior percentual de germinação foi a partir de embrião isolado em condições *in vitro*. Após 12 meses de armazenamento não houve germinação *ex vitro* de sementes de *P. mucronata* e houve redução no percentual de germinação *in vitro* tanto para semente sem tegumento, quanto para embrião isolado.

ABSTRACT

The species *P. mucronata* produces seeds with high initial viability but loses germination potential with the passage of time, reaching zero after four months of storage. The dormancy of passion fruit seeds occurs not only in the presence of the integument but also in the endosperm of the seeds. The objective of this study was to analyze the percentage of germination and vigor *in vitro* and *ex vitro* in freshly harvested and stored seeds of different populations of *P. mucronata*. The plant material used consisted of ten populations of *P. mucronata*. One of the materials came from the Embrapa Mandioca and Fruticulture germplasm bank in Cruz das Almas-BA, the other seeds were obtained from fruits collected from nine distinct populations of *P. mucronata* established in the field at the Center of Agrarian Sciences and Engineering of the Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), in Alegre-ES. The germination and vigor tests were carried out with seeds of ten populations of *P. mucronata* freshly harvested and after storage for a period of twelve months. The *ex vitro* experiment was conducted in DIC, with four replicates of 50 seeds for each *P. mucronata* population. The seeds were

transferred to the B-type chamber with temperature of 20 ° C (night) and 30 ° C (day) and photoperiod of 8:16 hours, dark / light respectively. The *in vitro* experiment was performed in DIC in a 3x10 factorial scheme, and the germination of intact seeds, seed without teguments and embryos isolated from the ten populations were tested with six replicates. At the 12th month of storage, *P. mucronata* seeds were submitted to the same tests when freshly harvested, in B.O.D. and *in vitro*. After 28 days of cultivation, seedlings with expanded root and aerial part were considered germinated. The rate of germination was evaluated daily by observing the number of seeds emitting the primary root. The highest percentage of germination was from embryo isolated under *in vitro* conditions. After 12 months of storage there was no ex vitro germination of *P. mucronata* seeds and there was a reduction in the percentage of *in vitro* germination both for seed without tegument and for isolated embryo.

4.2.1. INTRODUÇÃO

Os germoplasmas silvestres do gênero *Passiflora* são importantíssimos para utilização em programas de melhoramento genético vegetal, pois, a partir de estudos, podem ser encontradas características agronomicamente interessantes. A espécie *P. mucronata* é descrita como resistente à fusariose e à bacteriose nas folhas, antracnose nos frutos e ramos (Junqueira et al., 2005). Tais características, que são de extrema importância no âmbito agrônomo, representam um potencial uso desta espécie como porta-enxerto e em cruzamentos interespecíficos com *P. edulis*, como medida para minimizar os efeitos do ataque de pragas e doenças que comprometem e ameaçam a produtividade dos maracujazeiros (Fischer et al., 2005; Junqueira et al., 2005; Paula et al., 2010).

São poucos os relatos na literatura que descrevem a biologia reprodutiva desta espécie. Segundo Santos et al. (2012), a espécie *P. mucronata* produz sementes com alta viabilidade inicial, mas que perde o potencial germinativo com o passar do tempo, podendo chegar a zero após quatro meses de armazenamento.

Além da perda do potencial germinativo, as sementes de algumas espécies de *Passiflora* possuem dormência, devido à presença de inibidores químicos no endosperma das sementes e rigidez do tegumento, o que conseqüentemente ocasiona uma germinação baixa e desuniforme, com grande número de plântulas anormais quando cultivadas *in vitro*. Dessa forma, é possível que o cultivo de embriões *in vitro* seja capaz de superar estes tipos de dormência pela remoção do tegumento e de inibidores de germinação presentes no endosperma das sementes (Generoso et al., 2018; Walter et al., 2018). No entanto, não há dados na literatura que descrevam o comportamento *in vitro* de *P. mucronata*, assim como o potencial germinativo das sementes, quando armazenadas e quando germinadas *in vitro*.

Diante desse quadro, o estabelecimento de um protocolo eficiente para a germinação *in vitro* de *P. mucronata*, a partir da seleção de um explante (semente intacta, semente sem tegumento ou embrião isolado), pode representar uma alternativa viável para a conservação de genótipos com características superiores, que possam ser introduzidos em programas de melhoramento genético, assim como serem utilizados como porta-enxerto e, ou em cruzamentos interespecíficos com espécies de interesse comercial.

4.2.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.2.1. Caracterização do local

A pesquisa foi realizada de novembro de 2017 a dezembro de 2018, no Setor de Horticultura, do Laboratório de Fitotecnia (LFIT), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

4.2.2.2. Material vegetal

O material vegetal utilizado foi constituído por dez populações de *P. mucronata*. Um dos materiais foi oriundo do banco de germoplasma da Embrapa

Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas-BA, consistindo em um lote com aproximadamente 500 sementes. As demais sementes foram obtidas a partir de frutos coletados de nove populações distintas de *P. mucronata* estabelecidas em campo no Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAEE) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre-ES. Os frutos foram abertos para a retirada das sementes. As sementes foram então friccionadas em peneira de malha de aço, em água corrente, até a remoção do arilo. Em seguida, foram secas à temperatura ambiente por 96 horas. As sementes oriundas da Embrapa, também obtidas de frutos recém-colhidos, foram armazenadas pelo período de três dias em sacos de papel Kraft na geladeira a 4 °C. O período de armazenamento consistiu em aguardar até que as sementes das populações silvestres de *P. mucronata* estivessem completamente secas para serem utilizadas nos experimentos de germinação. No primeiro experimento, foi avaliada a germinação *ex vitro* e *in vitro* de sementes recém-colhidas de *P. mucronata*. Ao 12º mês de armazenamento, as sementes de *P. mucronata* foram submetidas aos mesmos testes *ex vitro* e *in vitro*.

4.2.2.2.1. Germinação *ex vitro* de sementes de *P. mucronata*

Os testes de germinação e de vigor foram conduzidos com sementes de dez populações de *P. mucronata* recém-colhidas e após doze meses de armazenamento, a fim de verificar sua qualidade fisiológica, de acordo com as Regras para Análise de Sementes (RAS) (Brasil, 2009).

O teste de germinação foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes para cada uma das dez populações de *P. mucronata*. Cada repetição foi colocada em um rolo de papel para germinação de sementes, umedecido em água destilada na proporção de duas vezes e meia da massa do papel (Brasil, 2009). As sementes foram transferidas para câmara do tipo B.O.D. com temperatura de 20 °C (noite) e 30 °C (dia) e fotoperíodo de 8:16 horas, escuro/luz, respectivamente. O índice de velocidade de germinação foi avaliado diariamente (Maguire, 1962), observando o número de sementes emitindo a raiz primária. Aos 28 dias, foi realizada a contagem final da germinação de plântulas normais, de plântulas anormais, da protrusão da raiz primária e de sementes não germinadas

(sementes mortas e sementes duras). Os resultados foram expressos em porcentagem de germinação.

4.2.2.2.2. Estabelecimento *in vitro* de *P. mucronata*

4.2.2.2.2.1. Desinfestação das sementes de *P. mucronata*

A desinfestação foi feita em sementes com tegumento e em sementes sem tegumento de *P. mucronata*. Os tegumentos foram retirados com o auxílio de uma minimorsa, antes da desinfestação. Em câmara de fluxo laminar as sementes dos dois tratamentos (sementes com tegumento e sementes sem tegumento), foram mergulhadas em álcool 70% por 30 segundos e imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5%, com 2 gotas de Tween 20 em 80 mL da solução por 15 minutos, enxaguadas três vezes em água desionizada e autoclavada.

4.2.2.2.2.2. Germinação *in vitro* de *P. mucronata*

O experimento de germinação *in vitro* foi conduzido com sementes das dez populações de *P. mucronata* recém-colhidas e após 12 meses de armazenamento. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3x10, sendo testada a germinação de sementes intactas, de sementes sem tegumentos e de embriões isolados (Figura 1) das dez populações, com seis repetições. Cada repetição foi constituída por um frasco (125mm x 60mm) com 40 mL de meio contendo seis explantes.

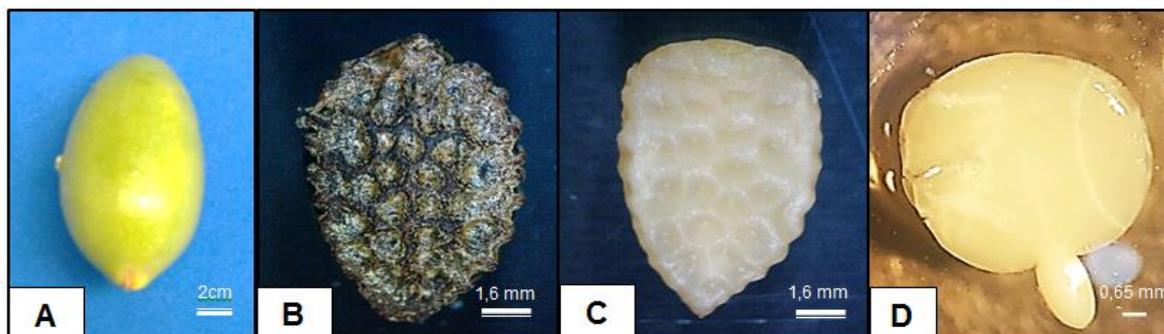


Figura 1: *Passiflora mucronata*: (A) Fruto maduro recém-colhido de *P. mucronata* (B) Semente com tegumento; (C) Semente sem tegumento; (D) Embrião isolado.

Após a desinfestação, parte das sementes sem tegumento foi deixada em água desionizada estéril em ambiente asséptico por 12 h para a embebição e posterior retirada dos embriões. Em câmara de fluxo laminar, os embriões foram isolados com o auxílio de um microscópio estereoscópico, pinça e bisturi. As sementes intactas, as sementes sem tegumento e os embriões isolados foram transferidos para frascos (125mm x 60mm) com 40 mL de meio de cultura.

O meio de cultura foi composto por sais minerais do meio MSM (Monteiro et al., 2000), 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,10 g L⁻¹ de mio-inositol, acrescido de vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), pH do meio ajustado para 5,7±0,1, em seguida solidificado com 7,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Vetec®) e autoclavado por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm de pressão.

Os frascos foram mantidos no escuro por 10 dias, em temperatura de 27±2 °C, para a germinação. Depois foram transferidos para a luz por mais 18 dias com fotoperíodo 16:8 (luz:escuro), fornecido por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹. Os explantes foram avaliados diariamente durante 28 dias, para verificar a emissão da raiz primária.

Após 28 dias de cultivo *in vitro*, foram consideradas germinadas as plântulas que apresentaram raiz e parte aérea expandidas.

4.2.3.3. Aclimatização

Após 28 dias de cultivo *in vitro*, as plântulas das dez populações de *P. mucronata*, foram aclimatizadas em bandejas plásticas de 30 células e capacidade de 300 mL. Após 30 dias em bandejas plásticas, as plântulas das dez populações de *P. mucronata*, foram transferidas para vasos individuais, com capacidade de 150 mL. O substrato utilizado foi o Basaplant® Hortaliças. Todas as populações foram mantidas em condições de casa de vegetação.

A irrigação foi por meio de microaspersão, duas vezes ao dia, às 7h00min e 18h00min, com duração de 10 minutos cada. A casa de vegetação estava coberta com plástico agrícola transparente difusor, malha de 150 µm e tela de sombreamento de 35%, localizada na Unidade de Apoio à Pesquisa (UAP), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da UENF.

4.2.3.4. Germinação *ex vitro* e *in vitro* de sementes armazenadas de *P. mucronata*

Após os testes de germinação *in vitro* e *ex vitro* das sementes recém-colhidas de *P. mucronata*, estas foram armazenadas em sacos de papel Kraft na geladeira a 4 °C pelo período de um ano.

Os experimentos foram conduzidos ao 12º mês de armazenamento das sementes, conforme metodologias descritas anteriormente para as sementes recém-colhidas.

4.2.3.5. Análise estatística

As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk, aquelas que não apresentaram normalidade passaram pela transformação de dados realizada por meio da expressão $\sqrt{x} + 1,0$ ou $\sqrt{x} + 0,5$.

Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativos, foi aplicado o teste de Tukey ($P < 0,05$) com o auxílio do programa estatístico Sisvar® (Statistical Analysis System, versão 5.6). (Ferreira, 2011).

4.2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.4.1. Germinação *ex vitro* de sementes de *Passiflora mucronata* recém-colhidas

Na germinação *ex vitro* de sementes intactas de *P. mucronata*, a análise de variância mostrou diferença significativa para a germinação, para plântulas anormais, para a protrusão da raiz primária, para sementes duras e sementes mortas (Tabela 1).

Tabela 1. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para a germinação, plântulas anormais, protrusão da raiz primária, semente dura e semente mole, de sementes recém-colhidas de *P. mucronata*, após 28 dias em cultivo *ex vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2019

Fonte de variação	GL	Quadrado médio		
		Germinação	P. anormais	Protrusão da raiz
Populações (P)	9	4,29*	1,72*	1,11*
Resíduo	30	0,10	0,17	0,14
Média geral		1,64	1,5	1,72
C.V. (%)		19,93	28,06	22,4

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Semente dura	Semente mole
Populações (P)	9	5,20*	2,81*
Resíduo	30	0,33	0,17
Média geral		2,57	6,02
C.V. (%)		22,46	6,85

*Significativo pelo teste F em 5% de probabilidade. Dados transformados $\sqrt{x} + 1,0$.

Quando colocadas para germinar em câmara B.O.D. as sementes intactas das dez populações de *P. mucronata* apresentaram uma reduzida taxa de germinação. As maiores germinações foram para as populações P.1, P.5 e P.7 (Tabela 2). A germinação dessas populações ficou abaixo de 30%. O maior índice germinativo foi observado para a população P.1 (30%). Ao observar a protrusão da raiz primária das populações de *P. mucronata*, as populações P.1, P.2, P.5 e P.7, apresentaram as maiores porcentagens de emissão da raiz primária aos 28 dias, 8,0, 9,5, 12,0 e 6,0%, respectivamente. O número de sementes mortas variou entre as populações de 43,5 a 97,5%, sendo mais intensa nas populações P.2, P.3, P.4, P.6, P.7 e P.10.

Tabela 2. Porcentagem de germinação, de plântulas anormais, protrusão da raiz primária, sementes duras e sementes mortas de *P. mucronata*, após 28 dias de cultivo *ex vitro*. Campos dos Goytacazes-RJ, 2019

Populações	Germinação	P. A	P.R	S.N.G	
				S.D	S.M
P.1	30,00 a	5,00 bc	8,00 abc	13,50 bc	43,50 c
P.2	0,00 d	2,00 c	9,50 ab	15,00 abc	73,50 ab
P.3	0,00 d	0,50 c	2,00 cd	3,50 cd	94,00 a
P.4	0,00 d	0,00 c	1,50 cd	7,00 bcd	91,50 a
P.5	15,00 b	15,00 a	12,00 a	14,50 bc	43,50 c
P.6	0,00 d	0,00 c	2,50 bcd	0,00 d	97,50 a
P.7	7,50 bc	10,50 ab	6,00 abc	0,50 d	75,50 ab
P.8	0,5 d	0,50 c	2,50 bcd	34,00 a	62,50 bc
P.9	2,00 cd	1,00 c	2,50 bcd	34,00 a	60,50 bc
P.10	0,00 d	1,00 c	0,00 e	19,50 ab	79,50 ab
C.V (%)	62,46	97,72	22,40	52,49	12,23

Populações= Populações de *P. mucronata*. **Germinação**= Porcentagem de germinação. **P.A**= Porcentagem de plântulas anormais. **PR**= Porcentagem de sementes com protrusão da raiz primária. **SD**= Porcentagem de sementes duras. **SM**= Porcentagem de sementes moles. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O número de sementes não germinadas foi superior a sementes germinadas em todas as populações de *P. mucronata*. Estes resultados corroboram com os encontrados por Meleti et al., (2011), que trabalhando com *P. mucronata*, obtiveram germinação de no máximo 15%. Embora estes resultados confirmem a dificuldade na germinação de sementes de *P. mucronata*, Santos et al., (2012) trabalhando com sementes de frutos recém-colhidos, provenientes de polinização natural, alcançaram um alto índice de germinação, chegando a 79,54% de sementes germinadas em câmara do tipo B.O.D.

Alguns trabalhos ressaltam que as espécies do gênero *Passiflora* possuem dormência em suas sementes, o que pode estar associado a fatores físicos, devido à impermeabilidade do tegumento a água e a gases, químicos devido à presença de substâncias inibidoras e mecânicos devido à resistência do tegumento ao crescimento embrionário (Ellis et al., 1985; Fowler e Bianchetti, 2000). Os resultados da germinação *ex vitro* das populações de *P. mucronata*, evidenciaram a grande diferença na germinação dentro de uma mesma espécie, demonstrando que diferentes populações respondem de forma distinta aos

estímulos da germinação, tendo cada população os próprios fatores intrínsecos (dormência das sementes) como limitantes ao processo de germinação (Figura 2).



Figura 2: Germinação *ex vitro* de *Passiflora mucronata*, após 28 dias de cultivo: (A) Protrusão da raiz primária; (B) Plântulas normais; (C) Plântulas anormais.

A análise de variância mostrou diferença significativa para o IVG das sementes recém-colhidas de *P. mucronata* submetidas ao cultivo *ex vitro*. (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância com os quadrados médios do IVG, de sementes recém-colhidas de *P. mucronata* após 28 dias de cultivo *in vitro* em meio de cultura MSM. Campos dos Goytacazes- RJ, 2019

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
		IVG
População (P)	9	6,56*
Resíduo	30	0,12
Média geral	-	2,07
C.V. (%)	-	17,17

*Significativo pelo teste F em 5% de probabilidade. Dados transformados $\sqrt{x} + 1,0$.

A população P.5 foi a que apresentou o maior IVG, indicando que essa população apresenta maior vigor entre as populações de *P. mucronata* (Figura 3).

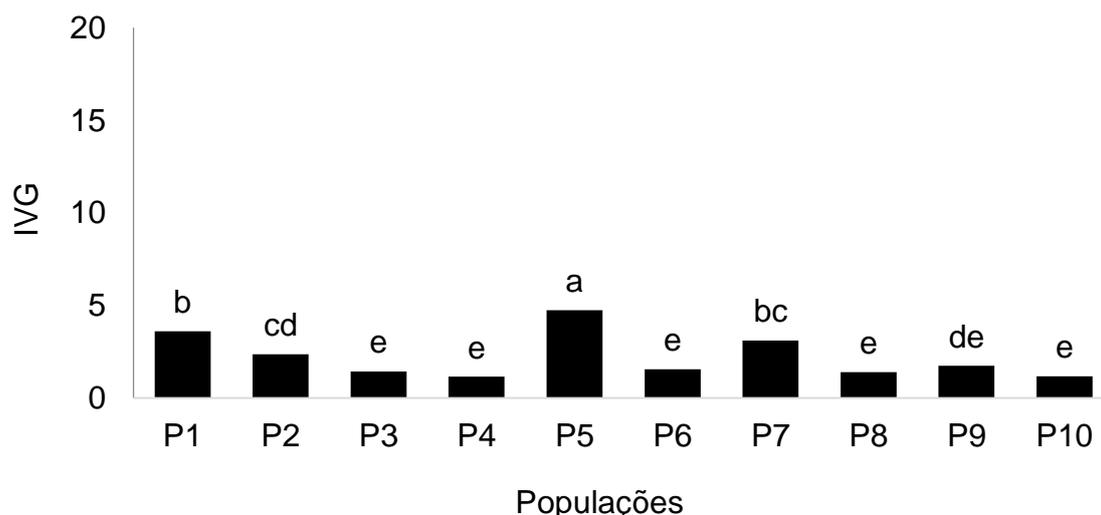


Figura 3. Índice de velocidade de germinação de sementes de dez populações de *P. mucronata* durante 28 dias de cultivo *ex vitro*. Diferentes letras minúsculas representam a diferença estatística entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.2.4.2. Germinação *in vitro* de sementes recém-colhidas de *P. mucronata*

As sementes com tegumento não germinaram *in vitro*. Na germinação *in vitro* de sementes sem tegumento e de embriões isolados de sementes recém-colhidas de *P. mucronata*, a análise de variância mostrou diferença significativa ($p \leq 0,05$) para a interação entre populações e os tipos de explantes dentro das variáveis de plântulas normais e anormais (Tabela 4).

Tabela 4. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para plântulas normais e plântulas anormais de sementes recém-colhidas de *Passiflora mucronata*, cultivadas por 28 dias em meio de cultura MSM. Campos dos Goytacazes- RJ, 2019

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Plântulas normais	Plântulas anormais
População (P)	9	315,10 ^{ns}	1245,08*
Explante (E)	1	103053,40*	93521,95*
(P) x (E)	9	763,56*	1216,27*
Resíduo	95	559,93	435,13
Média geral	-	35,41	40,69
C.V. (%)	-	66,66	51,26

*Significativo pelo teste F em 5% de probabilidade. ^{ns}Não significativo pelo teste F em 5% de probabilidade

As sementes com tegumento quando colocadas *in vitro* não germinaram. No entanto, quando o tegumento foi retirado, as sementes germinaram de forma desuniforme, gerando um grande número de plântulas anormais, acima de 40% em todas as populações. O cultivo de embriões proporcionou uma germinação uniforme, o número de plântulas normais foi maior para todas as populações, sendo de 49,99% na população P.1, chegando a 88,88% na população P.9, com formação de plântulas anormais abaixo de 19,44% (Tabela 5).

A população P.10, proveniente da Embrapa, apresentou no cultivo de embriões, germinação semelhante às populações silvestres de *P. mucronata* (Tabela 5). Ao utilizar sementes sem tegumento dessa população, a germinação foi abaixo de 2,77%, valor similar às demais populações. Estes resultados indicaram não haver diferença na porcentagem de germinação entre as populações silvestres de *P. mucronata* e a população melhorada pela Embrapa.

Tabela 5. Plântulas normais e plântulas anormais na interação de populações de *P. mucronata* com diferentes tipos de explantes (Sementes sem tegumento e embrião isolado)

Populações	% Plântulas normais		% Plântulas anormais	
	Sementes sem tegumento	Embrião isolado	Sementes sem tegumento	Embrião isolado
P.1	2,77 aB	49,99 aA	61,10 abcA	8,33 aB
P.2	8,33 aB	52,77 aA	72,21 abcA	19,44 aB
P.3	11,10 aB	55,55 aA	86,10 abA	13,88 aB
P.4	8,33 aB	58,32 aA	47,22 bcA	13,88 aB
P.5	11,11 aB	55,55 aA	86,11 abA	16,66 aB
P.6	11,10 aB	66,66 aA	72,22 abcA	11,11 aB
P.7	0,0 aB	77,77 aA	38,88 cA	5,55 aB
P.8	5,55 aB	66,66 aA	86,10 abA	13,88 aB
P.9	0,0 aB	88,88 aA	91,66 aA	5,55 aB
P.10	2,77 aB	74,99 aA	44,44 cA	19,44 aB
C.V.(%)		33,41		51,26

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Estes resultados, são semelhantes aos encontrados por Generoso (2018), que trabalhando com *P. edulis*, alcançou uma baixa porcentagem de germinação com sementes com tegumento (3%) e sementes sem tegumento (9,4%). Estudos com o gênero *Passiflora* indicaram que algumas espécies como *P. edulis* possuem um tegumento que pode causar dormência nas sementes, o que representa uma barreira física, que dificulta a entrada de água e nutrientes no interior das sementes (Tsuboi e Nakagawa,1992).

Mesmo com a remoção do tegumento das sementes de *P. mucronata*, foi observado que o problema na germinação não foi totalmente solucionado, pois o número de plântulas anormais geradas foi acima de 40% para todas as populações (Tabela 5; Figura 4- B). Generoso (2018) sugere que o tegumento e o endosperma das sementes de *Passiflora edulis* sejam retirados antes de serem semeadas em meio de cultura, pois a dormência em sementes de maracujazeiro azedo, germinadas *in vitro* está associada tanto ao tegumento das sementes quanto ao endosperma.

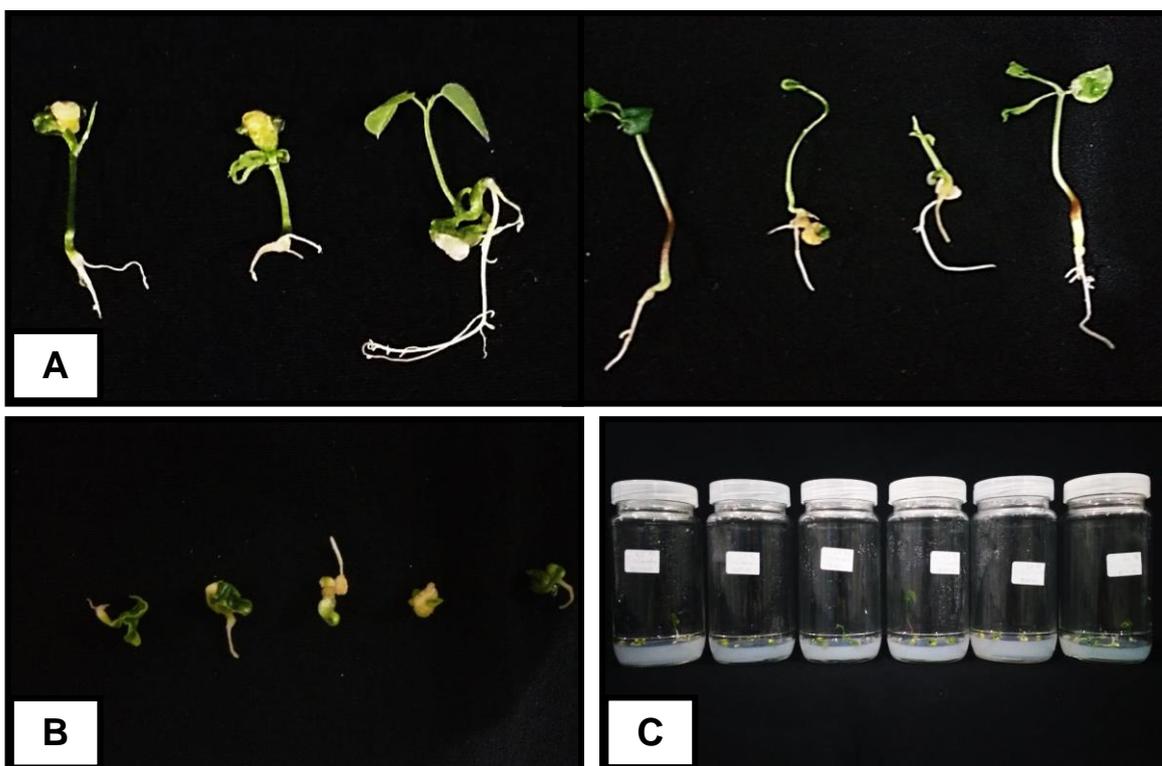


Figura 4. Germinação *in vitro* de sementes sem tegumento de *Passiflora mucronata*, após 28 dias de cultivo: (A) Plântulas normais germinadas a partir do cultivo de sementes sem tegumento; (B) Plântulas anormais germinadas a partir de sementes sem tegumento. (C) Cultivo *in vitro* das de sementes de *P. mucronata* sem tegumento.

Somente no cultivo de embriões isolados ocorreu germinação uniforme entre as populações de *P. mucronata* e obteve-se uma alta porcentagem de plântulas normais (acima de 88,88%) (Tabela 5; Figura 5). Estes resultados corroboram com os encontrados por Generoso (2018), que com o cultivo de embriões de *P. edulis* conseguiu superar a dormência das sementes, atingindo 78,1% de plântulas normais e baixa formação de plântulas anormais (12,5%).

Esses resultados demonstram que para alcançar uma alta taxa de germinação de sementes *in vitro* e de plântulas normais em *Passiflora* é necessário a retirada do tegumento e do endosperma das sementes.



Figura 5. Plântulas oriundas da germinação *in vitro* de embriões isolados de dez populações de *Passiflora mucronata*, após 28 dias de cultivo.

No IVG *in vitro* de sementes sem tegumento e embriões isolados de *P. mucronata*, a análise de variância mostrou diferença para os tipos de explantes e na interação entre explantes e populações ($p \leq 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância com os quadrados médios de dados do IVG *in vitro*, de sementes sem tegumento e embriões isolados de sementes recém-colhidas de *P. mucronata* após 28 dias de cultivo em meio de cultura MSM. Campos dos Goytacazes-RJ, 2019

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
		IVG
Explante (E)	1	51,11*
População (P)	9	0,46 ^{ns}
(E) x (P)	9	0,87*
Resíduo	97	0,23
Média geral	-	2,75
C.V. (%)	-	17,62

*Significativo pelo teste F em 5% de probabilidade. ^{ns}Não significativo pelo teste F em 5% de probabilidade. Dados transformados $\sqrt{y + 1,0}$.

Os embriões isolados se mostraram mais vigorosos que as sementes sem tegumento (Figura 6). Além de fornecerem uma uniformidade na germinação com um alto índice de plântulas normais, o cultivo de embrião proporciona um aumento na velocidade da germinação para todas as populações.

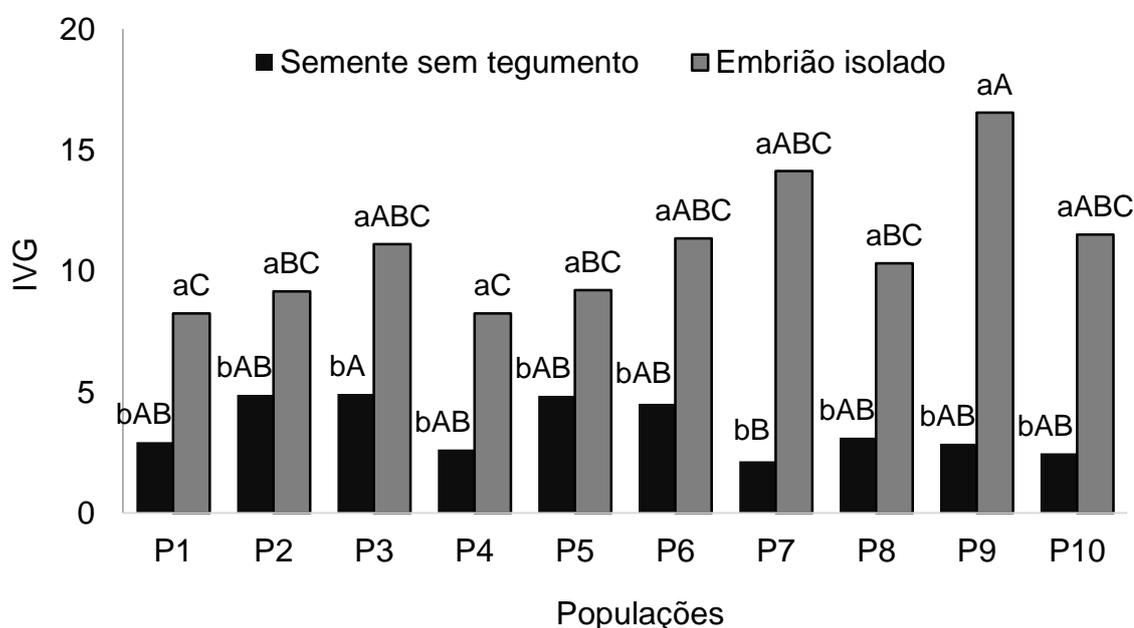


Figura 6. Índice de velocidade de germinação de sementes sem tegumento e embriões isolado *in vitro* de dez populações de *P. mucronata*, no tempo zero de armazenamento. Diferentes letras minúsculas representam a diferença estatística entre explantes dentro da população. Médias seguidas de mesma letra minúscula entre os diferentes tipos de explante dentro de cada população e minúscula entre as populações dentro de cada tipo de explante não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.2.4.3. Germinação *ex vitro* e *in vitro* de sementes armazenadas de *P. mucronata*

As sementes colocadas em B.O.D. após 12 meses de armazenamento em geladeira a 4 °C, não apresentaram germinação em sua totalidade. Resultados semelhantes foram observados por Santos et al. (2012) ao trabalharem com sementes de *P. mucronata* armazenadas em geladeira a 15 °C durante um período de até doze meses. As sementes não germinaram aos quatro meses de armazenamento, mesmo quando submetidas aos tratamentos em banho-maria a 50 °C ou escarificação com lixa.

Resultados contrastantes foram encontrados por Melletti et al. (2011), que ao investigar o armazenamento de sementes de *P. mucronata*, observaram que as sementes podem ser armazenadas em até um ano, em condições de câmara seca e fria (7 °C sob 6% de umidade) associado com o choque térmico. Com esses tratamentos, a germinação chegou a atingir 67,1% aos 12 meses de armazenamento e 25,8% aos 18 meses. Esses resultados apontaram para a possibilidade de conservação em médio prazo das sementes de *P. mucronata*.

Na germinação *in vitro* de sementes sem tegumento e embriões isolados aos 12 meses de armazenamento de *P. mucronata*, a análise de variância mostrou diferença significativa para a população, para o tipo de explante e na interação entre populações e os tipos de explantes, para plântulas normais e anormais (Tabela 7).

Tabela 7. Resumo da análise de variância com os quadrados médios para plântulas normais e plântulas anormais de *Passiflora mucronata*, cultivados por 28 dias em meio de cultura MSM, após 12 meses de armazenamento em geladeira a 4 °C. Campos dos Goytacazes- RJ, 2019

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Plântulas normais	Plântulas anormais
População (P)	1	0,38*	14,37*
Explante (E)	9	8,85*	40,83*
(P) x (E)	9	0,41*	5,08*
Resíduo	60	0,16	1,60
Média geral		1,26	2,23
C.V. (%)		31,93	56,68

*Significativo pelo teste F em 5% de probabilidade. Dados transformados $\sqrt{x} + 0,5$.

Quando as sementes foram cultivadas *in vitro* após 12 meses de armazenamento, utilizando como fonte de explantes sementes sem tegumento e embriões isolados, foi observada baixa germinação nos dois tratamentos (Tabela 8). Para as sementes sem tegumento, o número de plântulas anormais foi de 0,33 a 5,16%. Para o cultivo de embriões o número de plântulas anormais variou de 0,0 a 2,00%. Embora o armazenamento das sementes faça com que o cultivo de embriões isolados apresente uma baixa germinação para as dez populações de *P. mucronata*, estes resultados demonstram que o cultivo de embriões pode ser utilizado a fim de se conseguir uma alta porcentagem e uma uniformidade de germinação, em sementes que apresentam dormência.

Tabela 8. Plântulas normais e plântulas anormais na interação de populações de *P. mucronata* com diferentes tipos de explantes (Sementes sem tegumento e embrião isolado), após 12 meses de armazenamento

População	% Plântulas normais		% Plântulas anormais	
	Sementes sem tegumento	Embrião isolado	Sementes sem tegumento	Embrião isolado
P.1	0,96 abB	2,23 abA	2,50 bcdeA	0,50 aA
P.2	0,79 bB	1,54 abA	2,50 deA	1,00 aA
P.3	0,96 abB	1,99 abA	3,16 abcdA	2,50 aA
P.4	1,04 abA	1,22 abA	0,50 eA	0,00 aA
P.5	0,70 bB	2,44 aA	2,00 cdeA	0,00 aA
P.6	1,56 aA	1,99 abA	3,66 abcA	2,00 aA
P.7	1,17 abB	2,21 abA	4,83 abA	0,50 aB
P.8	1,33 abA	1,96 abA	3,33 abcdA	1,50 aA
P.9	1,11 abB	1,78 abA	5,16 aA	0,50 aB
P.10	0,96 abA	1,02 bA	0,33 eA	0,00 aA
C.V.(%)	31,93		26,09	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na análise de variância do IVG *in vitro* de sementes sem tegumento e embriões isolados de *P. mucronata*, verificou-se diferença significativa para a população, para os explantes, para a interação entre populações e os tipos de explantes, após 12 meses de armazenamento (Tabela 9).

Tabela 9. Resumo da análise de variância com os quadrados médios de dados do IVG *in vitro*, de sementes sem tegumento e embriões isolados de sementes recém-colhidas de *P. mucronata* após 28 dias de cultivo em meio de cultura MSM. Campos dos Goytacazes-RJ, 2019

Fonte de variação	GL	Quadrado médio
		IVG
Explante (E)	1	6,55*
População (P)	9	1,83*
(E) x (P)	9	0,92*
Resíduo	53	0,13
Média geral	-	2,37
C.V. (%)	-	15,54

*Significativo pelo teste F em 5% de probabilidade. Dados transformados $\sqrt{x} + 0,5$.

Assim como observado em sementes recém-colhidas de *P. mucronata*, a velocidade de germinação (IVG) dos embriões isolados foi superior que a apresentada pelas sementes sem tegumento, com exceção das populações P.9 e P.10 que apresentaram um aumento no vigor, assim como na porcentagem de plântulas normais (Figura 7).

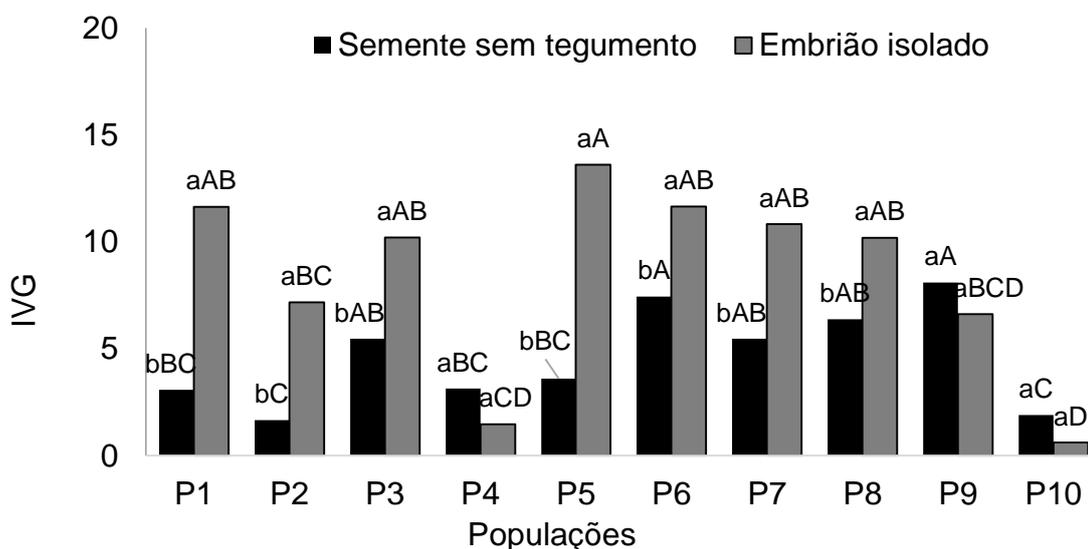


Figura 7. Índice de velocidade de germinação de sementes sem tegumento e embriões isolados *in vitro* de dez populações de *P. mucronata* por 28 dias, no tempo de 12 meses de armazenamento. Diferentes letras minúsculas representam a diferença estatística entre explantes dentro da população. Médias seguidas de mesma letra minúscula entre os diferentes tipos de explante dentro de cada população e minúscula entre as populações dentro de cada tipo de explante não diferem entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

4.2.4.4. Aclimatização

As plantas foram aclimatizadas em casa de vegetação e não apresentaram nenhuma alteração visual (Figuras 8 e 9).

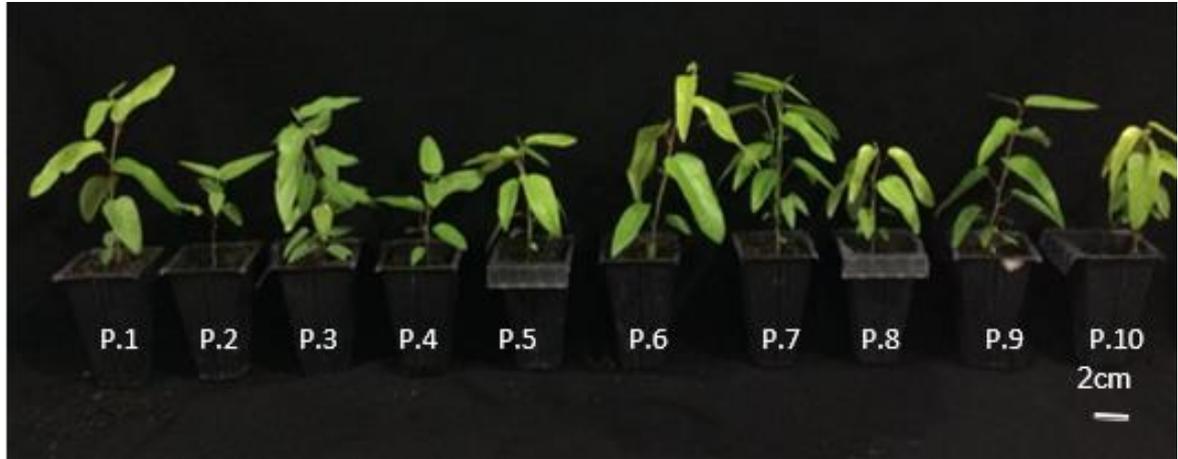


Figura 8. Plantas aclimatizadas em casa de vegetação por 30 dias. 10 plantas representando as populações oriundas do cultivo de embriões de *Passiflora mucronata*.



Figura 9. Plantas das dez populações de *Passiflora mucronata* aclimatizadas em recipientes de 150 mL após 35 dias do transplante.

4.2.5. CONCLUSÕES

- O percentual de germinação *ex vitro* de sementes de *P. mucronata* recém-colhidas foi baixo, atingindo apenas 30%;
- O IVG *ex vitro* de sementes de *P. mucronata* recém-colhidas, foi superior na população P.5, comparada com as demais populações;
- O percentual de germinação *in vitro* em sementes de *P. mucronata* recém-colhidas foi de 88% quando se utilizou o embrião isolado, comparado ao percentual de germinação de sementes sem tegumento (11%) e com tegumento (0%);
- O IVG *in vitro* de sementes de *P. mucronata* recém-colhidas foi superior quando utilizado embrião isolado, quando comparado às sementes sem tegumento. A população P.9 apresentou o maior IVG, com embrião isolado, quando comparada com as demais populações;
- Após 12 meses de armazenamento não houve germinação *ex vitro* de sementes de *P. mucronata*;
- Houve redução no percentual de germinação *in vitro* tanto para semente sem tegumento, quanto para embrião isolado;
- O maior percentual de germinação foi a partir de embrião isolado em condições *in vitro*;
- O IVG *in vitro* de sementes de *P. mucronata* armazenadas foi superior utilizando embrião isolado, para sete das dez populações. A população P.5, apresentou o maior vigor, utilizando embrião isolado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brasil. (2009) Regras para análise de sementes/ Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária- Brasília: Mapa/ACS, 395p.
- Ellis, R. H., Hong, T. D., Roberts, E. H. (1985) Handbook for Seed Technology for Genebanks, 2. ed. Compendium of Specific Germination, Information and

- Test Recommendations. Rome: International Board for Plant Genetic Resources-IBPGR, 456p.
- Ferreira, D. F. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 5 (6):1039-1042.
- Fischer, I. H., Rezende, J. A., Naldi Filho, N., Silva, J. R. D. (2005) Occurrence of *Nectria haematococca* in passion fruit in the State Rio de Janeiro and resistance of *Passiflora mucronata* to the pathogen. *Fitopatologia Brasileira*, 30 (6):671-671.
- Fowler, A. J. P., Bianchetti, A. (2000) Dormência em sementes florestais. *Embrapa Florestas documentos*, 40. ed. Curitiba, 27p.
- Generoso, A. L. (2018) Conservação e Cultivo *in vitro* de embriões de Maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims). Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 184p.
- Junqueira, N. T. V., Braga, M. F., Faleiro, F. G., Peixoto, J. R., Bernacci, L. C. (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. *Maracujá: Germoplasma e melhoramento genético*, 1 (4):79-108.
- Maguire, J. D. (1962) Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2 (2):176-177.
- Meletti, L. M. M., Soares-Scott, M. D., Bernacci, L. C., Alvares, V., Azevedo, J. A. (2011) Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam.: Nova alternativa de maracujá ornamental. *Ornamental Horticulture*, 17 (1):87-95.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:437-497.
- Paula, M. D. S., Fonseca, M. D. N., Boiteux, L. S., Peixoto, J. R. (2010) Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32 (1):222-229.
- Santos, T. M., Flores, P. S., Oliveira, S. P., Silva, D. F. P., Bruckner, C. H. (2012) Tempo de armazenamento e métodos de quebra de dormência em sementes do maracujá-de-restinga. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 2 (1):26-31.

- Tsuboi, H., Nakagawa, J. (1992) Efeito da escarificação por lixa, ácido sulfúrico e água quente na germinação de sementes de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis F. flavicarpa* Deg.). *Científica*, 20:63-72.
- Walter, R., Carvalho, V. S., Generoso, A. L., Rodrigues, R., Gravina, G. D. A. (2018) Cultivation of immature *Capsicum* spp. embryos for incompatible-crossing embryo rescue. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 40:1-8.

4.3 MORFOGÊNESE *IN VITRO* EM *Passiflora* spp. A PARTIR DE DIFERENTES EXPLANTES E CONCENTRAÇÕES DE CITOCININAS

RESUMO

Técnicas de cultura de tecidos vegetais podem auxiliar na propagação de espécies do gênero passiflora, a fim de multiplicar e conservar genótipos com características de interesse. A multiplicação e conservação dessas espécies apresentam alguns problemas como a reprodutibilidade do protocolo e a formação de plântulas normais. Isso ocorre pelo fato de muitas espécies do gênero serem silvestres, as quais respondem de maneira distinta às formas de cultivo. Para o gênero *Passiflora* a organogênese se destaca como a principal via de regeneração. As principais citocininas utilizadas no meio de cultura são o BAP e o TDZ que desempenham importante papel na regulação do crescimento e da morfogênese, pois estimulam a divisão celular, a indução e a proliferação das brotações. Com isso, o objetivo do trabalho foi obter plantas triploides a partir da cultura de endosperma maduro em *Passiflora* spp. e desenvolver um protocolo eficiente de regeneração de plantas a partir de diferentes explantes (epicótilo, segmento nodal e folha) de *P. mucronata*. Para o primeiro experimento foram utilizados endospermas retirados das sementes do híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*, *P. setacea*, *P. edulis* e *P. mucronata*, e para o segundo experimento, foram utilizadas plântulas oriundas das populações P.7 e P.9 de *P.*

mucronata. Os endospermas foram retirados com auxílio de pinça e bisturi e foram inoculados em placa de Petri, contendo meio MSM. O meio foi suplementado com cinco concentrações de TDZ (0,0; 2,2; 4,5; 6,8 e 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cinco repetições, sendo cada uma composta por uma placa de Petri contendo 10 explantes. Após 60 dias, avaliaram-se a porcentagem de calos, o diâmetro do calo, a textura do calo, a coloração do calo e a formação da parte aérea. Quando utilizado como fonte de explante o endosperma, houve formação de brotações apenas para o híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea* no tratamento com 4,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ. Para a indução da morfogênese em segmento nodal, intermodal e discos foliares foram utilizados os sais minerais do meio MSM. O experimento foi instalado em DIC, com cinco concentrações de BA e cinco concentrações de TDZ (2,04; 3,06; 4,08; 5,11 e 6,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com cinco repetições, sendo cada uma composta por uma placa de Petri contendo os três explantes. O TDZ propiciou maior porcentagem de calos em segmentos nodais e intermodais e o BA nos discos foliares em *P. mucronata*. Este é o primeiro trabalho envolvendo a morfogênese em *P. mucronata* e no híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*.

ABSTRACT

Vegetable tissue culture techniques may aid in the propagation of passiflora species in order to multiply and conserve genotypes with characteristics of interest. The multiplication and conservation of these species present some problems, such as the reproducibility of the protocol and the formation of normal seedlings. This is due to the fact that many species of the genus are wild, which respond differently to the forms of cultivation. For the genus *Passiflora* the organogenesis stands out as the main route of regeneration. The main cytokinins used in the culture medium are BAP and TDZ which play an important role in regulating growth and morphogenesis, as they stimulate cell division, induction and proliferation of shoots. With this, the objective of the work was to obtain triploid plants from the mature endosperm culture in *Passiflora* spp. and to develop an efficient plant regeneration protocol from different explants (epicotyl, nodal

segment and leaf) of *P. mucronata*. For the first experiment, endosperms were obtained from *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' hybrid *P. setacea*, *P. setacea*, *P. edulis* and *P. mucronata*, and for the second experiment, seedlings from populations of P.7 and P.9 of *P. mucronata*. The endosperms were removed using clamp and scalpel and were inoculated in Petri dish, containing MSM medium. The medium was supplemented with five concentrations of TDZ (0.0, 2.2, 4.5, 6.8 and 9.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and five replicates, each consisting of a Petri dish containing 10 explants. After 60 days, the callus percentage, callus diameter, callus texture, callus color and shoot formation were evaluated. When the endosperm was used as explant source, shoots were only formed for the *P. edulis* hybrid 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea* in the treatment with 4.54 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of TDZ. For the induction of morphogenesis in nodal segment, intermodal and leaf discs the mineral salts of the MSM medium were used. The experiment was carried out in DIC, with five concentrations of BA and five concentrations of TDZ (2.04, 3.06, 4.08, 5.11 and 6.13 $\mu\text{mol L}^{-1}$) with five replicates, each consisting of a Petri dish containing the three explants. TDZ provided a higher percentage of callus in nodal and intermodal segments and BA in leaf discs in *P. mucronata*. This is the first work involving morphogenesis in *P. mucronata* and in the hybrid of *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*.

4.3.1. INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* possui uma grande diversidade genética, possuindo cerca de 400 a 530 espécies descritas. O Brasil é considerado centro de diversidade do gênero por possuir 146 espécies distribuídas em todo território (Flora do Brasil, 2018). Espécies como *P. edulis* possuem grande importância econômica por representar 90% dos plantios encontrados no Brasil (Viana et al., 2006). Entretanto, vários fatores vêm colaborando para que haja uma diminuição na produção do maracujazeiro azedo, principalmente o aumento da incidência de pragas e doenças que acarretam a diminuição dos plantios em várias regiões do País (Junqueira et al., 2006; Meletti, 2011).

Uma das medidas para minimizar o efeito de pragas e doenças sobre a cultura é a utilização de genótipos resistentes (Alexandre et al., 2014). Espécies como *P. setacea* e *P. mucronata* são consideradas fontes de resistência a doenças que comprometem a viabilidade do maracujazeiro. Apesar de apresentarem grande potencial, essas espécies possuem dificuldade em sua propagação com baixa porcentagem de germinação de sementes (Santos et al., 2012; Araújo, 2017). Desta forma, técnicas de cultura de tecidos vegetal podem auxiliar na propagação dessas espécies, a fim de multiplicar e conservar genótipos com características de interesse. No entanto, a multiplicação e conservação dessas espécies apresentam muitas vezes, problemas como a reprodutibilidade do protocolo e a formação de plântulas anormais. Isso ocorre pelo fato de muitas espécies do gênero serem silvestres, as quais respondem de maneira distinta às formas de cultivo.

Para o gênero *Passiflora* a organogênese se destaca como a principal via de regeneração, podendo ocorrer direta ou indiretamente, dependendo do explante e do genótipo utilizado. Os principais fitorreguladores utilizados no meio de cultura são o 6-benzilaminopurina (BAP) e o thidiazuron (TDZ). Ambos são citocininas que desempenham importante papel na regulação do crescimento e da morfogênese, pois estimulam a divisão celular, a indução e a proliferação das brotações. Quanto aos explantes, os mais utilizados são segmento nodal, epicótilo, hipocótilo e folha (Trevisan et al., 2005; Fernando et al., 2007; Pinto et al., 2010; Silva et al., 2011; Rocha et al., 2012; Antoniazzi et al., 2018). Trabalhos mais recentes também mostram a utilização de endosperma a fim de produzir plantas triploides, com efeito *gigas*, o qual proporciona um aumento significativo em órgãos reprodutivos da cultura como flores e frutos, no rendimento e, ou na produtividade da espécie (Sattler et al., 2016). Assim, este estudo tem como objetivo, descrever um sistema de regeneração *in vitro* a partir de diferentes explantes em *Passifloras*.

4.3.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.3.1. Caracterização do local

A pesquisa foi realizada de novembro de 2017 a dezembro de 2018, no Setor de Horticultura, do Laboratório de Fitotecnia (LFIT), do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

4.3.3.2. Experimento I: Cultura de endosperma maduro para a produção de calos de *P. setacea*, *P. edulis*, *P. mucronata* e do híbrido *P. setacea* x *P. edulis*.

4.3.3.2.1. Material Vegetal

Como material vegetal foram utilizados endospermas retirados das sementes do híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*, *P. setacea*, *P. edulis* e *P. mucronata* (Figura 1). As sementes do híbrido, de *P. setacea* e *P. edulis*, foram oriundas do Programa de Melhoramento Genético de Plantas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada na cidade de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. As sementes de *P. mucronata* foram provenientes do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCA) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) localizada na cidade de Alegre, Espírito Santo.

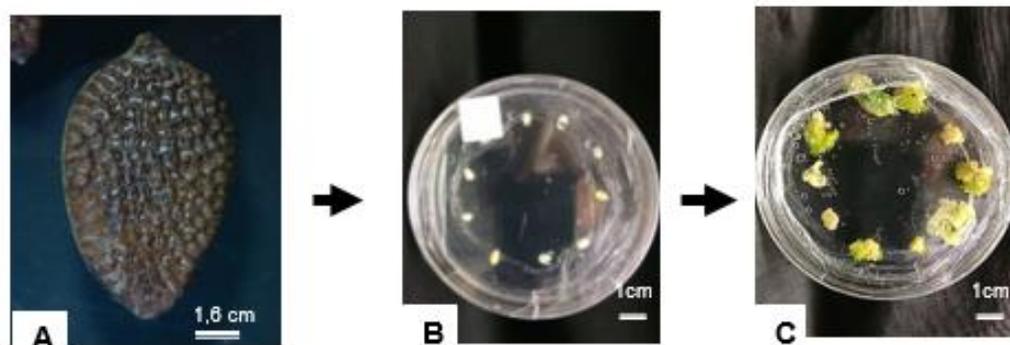


Figura 1. A) Semente intacta de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea* B) Endospermas inoculados em meio de cultura contendo os sais MSM. C) Calos no meio de cultura com TDZ após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Fase I- Desinfestação das sementes de *Passiflora* ssp.

Antes da desinfestação os tegumentos das sementes foram retirados com o auxílio de uma minimorsa. Em câmara de fluxo laminar, as sementes sem tegumento foram mergulhadas em álcool 70% por 30 segundos e imersas em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 0,5%, com 2 gotas de Tween 20 em 80 mL da solução por 15 minutos, enxaguadas três vezes em água desionizada e autoclavada. Após a desinfestação, as sementes ficaram imersas em água desionizada estéril por um período de 24 horas, para facilitar a remoção dos endospermas.

Fase II – Regeneração *in vitro* de endospermas maduros de *Passiflora* spp.

Os endospermas foram retirados com auxílio de pinça e bisturi sob um microscópio estereoscópio (Tecnival®) e foram inoculados em placas de Petri de polietileno (90 mm x 15 mm), contendo 40 mL do meio MSM (Monteiro et al., 2000), 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,10 g L⁻¹ de mio-inositol, de vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), pH do meio ajustado para 5,7± 0,1 e em seguida solidificado com 7,0 g L⁻¹ ágar (Vetec®) e autoclavado por 20 minutos (121 °C e 1,1atm de pressão). O meio foi suplementado com cinco concentrações (tratamentos) de thidiazuron (TDZ) (0,0; 2,2; 4,5; 6,8 e 9,0 µmol L⁻¹) e cinco repetições, cada réplica foi composta por uma placa de Petri contendo 10 explantes. Após a inoculação dos explantes, as placas de Petri foram seladas com filme de PVC e mantidas em câmara de crescimento sob irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹ fornecida por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia e temperatura de 27±2 °C, com fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro).

Após 60 dias, avaliaram-se a porcentagem de calos, o diâmetro do calo, a textura do calo, a coloração do calo e a formação da parte aérea. Para análise visual foi utilizada avaliação descritiva e esta análise foi realizada com o auxílio de microscópio estereoscópico (Tecnival®). Após a calogênese, os explantes com brotos de aproximadamente 3 mm de comprimento foram transferidos para outro meio de alongamento, composto pelos sais de MSM, suplementado com 2,88 µmol L⁻¹ de ácido giberélico (GA₃) 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,10 g L⁻¹ de mio-inositol, vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), pH do meio ajustado para 5,7±0,1 e acrescido de 7,0 g L⁻¹ de ágar (Vetec®). O material foi mantido sob o mesmo regime de luz e temperatura descrito anteriormente. Ao final de 30 dias foi

avaliado o número de plântulas regeneradas em cada tratamento. Foram feitas análises descritivas visuais, com o auxílio de microscópio estereoscópico (Tecnival®). Durante as avaliações descritivas, foram utilizados códigos para classificar as características dos calos originados dos endospermas (Tabela 1).

Tabela 1. Características utilizadas para descrição visual da morfologia dos calos de *Passiflora mucronata* submetidos a diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ) e de 6-benziladenina (BA), após 35 dias de cultivo *in vitro*.

Código	Descrição visual da morfologia dos calos de <i>Passiflora spp.</i>
I.	Explantos produziram calos compactos verdes com diferenciação de algumas estruturas com características de brotações;
II.	Explantos produziram calos compactos verde-claros a verde-escuros sem regeneração;
III.	Ocasionalmente algum calo verde-claro a verde-escuro, com aspecto compacto foi formado, mas na maioria muito pouco calo foi formado;
IV.	Ocasionalmente algum calo compacto castanho-amarelado foi formado, mas na maioria muito pouco calo foi formado;
V.	Os explantes não formaram calos;
VI.	Os explantes não formaram calo, pareciam oxidados e foram considerados mortos no momento da avaliação;
VII.	Os explantes produziram calos brancos a castanho-amarelados friáveis;
VIII.	Os explantes produziram calos brancos a castanho-amarelados compactos.

Adaptado de Rosa et al. (2016).

4.3.3.3. Experimento II: Morfogênese *in vitro* de *P. mucronata*

4.3.3.3.1. Material Vegetal

Como material vegetal foram utilizadas sementes das populações 7 e 9 de *P. mucronata*. As sementes foram oriundas do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAEE) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) localizada na cidade de Alegre, Espírito Santo.

Fase I - Desinfestação das sementes de *P. mucronata*

A desinfestação das sementes de *P. mucronata* foi realizada de acordo com a metodologia descrita no experimento I, para regeneração *in vitro* de endospermas maduros.

Fase II - Germinação *in vitro*

O meio de cultura foi composto por sais minerais do meio MSM (Monteiro et al., 2000), 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,10 g L⁻¹ de mio-inositol, acrescido de vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), pH do meio ajustado para 5,7±0,1, em seguida solidificado com 7,0 g L⁻¹ de ágar bacteriológico (Vetec®) e autoclavado por 20 minutos a 121 °C e 1,1 atm de pressão.

Os frascos foram mantidos no escuro por 10 dias em temperatura de 27±2 °C, para a germinação. Depois foram transferidos para a luz por mais 18 dias com fotoperíodo 16:8 (luz:escuro), fornecido por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia, irradiância de 50 µmol m⁻² s⁻¹ e mesma temperatura.

Após 28 dias de cultivo *in vitro*, as plântulas formadas foram utilizadas no experimento de morfogênese.

Fase III - Indução da morfogênese *in vitro*

Para a indução da morfogênese foram utilizados os sais minerais do meio MSM (Monteiro et al., 2000) acrescido de 30,0 g L⁻¹ de sacarose, 0,10 g L⁻¹ de mio-inositol, vitaminas de White, pH do meio ajustado para 5,7±0,1 e, em seguida, solidificado com 7,0 g L⁻¹ de ágar (Vetec®) e autoclavado por 20 minutos. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, foram utilizados como fonte de explantes segmento nodal e segmento internodal seccionados com cinco mm de comprimento e discos foliares das folhas mais jovens das plântulas (Figura 2). O experimento foi conduzido em DIC, com cinco concentrações de 6-benziladenina (BA) e cinco concentrações de thidiazuron (TDZ) (2,04; 3,06; 4,08; 5,11 e 6,13 µmol L⁻¹) com cinco repetições, sendo cada uma composta por uma placa de Petri (90 mm x 15 mm) com 25 mL de meio de cultura e três explantes, conforme metodologia descrita por Antoniazzi et al. (2018).

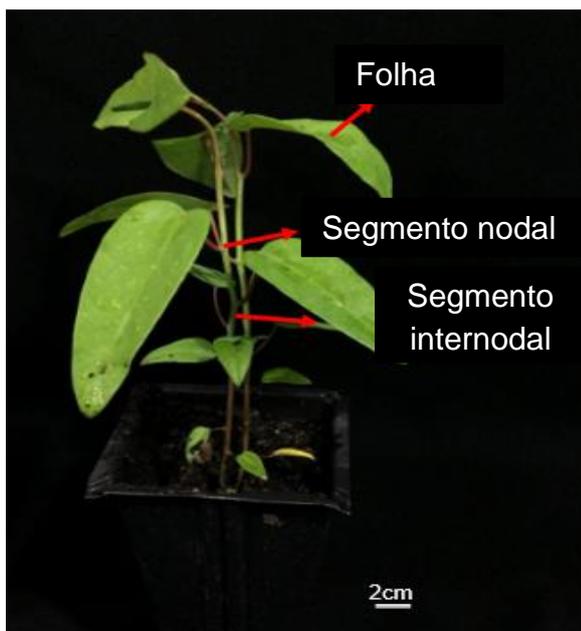


Figura 2. Explantes (Segmento nodal, intermodal e disco foliar) utilizados no experimento de morfogênese *in vitro* de *P. mucronata*.

O experimento foi avaliado após 35 dias de indução, sendo verificada a porcentagem de calos, o diâmetro do calo, a textura do calo e a coloração do calo. Foram feitas análises descritivas visuais, com o auxílio de microscópio estereoscópico (Tecnival®). Durante as avaliações descritivas, foram utilizados códigos para classificar as características dos calos originados dos segmentos nodal, segmentos internodal e discos foliares (Tabela 2).

4.3.3.4. Análise estatística

As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade e homogeneidade de Shapiro-Wilk, aquelas que não apresentaram normalidade passaram pela transformação de dados realizada por meio da expressão $\sqrt{x} + 1,0$. Em seguida os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativos, foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$) com o auxílio do programa estatístico Sisvar® (Statistical Analysis System, versão 5.6) (Ferreira, 2011).

4.3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.4.1. Experimento I: Cultura de endosperma maduro para a regeneração de calos de *P. setacea*, *P. edulis*, *P. mucronata* e do híbrido *P. setacea* x *P. edulis*.

Para a formação de calos em endospermas de *P. setacea*, *P. edulis*, *P. mucronata* e no híbrido de *P. setacea* x *P. edulis*, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para a população. Para o diâmetro de calos, ocorreu diferença significativa em todas as variáveis analisadas (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para número de explantes com calos e diâmetro de calos (mm) para *P. setacea*, *P. edulis*, *P. mucronata* e o híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*, cultivados por 60 dias em meio de cultura MSM. Campos dos Goytacazes - RJ, 2019

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Porcentagem de calo	Diâmetro do calo (mm)
População (P)	3	38,373166*	0,284880*
Concentração (C)	4	50,157794*	1,180823*
(P) x (C)	11	10,850990 ^{ns}	0,822202*
Resíduo	76	13,035376	0,017201
Média geral		6,41	2,45
C.V. (%)		58,79	5,35

*Significativo pelo teste F em nível de 5% de probabilidade. ^{ns}Não significativo pelo teste F em 5% de probabilidade. Dados transformados para $\sqrt{x} + 1,0$.

Os endospermas utilizados como fonte de explante para as populações, *P. setacea*, *P. edulis*, *P. mucronata* e o híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*, apresentaram resposta morfogênica em todas as concentrações de TDZ. As populações de *P. setacea* (62,80%) de *P. edulis* (64,40%) e do híbrido (56,00%) obtiveram os maiores percentuais de calejamento. Os resultados de *P. mucronata* (23,20%), demonstraram que essa população responde de forma inferior a formação de calos quando comparada às demais testadas (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de endospermas com formação de calos em diferentes espécies e híbrido de *Passiflora* em meio de cultura MSM. Campos dos Goytacazes - RJ, 2019

População	Calos (%)
<i>P. setacea</i>	62,80 ab
<i>P. edulis</i>	64,40 a
<i>P. mucronata</i>	23,20 b
<i>P. edulis</i> x <i>P. setacea</i>	56,00 ab
Média geral	6,41
C.V (%)	58,79

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. Dados transformados para $\sqrt{x} + 1,0$.

O explantes colocados no meio utilizado como controle ($0,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ TDZ) também apresentaram resposta morfogênica (Tabela 4). Resultados semelhantes já foram encontrados para *P. setacea*, (Vieira et al., 2014; Araújo, 2017) e *P. edulis* (Trevisan e Mendes, 2005), tendo como explantes discos foliares para as duas espécies e segmentos radiculares para *P. setacea*. No entanto, é a primeira vez que é descrito na literatura a formação de calos em cultura de endospermas maduros de *Passiflora* sem a adição de citocininas.

Tabela 4. Porcentagem de formação de calos em diferentes espécies e híbrido de *Passiflora* a partir de diferentes concentrações de TDZ em meio de cultura MSM. Campos dos Goytacazes - RJ, 2019

TDZ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Porcentagem de calos (%)
0,0	55,50 a
2,2	20,50 b
4,5	70,50 a
6,8	51,50 ab
9,0	70,50 a
Média geral	6,41
C.V (%)	58,79

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. Dados transformados para $\sqrt{x} + 1,0$.

Embora tenha ocorrido a formação de calos em todas as concentrações de TDZ, ocorreram diferenças nos diâmetros de acordo com a concentração de citocinina utilizada no meio de cultura (Tabela 5). A espécie *P. setacea*, obteve os

maiores diâmetros de calos nas concentrações de 6,8 e 9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ. Para as espécies *P. edulis* e *P. mucronata* não ocorreram diferenças nos diâmetros dos calos entre os tratamentos. Foi observado que na concentração de 2,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ, a calogênese foi uniforme para todas as populações. A *Passiflora* que melhor respondeu ao cultivo *in vitro* de endospermas maduros em todas as concentrações de TDZ foi o híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*, com os maiores diâmetros de calo na concentração de 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e formação de pequenas brotações em 15% dos explantes. Esses resultados só foram observados para esta espécie.

Tabela 5. Diâmetro de calos formados a partir de endosperma de *P. setacea*, *P. edulis*, *P. mucronata* e do híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*, submetidos a diferentes concentrações de TDZ. Campos dos Goytacazes – RJ, 2019

TDZ ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Diâmetro de calos (mm)			
	<i>P. setacea</i>	<i>P. edulis</i>	<i>P. mucronata</i>	Híbrido
0,0	4,93 Bbc	4,71 BCa	3,83 Ca	6,19 Ab
2,2	4,67 Ac	4,97 Aa	4,36 Aa	0,0 Ac
4,5	5,55 Bbc	5,04 BCa	4,44 Ca	8,47 Aa
6,8	7,02 Aa	4,93 Ba	4,34 Ba	6,58 Ab
9,0	6,04 ABab	5,46 BCa	4,76 Ca	7,03 Aab
Média geral		2,52		
C.V (%)		5,33		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey. Dados transformados $\sqrt{x+1}$.

Trabalhos anteriores, já foram feitos a partir da cultura de endosperma em maracujazeiro. Antoniazzi et al. (2018) trabalhando com *P. edulis* obtiveram os melhores resultados tanto para calogênese, como para a formação de brotação nessa mesma concentração de 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ. Seus estudos relataram que a indução do processo organogênico a partir de endosperma, não acontece na presença de outras citocininas como o BA e o KIN, e em concentrações baixas de TDZ (2,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

A avaliação da coloração dos calos foi feita por meio de uma análise visual descritiva (Tabela 1). Foi observado que os calos com tonalidade verde-escura, possuíam um maior potencial organogênico para formação de brotações, quando utilizado o endosperma como explante (Antoniazzi et al., 2018).

Os endospermas da espécie *P. mucronata* apresentaram formação de calos em todas as concentrações de TDZ. O tratamento $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ promoveu a formação de calos brancos a castanho-amarelados compactos (Figura 3-C). Os tratamentos $0,0$; $6,8$ e $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ promoveram a formação de calos compactos verde-claros a verde-escuros sem regeneração (Figura 3- B, E, F).

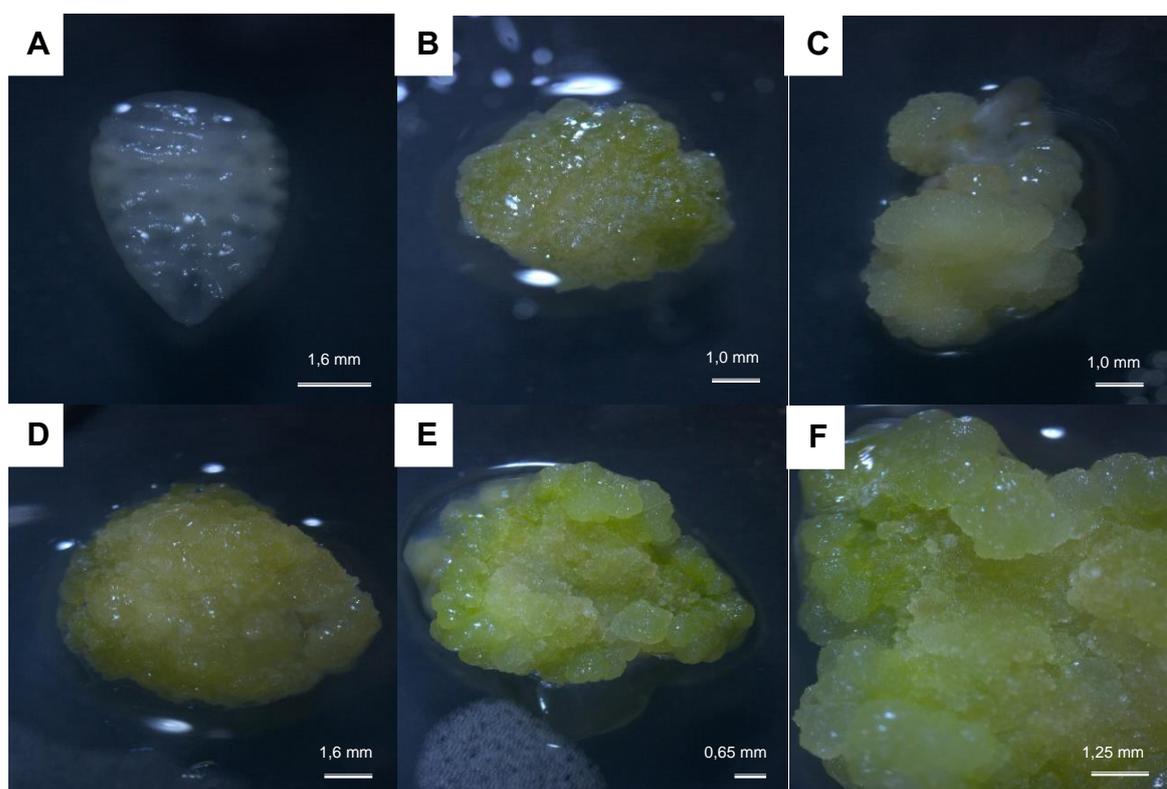


Figura 3. (A) Endosperma de *P. mucronata* após 10 dias de cultivo; (B) Endosperma de *P. mucronata* após 60 dias de cultivo em $0,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ; (C) TDZ $2,2 \mu\text{mol L}^{-1}$; (D) TDZ $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$; (E) TDZ $6,8 \mu\text{mol L}^{-1}$; (F) TDZ $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$.

O híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea* promoveu a formação de calos compactos verdes, com diferenciação de algumas estruturas com características de brotações quando utilizada a concentração $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ (Figura 4 – D, F). O híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea* foi o único que apresentou pequenas brotações a partir da cultura de endospermas. Os endospermas colocados em meio de cultura suplementando com $2,2$ e $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ apresentaram calos com aspecto friável (Figura 4- C, H).

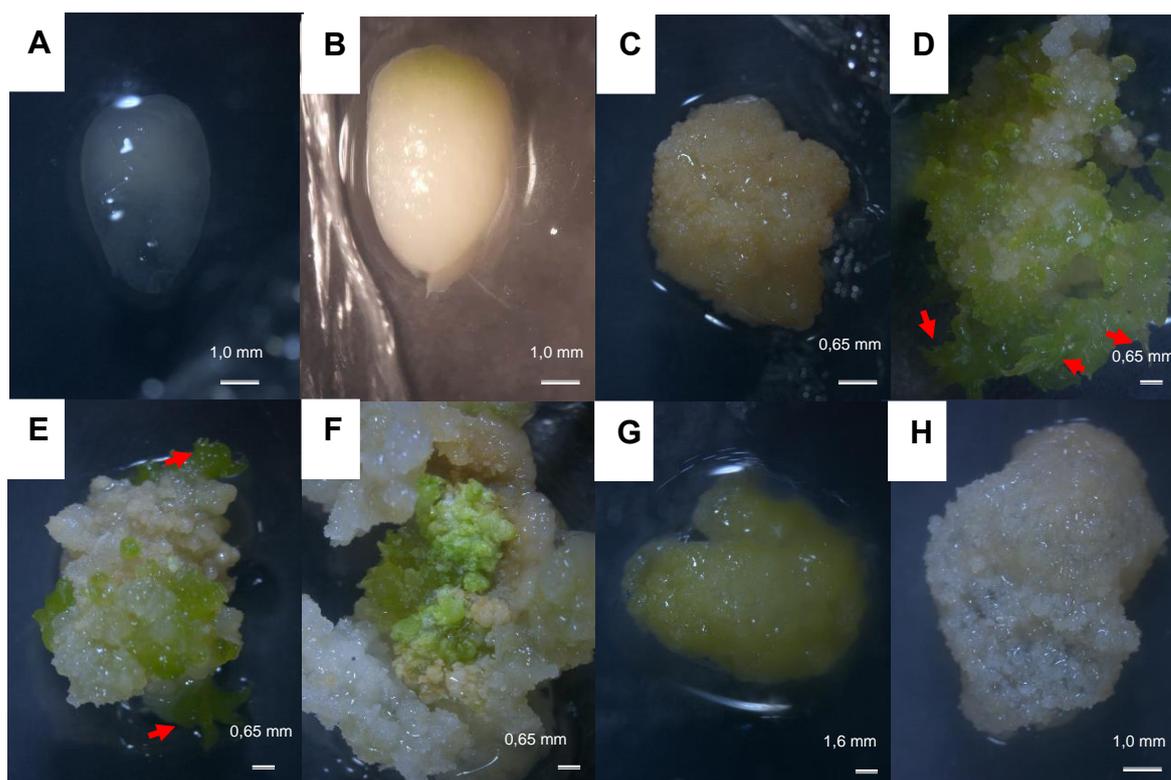


Figura 4. (A) Endosperma do híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea* no tempo zero de cultivo; (B) Após 45 dias de cultura em TDZ 0,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (C) TDZ 2,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D-F) TDZ 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (G) TDZ 6,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (H) TDZ 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Setas vermelhas indicam a formação de ápices caulinares.

Na espécie *P. edulis*, os endospermas dos tratamentos 4,5 e 6,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ formaram calos brancos a castanho-amarelados compactos (Figura 5- B, C), já os tratamentos com 6,8 e 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ promoveram a formação de calos compactos verde-claros sem regeneração (Figura 5- D, E).

A espécie *P. setacea* apresentou uma grande quantidade de calos compactos. Os explantes colocados em meio com baixa concentração de TDZ (2,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$) apresentaram calos com coloração branco leitosa (Figura 6- B), já os explantes colocados em concentrações mais altas de TDZ (4,5; 6,8; e 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) apresentaram uma coloração castanho-amarelada, aparentemente mortos (Figura 5- C, D, E).

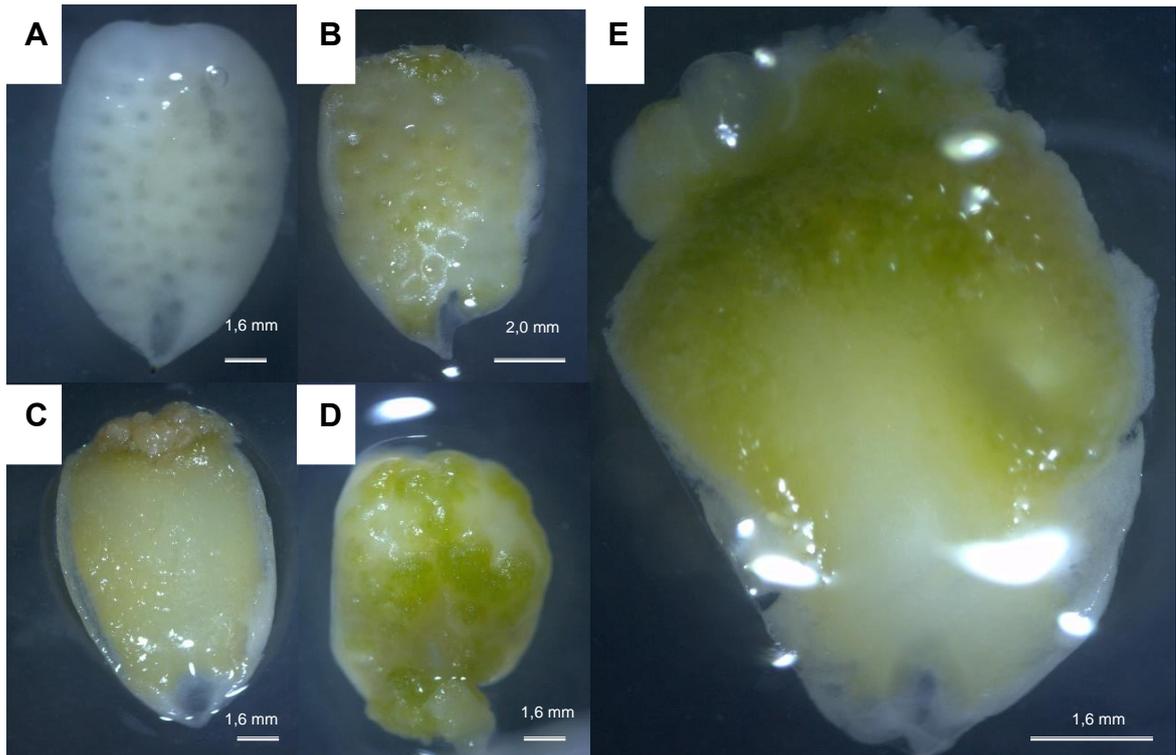


Figura 5. (A) Endosperma de *P. edulis* no 10º dia de cultivo em meio de cultura MSM suplementado com diferentes concentrações de TDZ; (B) TDZ 2,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (C) TDZ 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) TDZ 6,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (E) TDZ 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

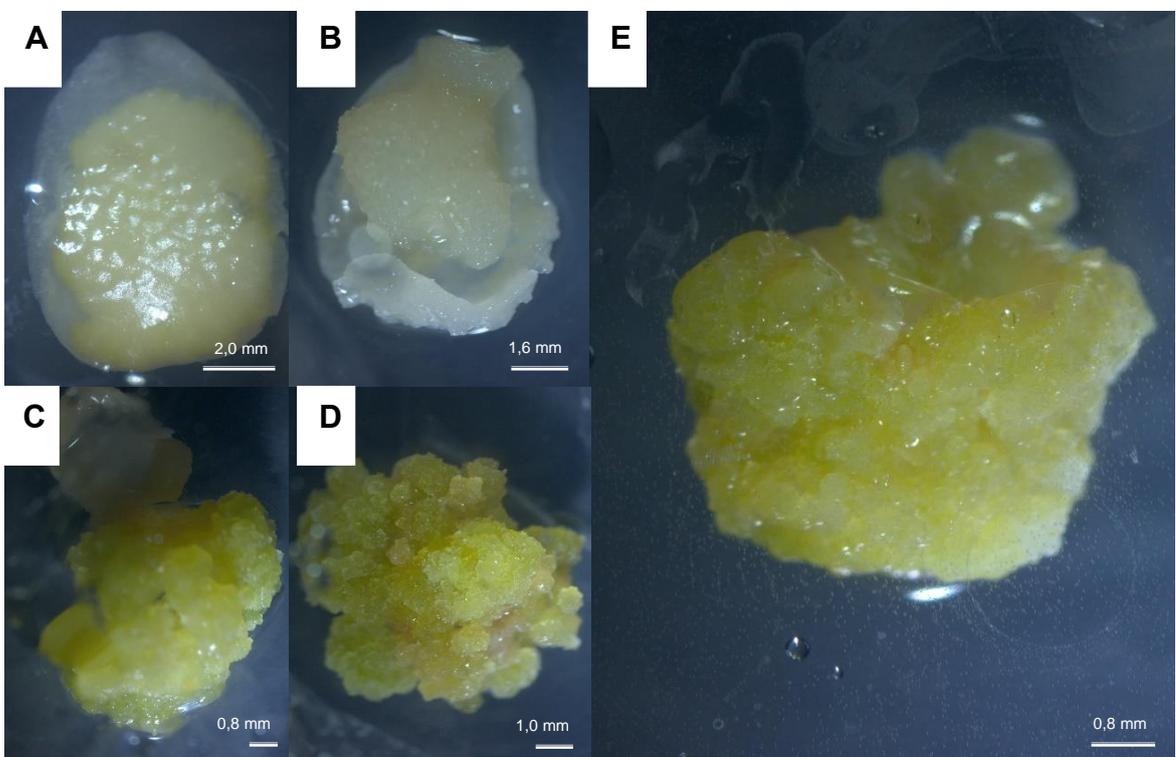


Figura 6. (A) Endosperma de *P. setacea* no 10º dia de cultivo em meio de cultura MSM suplementado com diferentes concentrações de TDZ; (B) TDZ 2,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (C) TDZ 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) TDZ 6,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (E) TDZ 9,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os calos que apresentaram formação de brotos foram transferidos para o meio de alongamento com GA₃. Após 28 dias de cultivo, foi observado que os explantes oxidaram. Em consequência disso, as botões não continuaram o processo de diferenciação e desenvolvimento.

Estes resultados são importantes para estabelecer estratégias futuras, em programas de melhoramento genético vegetal, a fim de produzir plantas triploides de maracujazeiro, a partir da cultura de endospermas maduros.

4.3.4.2. Experimento II: Uso de diferentes explantes (segmento nodal, segmento intermodal e disco foliar) para a regeneração *in vitro* de *Passiflora mucronata*

Para o número de explantes, tanto houve efeito isolado como interação ($p < 0,05$) entre os fatores analisados, exceto para a interação entre concentrações e explantes, e para a interação entre tratamento, concentração e explantes. Para o diâmetro de calos de *P. mucronata*, as variáveis avaliadas de tratamentos, explantes, e as interações entre tratamentos e explantes, concentrações e explantes, apresentaram interação significativa em nível de 5% (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo da análise de variância para número de explantes com calos e diâmetro de calos de *P. mucronata*, cultivados por 35 dias em meio de cultura MSM. Campos dos Goytacazes - RJ, 2019. Campos dos Goytacazes, RJ – 2019

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Número de calos	Diâmetro de calos (mm)
Tratamento – (T)	1	102,668939*	66,980410*
Concentração – (C)	4	3,724727*	1,144680 ^{ns}
Explante – (E)	2	18,072072*	83,114*
(T) x (C)	4	2,350806*	1,394 ^{ns}
(T) X (E)	2	15,353864*	28,716*
(C) X (E)	8	1,105345 ^{ns}	220,820213*
(T) x (C) x (E)	8	1,586889 ^{ns}	3,060 ^{ns}
Resíduo	118	0,789831	0,708
Média	-	3,128	37,161
C.V. (%)	-	28,41	14,27

* e ^{ns}: significativo e não significativo, respectivamente, pelo teste F em nível de 5% de probabilidade estatística de erro. Os dados de diâmetro (mm) foram transformados para $\sqrt{y + 1}$.

Foi observada a formação de calos em todas as concentrações de TDZ e BA. Entretanto, o TDZ se mostrou mais eficiente para a formação de calos em todas as concentrações. Em concentrações mais altas de BA (4,08; 5,11 e 6,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$), a formação de calos foi mais baixa para esta citocinina (Tabela 7).

Se comparado as diferentes concentrações de TDZ, as baixas concentrações, não diferiram estatisticamente das concentrações mais elevadas do fitorregulador.

Tabela 7. Número de explantes com formação de calos obtidos a partir de diferentes concentrações de 6- benziladenina (BA) e thidiazuron (TDZ) em meio de cultura MSM. Campos dos Goytacazes - RJ, 2019

Concentrações ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Fitorreguladores	
	BA	TDZ
2,04	3,07 bA	4,00 aA
3,06	2,80 bA	4,00 aA
4,08	2,27 bAB	3,93 aA
5,11	1,87 aB	4,00 aA
6,13	1,53 bB	3,92 aA
C.V (%)	28,41	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os discos foliares foram o único explante que apresentou resposta morfogênica quanto à formação de calos igual entre os dois fitorreguladores, (Tabela 8). Resultados semelhantes foram encontrados por Faria et al., (2018), que trabalhando com diferentes explantes de *P. cristalina* (discos foliares, hipocótilo, raiz e endospermas), observaram que a resposta dos discos foliares era igual para as duas citocininas (BA e TDZ). Em trabalhos com *P. setacea* e *P. edulis* (Vieira et al., 2014; Araújo, 2017) já foram relatados os mesmos resultados.

Tabela 8. Análise da formação de calos em diferentes explantes de *P. mucronata*, sob a interação de diferentes fitorreguladores em *P. mucronata* em meio de cultura MSM. Campos dos Goytacazes - RJ, 2019

Explantes	Fitorreguladores (μmol)	
	BA	TDZ
Internodal	1,68 bB	4,00 aA
Folha	3,64 aA	4,00 aA
Nodal	1,60 bB	3,92 aA
C.V (%)	28,41	

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Os epicótilos, responderam de forma mais eficiente aos estímulos da morfogênese quando submetidos às concentrações de 2,04; 3,06 e 5,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos fitorreguladores (Tabela 9). Para os epicótilos, estudos iniciais indicaram que não é recomendando altas concentrações de TDZ, pois acarretam a diminuição no diâmetro de calos, ou até mesmo a inibição da calogênese para *P. setacea* (Araújo, 2017).

Quando observados os resultados de calogênese para o segmento nodal, os resultados indicaram menor resposta morfogênica quando utilizada a concentração de 5,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ (Tabela 9).

Para a característica diâmetro do calo, submetida a diferentes concentrações de fitorreguladores, os resultados mais uniformes em todas as concentrações, foram para o explante folha em todas as concentrações de fitorreguladores.

Tabela 9. Diâmetro de calos na interação entre diferentes concentrações de fitorreguladores e diferentes explantes de *P. mucronata*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2019

Concentrações ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Diâmetro (mm)		
	Epicótilo	Folha	Nodal
2,04	34,02 abB	46,62 aA	27,35 aB
3,06	43,30 aA	51,89 aA	26,49 abB
4,08	30,07 bB	52,11 aA	22,71 abB
5,11	39,34 abB	51,19 aA	17,43 cbC
6,13	27,56 bB	47,99 aA	29,67 aB
C.V (%)	14,27		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Dados transformados para $\sqrt{x}+1,0$.

O TDZ proporcionou os maiores diâmetros de calos para os segmentos nodal e intermodal, quando utilizados os discos foliares tanto o TDZ, quanto o BA, que proporcionaram o mesmo tamanho no diâmetro dos calos formados. (Tabela 10). O efeito do TDZ foi igual para os três explantes utilizados (epicótilo, folha e nodal).

Tabela 10. Diâmetro de calos na interação entre diferentes fitorreguladores e explantes de *P. mucronata*. Campos dos Goytacazes - RJ, 2019

Explantes	Fitorreguladores ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	BA	TDZ
Internodal	19,91 bB	47,41 aA
Folha	47,82 aA	52,09 aA
Nodal	13,92 bC	31,88 aB
C.V (%)	14,27	

As médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Dados transformados para $\sqrt{x}+1,0$.

Na análise visual para a calogênese dos explantes submetidos a diferentes concentrações de TDZ, os calos do segmento nodal se mostraram compactos, possuindo coloração verde com diferenciação de algumas estruturas com características intermediárias de broto-folha (Figura 7).

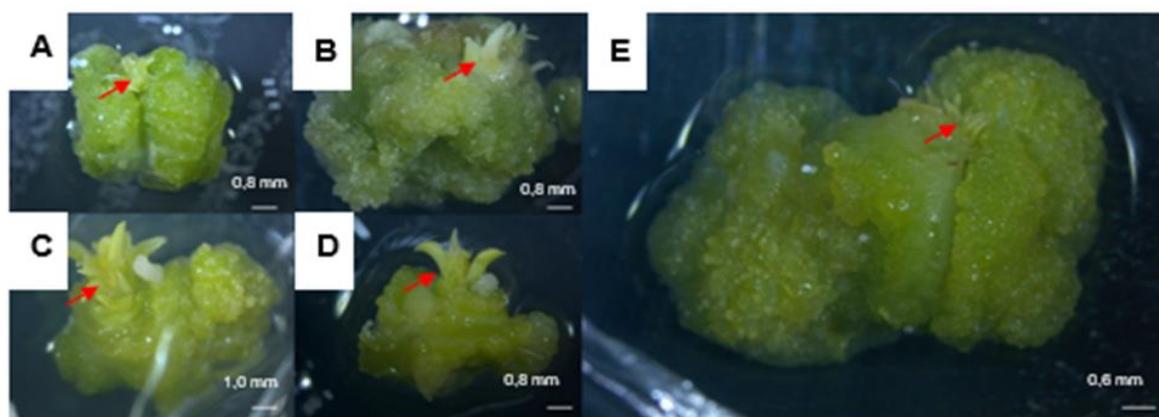


Figura 7. Calogênese e organogênese em segmento nodal de *P. mucronata*, submetidos a diferentes concentrações de thiazuron (TDZ), após 35 dias de indução de morfogênese *in vitro*. (A) TDZ 2,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (B) TDZ 3,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (C) TDZ 4,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) TDZ 5,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (E) TDZ 6,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Setas vermelhas indicam a formação de ápices caulinares.

Os segmentos internodais geraram calos compactos de coloração verde em todas as concentrações de TDZ, mas, não foi possível observar brotações oriundas deste explante (Figura 8).

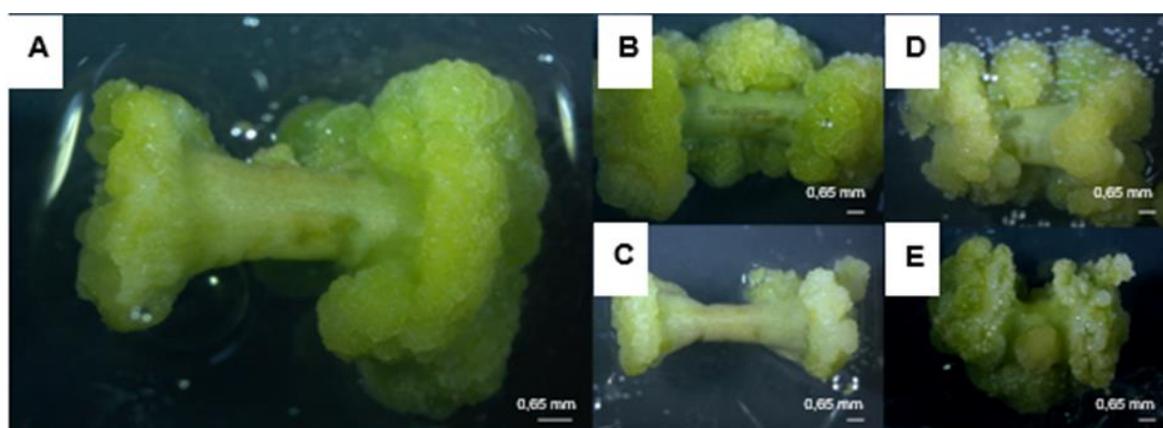


Figura 8. Calogênese em segmento internodal de *P. mucronata*, submetidos a diferentes concentrações de thiazuron (TDZ), após 35 dias de indução de morfogênese *in vitro*. (A) TDZ 2,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (B) TDZ 3,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (C) TDZ 4,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) TDZ 5,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (E) TDZ 6,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os discos foliares usados como explantes, foram capazes de gerar calos nas regiões das extremidades, em todos os tratamentos com TDZ. Na parte central dos discos foliares, não houve resposta sobre a formação de calos em nenhum dos tratamentos. (Figura 9).

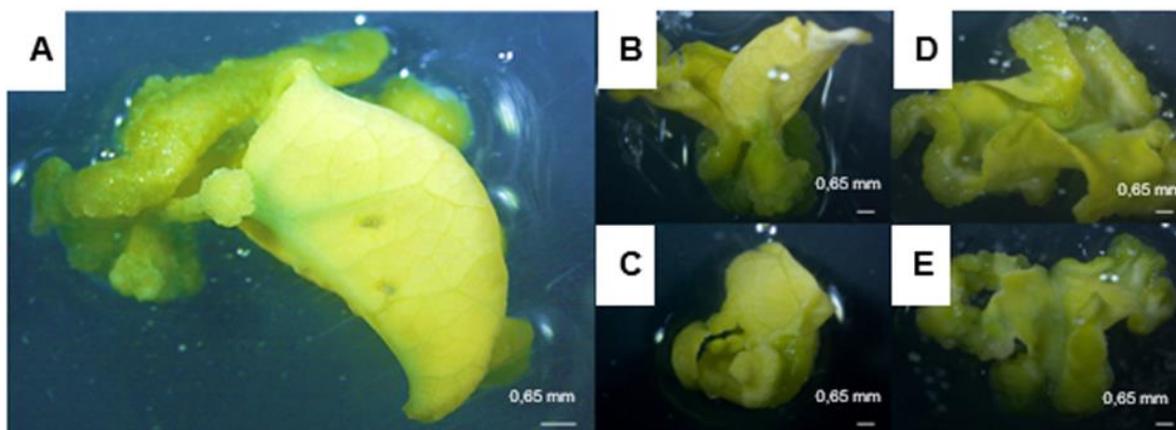


Figura 9. Calogênese em discos de folhas de *P. mucronata*. Submetidos a diferentes concentrações de thidiazuron (TDZ), após 35 dias de indução de morfogênese *in vitro*. (A) TDZ 2,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (B) TDZ 3,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (C) TDZ 4,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) TDZ 5,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (E) TDZ 6,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Na análise visual dos explantes colocados em meio com concentrações diferentes de BA, os segmentos nodais, apresentaram calos verdes, com aspecto compacto. Os explantes colocados nas concentrações mais baixas de BA (2,04; 3,06; 4,08; 5,55 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA) apresentaram estruturas com características de brotações (Figura 10).

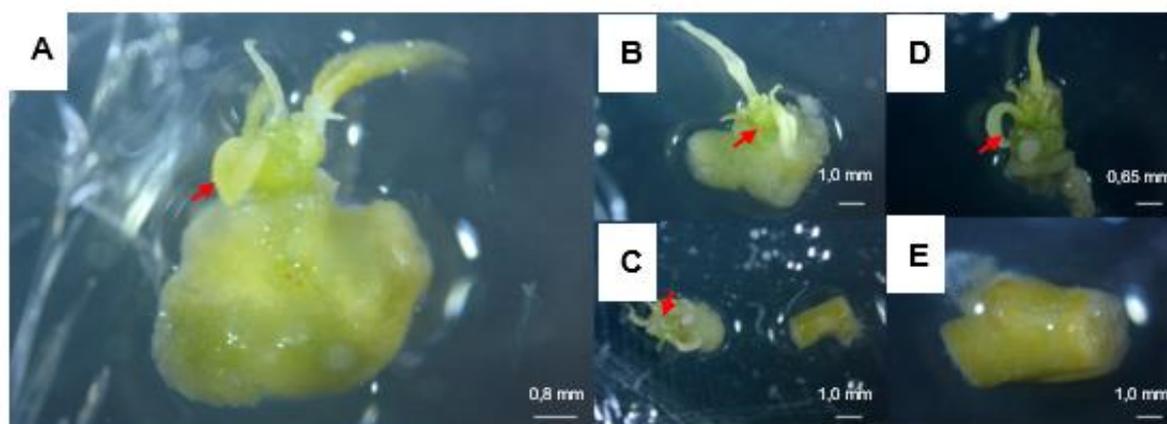


Figura 10. Calogênese em segmento nodal de *P. mucronata* submetidos a diferentes concentrações de 6-benziladenina (BA). Após 35 dias de indução de morfogênese *in vitro*. (A) BA 2,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (B) BA 3,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (C) BA 4,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) BA 5,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (E) BA 6,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Nos segmentos internodais, foi observada uma pequena formação de calos, mantendo o mesmo padrão de resposta observado nos segmentos nodais. Os brotos que apareceram nos tratamentos de 2,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA, são oriundos

das regiões dos nós da planta, e não correspondiam à resposta morfogênica com o uso do fitorregulador (Figura 11).

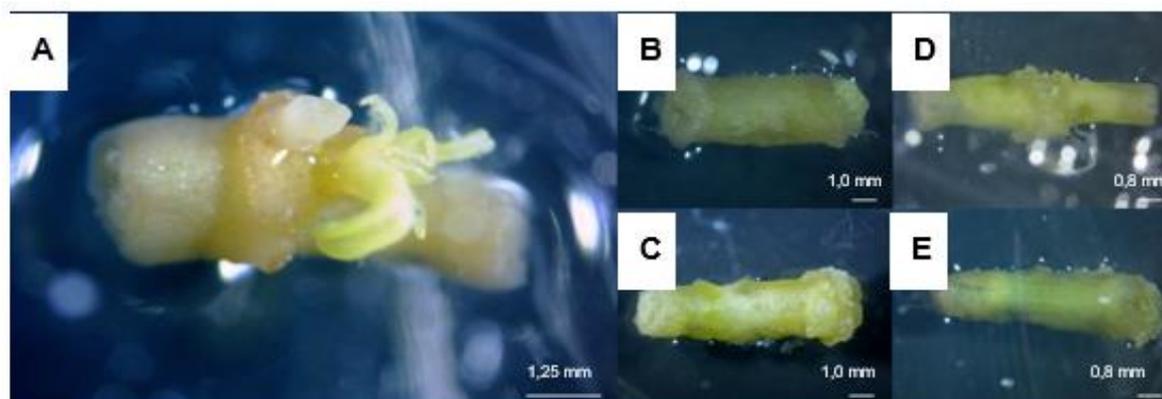


Figura 11. Calogênese em segmento internodal de *P. mucronata*. Submetidos às concentrações de 6-benziladenina (BA). Após 35 dias de indução de morfogênese *in vitro*. (A) BA 2,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (B) BA 3,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (C) BA 4,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) TDZ 5,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (E) BA 6,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

As folhas foram os explantes mais responsivos a calos. Quando colocadas na presença de BA, foram observados calos em todos os tratamentos (2,04; 3,06; 4,08 $\mu\text{M L}^{-1}$ 5,11 6,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de BA) (Figura 12).

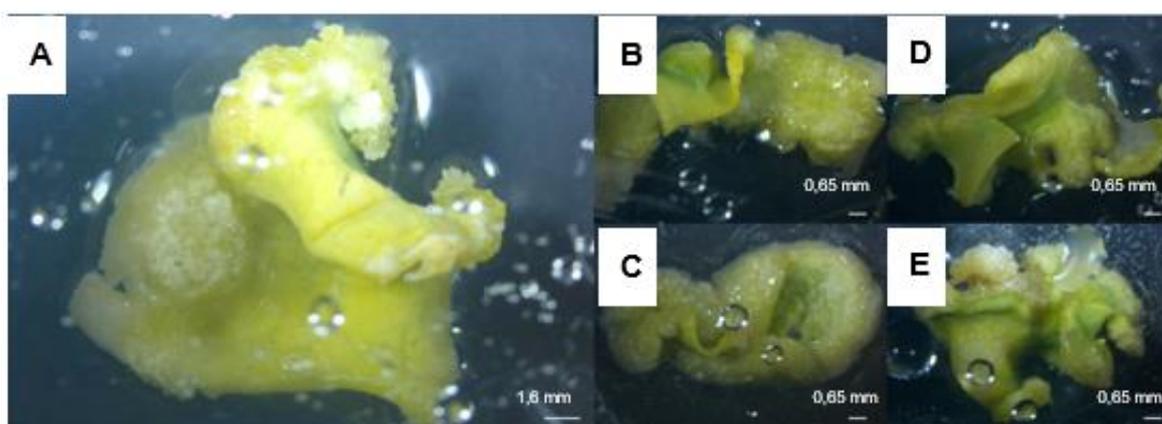


Figura 12. Calogênese em discos foliares *P. mucronata*. Submetidos às concentrações de 6-benziladenina (BA). Após 35 dias de indução de morfogênese *in vitro*. (A) BA 2,04 μM ; (B) BA 3,06 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (C) BA 4,08 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (D) TDZ 5,11 $\mu\text{mol L}^{-1}$; (E) BA 6,13 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A partir das análises visuais descritivas foi possível confirmar os resultados estatísticos, em que o TDZ apresentou efeito maior que o BA na indução de calos nos três explantes utilizados (epicótilo, folha e nodal). Os resultados apresentados neste capítulo, mostram que as espécies de maracujazeiro, apresentam grande

potencial morfogênico e respondem de diferentes formas aos estímulos visando à morfogênese (Soares et al., 2012). Com isso, são necessários estudos em relação ao tipo de explante, fitorreguladores e concentrações dos meios de cultivo necessários para se determinar o protocolo de estabelecimento *in vitro* das espécies aqui relatadas.

4.3.5. CONCLUSÕES

- O TDZ, em todas as concentrações induziu a calogênese em endospermas do híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*, *P. setacea*, *P. edulis* e *P. mucronata*. Obteve-se a formação de brotos apenas na concentração de 4,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TDZ para o híbrido. Nas demais espécies não houve organogênese;
- O TDZ propiciou maior porcentagem de calos em segmentos nodais e intermodais e o BA nos discos foliares em *P. mucronata*;
- Este é o primeiro trabalho envolvendo a morfogênese em *P. mucronata* e no híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre, R. S., Costa, P. R., Chagas, K., Mayrinck, L. G., Detoni, J. L., Schmildt, E. R. (2014) Enraizamento adventício de estacas do maracujazeiro silvestre *Passiflora mucronata* Lam: Forma de veiculação e concentrações do ácido indol-3-butírico¹. *Revista Ceres*, 61 (4):567-571.
- Antoniazzi, C. A., Faria, R. B., Carvalho, P. P., Mikovski, A. I., Carvalho, I. F., Matos, E. M., Otoni, W. C. (2018) *In vitro* regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). *Scientia Horticulturae*, 238:408-415.
- Araújo, L. S. (2017) Morfogênese *in vitro* e criopreservação de *Passiflora setacea* DC. Tese (Mestrado em genética e melhoramento de plantas) –

- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ, 87p.
- Fernando, J. A., Vieira, M. L. C., Machado, S. R., Appezzato-Da-Glória, B. (2007) New insights into the *in vitro* organogenesis process: The case of *Passiflora*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91:37-44.
- Flora do Brasil (2017) *Passiflora* in flora do Brasil 2020 (under construction). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, In: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB12506> em:02/02/2019.
- Junqueira, N. T. V., Lage, D. A. C., Braga, M. D., Peixoto, J. R., Borges, T. A., Andrade, S. R. M. (2006) Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro-azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas herbáceas de passiflora silvestre. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28 (1): 97-100.
- Meletti, L. M. M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33:83-91.
- Monteiro, A. C. B. A., Higashi, E. N., Gonçalves, A. N., Rodriguez, A. P. M. (2000) A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). *In Vitro Cellular e Developmental Biology - Plant*, 36:527-531.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:437-497.
- Pinto, J. F. N., Reis, E. F., Faleiro, F. G., Barbosa, E. C. C., Nunes, H. F., Pinto, J. F. N. (2010) Seleção de descritores vegetativos para caracterização de acessos de guariroba (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32 (3):832-840.
- Rocha, D. I., Vieira, L. M., Tanaka, F. A. O., Silva, L. C., Otoni, W. C. (2012) Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 111:69-78.
- Rosa, Y. B. C. J., Monte-Bello, C. C., Dornelas, M. C. (2016) *In vitro* organogenesis and efficient plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, 52 (1):64-71.

- Santos, T. M., Flores, P. S., Oliveira, S. P., Silva, D. F. P., Bruckner, C. H. (2012) Tempo de armazenamento e métodos de quebra de dormência em sementes do maracujá-de-restinga. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 2 (1):26-31.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., Clarindo, W. R. (2016) The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243 (2):281-296.
- Silva, C.V., Oliveira, L.S., Loriato V.A.P., Silva, L.C., Campos, J.M.S., Viccini, L.F., Oliveira, E.J., Otoni, W.C. (2011) Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passion fruit species, *P. cincinnata* Masters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107: 407-416.
- Soares, W. S., Rêgo, M. M., Rêgo, E. R., Barroso, P. A., Nascimento, K. S., Ferreira, K. T. (2012) Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.), *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14: 138-142.
- Trevisan, F., Mendes B. M. J. (2005) Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Scientia Agricola*. 62 (4):346-350.
- Vieira, L. M., Rocha, D. I., Taquetti, M. F., Silva, L. C., Campos, J. M. S., Viccini, L. F., Otoni, W. C. (2014) *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* D. C. (Passifloraceae): The influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50 (6):738-745.

RESUMO E CONCLUSÕES

A espécie *P. mucronata*, apresenta resistência à morte prematura e a certas doenças causadas por patógenos de solo, representando uma importante alternativa para uso potencial como porta-enxerto e, ou em cruzamentos com *Passiflora edulis* ou outras espécies de interesse econômico. Entretanto, a falta de informação científica quanto a diversidade, compatibilidade genética, fenologia, formas de propagação e de cultivo, potencial medicinal, ataque de pragas e doenças, biologia reprodutiva, armazenamento e germinação de sementes, torna mais difícil a utilização de *P. mucronata* em programas de melhoramento genético vegetal. Com isso, buscou-se investigar por meio deste trabalho a diversidade genética em *Passiflora* spp. por meio da fenotipagem digital, a germinação *in vitro* e *ex vitro* de dez populações de *P. mucronata* e o tipo de explante (endosperma, epicótilo, segmento nodal ou folha) com a maior capacidade de regeneração de plantas *in vitro*. A partir do estudo realizado, conclui-se que:

- As variáveis fenotípicas das sementes, geradas pelo sistema GroundEye®, foram eficientes para quantificar a diversidade genética entre as diferentes populações de *Passiflora*
- Em *Passiflora mucronata*, para obtenção de uma alta porcentagem de germinação de plântulas normais é necessário o cultivo *in vitro* de embriões isolados;
- Este é o primeiro trabalho que relata a regeneração de brotações a partir de endospermas para o híbrido de *P. edulis* 'UENF Rio Dourado' x *P. setacea* e *P. mucronata*;

- Estes resultados são os primeiros relatos de caracterização morfológica de sementes, germinação e regeneração *in vitro* em diferentes populações de *P. mucronata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABF - Anuário brasileiro de fruticultura (2015) Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2015. 108 p.
- Aguiar, D., Santos, C. D. (2001) Importância econômica e mercado. *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. 1. ed. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 9-32.
- Alexandre, R. S., Costa, P. R., Chagas, K., Mayrinck, L. G., Detoni, J. L., Schmidt, E. R. (2014) Enraizamento adventício de estacas do maracujazeiro silvestre *Passiflora mucronata* Lam: Forma de veiculação e concentrações do ácido indol-3-butírico¹. *Revista Ceres*, 61 (4):567-571.
- Alexandre, R. S., Couto, F. A. A., Dias, J. M. M., Otoni, W. C., Cecon, P. R., Gomes, S. B. S. (2009) Factors affecting *in vitro* germination of passion fruit seeds. *Plant Cell Culture and Micropropagation*, 5 (1):27-35.
- Alexandre, R. S., Lopes, J. C., Tiradentes, A. T., Bruckner, C. H., Otoni, W. C. (2013) Methodology of minigrafting on passion fruits. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35 (1):333-337.
- Andrade D. B., Oliveira A. S., Pinto C. A. G., Pires R. M. O., Oliveira, A. S., Silva, M. A., Carvalho, M. L. M. (2016) Detection of green seeds in soybean lots by the seed analysis system (SAS). *International Journal of Current Research*. 8 (2):26462-26465.
- Andrade, D. B. D. E. (2014). Sistema de análise de sementes (SAS) na detecção de misturas varietais e de sementes esverdeadas de soja. Tese (Mestrado em Fitotecia) – Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras – UFLA, 79p.

- Antoniazzi, C. A., Faria, R. B., Carvalho, P. P., Mikovski, A. I., Carvalho, I. F., Matos, E. M., Otoni, W. C. (2018) *In vitro* regeneration of triploid plants from mature endosperm culture of commercial passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). *Scientia Horticulturae*, 238:408-415.
- Araújo, L. S. (2017) Morfogênese *in vitro* e criopreservação de *Passiflora setacea* DC. Tese (Mestrado em genética e melhoramento de plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes – RJ, 87p.
- Barros, A., Andrade Ribas, L., Araujo, D. (2009) Trepadeiras do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia*, 60 (3):681-694.
- Bernacci, L. C., Soares-Scott, M. D., Junqueira, N. T. V., Passos, I. R. D. S., Meletti, L. M. M. (2008) *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30 (2):566-576.
- Boscolo, O. H., Valle, L. S. (2008) Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia. Série Botânica*, 63 (2):263-278.
- Brasil. (2009) Regras para análise de sementes/ Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária- Brasília: Mapa/ACS, 395p.
- Bridgen, M. P. (1994) A review of plant embryo culture. *HortScience*, 29:1243-1246.
- Cardoso, D. L., Silva, R. F., Pereira, M. G., Viana, A.P., Araújo, E. F. (2009) Diversidade genética e parâmetros genéticos relacionados à qualidade fisiológica de sementes em germoplasma de mamoeiro. *Revista Ceres*, 56:5-572.
- Carrer, H., Barbosa, A. L., Ramiro, D. A. (2010) Biotecnologia na agricultura. *Estudos Avançados*, 24 (70):149-164.
- Carvalho, A. C. P. P. (2011) *Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil*. Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E). Fortaleza, Ceará, 37p.
- Carvalho, J. M. F. C., Araújo, S. D. S. (2007) *Aplicação do cultivo de embrião zigótico ou imaturo no melhoramento vegetal*. Embrapa Algodão, Campina Grande, Paraíba, 35p.

- Cervi, A. C. (1997) Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora*. *Fontqueira*, 45:1-92.
- Cervi, A.C. (2006) O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil, espécies descritas após o ano de 1950. *Adumbrationes ad Summae Editionem*, 39: 43-129.
- Chaves, R. D. C., Junqueira, N. T. V., Manica, I., Peixoto, J. R., Pereira, A. V., Fialho, J. F. (2004) Enxertia de maracujazeiro-azedo em estacas herbáceas enraizadas de espécies de passifloras nativas. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26 (1):120-123.
- Costa, A. M., Cardoso, E., da Silva, J. R., Padua, J., Faleiro, F.G., Pereira, R., Campos, G. (2016). *Produção de mudas de maracujazeiro silvestre (Passiflora setacea)*. Embrapa Cerrados-Comunicado Técnico (INFOTECA-E). Planaltina, Distrito Federal, 6p.
- Costa, A. M., Tupinambá, D. (2005). 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*. Plantina-DF, Embrapa Cerrados – DF, p.475-508.
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J., Carneiro, P. C. S. (2004) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 3. ed. Viçosa: UFV, 480p.
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J., Carneiro, P. C. S. (2012) Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 4. ed. Viçosa: UFV, 514p.
- Dhawan, K., Dhawan, S., Sharma, A. (2004) *Passiflora*: A review update. *Journal of Ethnopharmacology*, 94 (1):1-23.
- Ellis, R. H., Hong, T. D., Roberts, E. H. (1985) Handbook for Seed Technology for Genebanks, 2. ed. Compendium of Specific Germination, Information and Test Recommendations. Rome: International Board for Plant Genetic Resources-IBPGR, 456p.
- Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (2005) Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro – Desafios da pesquisa. *In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (eds.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planatina - DF: Embrapa Cerrados, p.187-210.

- Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F., de Oliveira, E. J., Peixoto, J. R., Costa, A. M. (2011) *Germoplasma e melhoramento genético do maracujá-histórico e perspectivas*. 1.ed. Planaltina – DF: Embrapa Cerrados, 36p.
- Faria, G. A., Costa, M. A. P. C., Ledo, C. A. S., Junghans, T. G., Souza, A. S., Cunha, M. A. P. (2007) Meio de cultura e tipo de explante no estabelecimento *in vitro* de espécies de maracujazeiro. *Bragantia*, 66 (4):535-543.
- Felismino, D. C. (2005) Avaliação morfológica e histológica da resposta morfogênica *in vitro* de segmentos hipocotiledonares de maracujazeiro influenciada pela posição, orientação e polaridade. Tese (Doutorado em fitotecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 112p.
- Fernando, J. A., Vieira, M. L. C., Machado, S. R., Appezzato, G. B. (2007) New insights into the *in vitro* organogenesis process: The case of *Passiflora*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91:37-44.
- Ferreira, A. F. N., Krause, W., Faleiro, A. C., Miranda, A. F., Acha, A. J. (2018) Seleção de descritores de sementes de Macarujazeiro azedo utilizado fenotipagem digital. *Agrarian Academy*, 5:181-190.
- Ferreira, D. F. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 5 (6):1039-1042.
- Ferreira, F. (2005) Recursos genéticos de *Passiflora*. In: Faleiro, F. G., Junqueira, N. T. V., Braga, M. F. (eds.). *Maracujá: germoplasma e melhoramento genético*. Planaltina-DF: Embrapa, p. 41–52.
- Feuillet C. (2004) *Passiflora phellos*, a new species in subgenus *Passiflora* (Passifloraceae). *Novon*, 14 (3):285-287.
- Fiorani, F., Schurr, U. (2013) Future scenarios for plant phenotyping. *Annual Review of Plant Biology*, 64:267-91.
- Fischer, I. H., Almeida, A. D., Fileti, M. D. S., Bertani, R. D. A., Arruda, M. D., Bueno, C. J. (2010) Avaliação de passifloráceas, fungicidas e *Trichoderma* para o manejo da podridão-do-colo do maracujazeiro, causada por *Nectria haematococca*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32 (3):709-717.
- Fischer, I. H., Rezende, J. A., Naldi F. N., Silva, J. R. D. (2005) Occurrence of *Nectria haematococca* in passion fruit in the State Rio de Janeiro and resistance of *Passiflora mucronata* to the pathogen. *Fitopatologia Brasileira*, 30 (6):671-671.

- Flora do Brasil (2017) *Passiflora* in flora do Brasil 2020 (under construction). Jardim Botânico do Rio de Janeiro, In: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB12506> em:02/02/2019.
- Fowler, A. J. P., Bianchetti, A. (2000). Dormência em sementes florestais. *Embrapa Florestas documentos*, 40. ed. Curitiba, 27p.
- Franca, J. M., Venial, L. R., Costa, E. B., Schmildt, E. R., Schmildt, B. P. M., Alexandre, R. S. (2018) Morphophysiology, Phenotypic and Molecular Diversity of Auxin-induced *Passiflora mucronata* Lam. (Passifloraceae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90 (2):1799-1814.
- Freitas, J. P. X., Oliveira, E. J., Cruz Neto, A. J., Santos, L. R. (2011) Avaliação de recursos genéticos de maracujazeiro-amarelo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46 (9):1013-1020.
- Generoso, A. L. (2018) Conservação e Cultivo *in vitro* de embriões de Maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims). Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de plantas) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 184p.
- Godoy, R. C. B., Ledo, C. A. D. S., Santos, A. P., Matos, E. L. S., Lima, A. D. A., Waszczyński, N. (2015) Diversidade genética entre acessos de maracujazeiro amarelo avaliada pelas características físico-químicas dos frutos. *Ceres*, 54 (316):541-547.
- Guimarães Silva, D. F., de Jesus Coelho, C., Romanek, C., Gardingo, J. R., da Silva, A. R., Graczyki, B. L., Rodrigues M. R. (2016) Dissimilaridade genética e definição de grupos de recombinação em progênies de meios-irmãos de milho-verde. *Bragantia*, 75 (4):401-410.
- Gustin, J. L.; Settles, A. M. (2015). Seed phenomics. In: Fritsche-Neto, R. Borém, A. Phenomics: How Next-Generation Phenotyping is Revolutionizing Plant Breeding. Viçosa, 1:65-79.
- IBRAF: Instituto Brasileiro de Frutas, (2016). Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/detalhe.aspx?id=1> em 20/10/2018.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2018) Produção Agrícola Municipal - PAM. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9117-producao-agricola>

- municipal-culturas-temporarias-e-permanentes.html?=&t=resultados em 10/01/2019.
- Junqueira, N. T. V., Braga, M. F., Faleiro, F. G., Peixoto, J. R., Bernacci, L. C. (2005) Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência a doenças. *Maracujá: Germoplasma e Melhoramento Genético*, 1 (4):79-108.
- Junqueira, N. T. V., Lage, D. A. C., Braga, M. D., Peixoto, J. R., Borges, T. A., Andrade, S. R. M. (2006) Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro-azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas herbáceas de passiflora silvestre. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28 (1): 97-100.
- Khatchaturian, O., Padilha, F. R. R. (2008) Reconhecimento de variedades de soja por meio do processamento de imagens digitais usando redes neurais artificiais. *Engenharia Agrícola*, 28 (4):759-769.
- Krause, W., Viana, A. P., Cavalcante, N. R., Ambrósio, M., Santos, E. A., Vieira, H. D. (2017) Digital phenotyping for quantification of genetic diversity in inbred guava (*Psidium guajava*) families. *Genet Mol Res*, 16 (1):1-11.
- Lima, A. A., Cunha, M. A. P. (2004) Práticas culturais. In: Lima, A. A., Cunha, M. A. P. *Maracujá: produção e qualidade na passicultura*, Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p.169-178.
- Lorenzi, H., Bacher, L., Lacerda, M., Sartori, S. (2006) Frutas brasileiras e exóticas cultivadas. 1. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 640p.
- Magnago, L. F. S., Martins, S. V., Pereira, O. J. (2011) Heterogeneidade florística das fitocenoses de restingas nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, Brasil. *Revista Árvore*, 35 (2):245-254.
- Maguire, J. D. (1962) Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2 (2):176-177.
- Manzur, J. P., Calvache-Asensio, M. N., Rodriguez-Burruezo, A. (2014) Growth regulators and darkness increase efficiency in *in vitro* culture of immature embryos from peppers. *Scientia Agrícola*, 71 (6):488-493.
- Marlière, L. D. P., Ribeiro, A. Q., Brandão, M. G. L., Klein, C. H., Acurcio, F. A. (2008) Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. *Revista Brasileira de*

Farmacognosia, 18:754-760.

- Meletti, L. M. M. (2011) Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33:83-91.
- Meletti, L. M. M., Bruckner, C. H. (2001) Melhoramento Genético. In: Bruckner, C.H. Picanço, M. C. *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria e mercado*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1:345-385.
- Meletti, L. M. M., Furlani, P. R., Álvares, V., Soares-Scott, M. D., Bernacci, L. C., Azevedo Filho, J. A. (2002) Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. *O Agrônomo*, 54 (1):30-33.
- Meletti, L. M. M., Soares-Scott, M. D., Bernacci, L. C., Alvares, V., Azevedo F. J. A. (2011) Caracterização de *Passiflora mucronata* Lam. Nova alternativa de maracujá ornamental. *Ornamental Horticulture*, 17 (1):87-95.
- Monteiro, A. C. B. A., Higashi, E. N., Gonçalves, A. N., Rodriguez, A. P. M. (2000) A novel approach for the definition of the inorganic medium components for micropropagation of yellow passionfruit (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). *In Vitro Cellular e Developmental Biology - Plant*, 36:527-531.
- Moran, R. M. J. (1978) Multiplication végétative, *in vitro*, des bourgeons axillaires de *Passiflora edulis* var. *Flavicarpa* Degener et de *P. molissima* Bailey. *Fruits*, 33:693-699.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15:437-497.
- Muschner, V. C., Zamberlan, P. M., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2012) Phylogeny, biogeography and divergence times in *Passiflora* (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 35 (4):1036-1043.
- Nakayama, F. (1966) Cultivo *in vitro* de tecidos de *Passiflora caerulea*. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata*, 42:63-74.
- Negreiros, J. R. D. S., Wagner J. A., Álvares, V. D. S., Nunes, E. S., Alexandre, R. S., Pimentel, L. D., Bruckner, C. H. (2006) Influência do estágio de maturação e do armazenamento pós-colheita na germinação e desenvolvimento inicial do maracujazeiro-amarelo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 28 (1):21-24.
- Oliari, L. S., Giles, J. A. D., Mayrinck, L. G., Oliveira, J. P. B., Lopes, J. C., Otoni, W. C., Alexandre, R. S. (2016) Mini-grafting of adult *Passiflora edulis* Sims

- flavicarpa Deg. scions onto vegetatively propagated adult rootstocks of *P. mucronata* Lam. *Australian Journal of Crop Science*, 10 (4):490-496.
- Oliveira, J. A., Junqueira, N. T. V., Peixoto, J. R. (2002) Efeito dos substratos artificiais no enraizamento e no desenvolvimento de estacas de maracujazeiro-azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24 (2):505-508.
- Padúa, J. G., Schwingel, L. C., Mundim, R. C., Salomão, A. N., Roverijósé, S. C. (2012) Germinação de sementes de *Passiflora setacea* e dormência induzida pelo armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, 33 (1):80-85.
- Paula, M. D. S., Fonseca, M. D. N., Boiteux, L. S., Peixoto, J. R. (2010) Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32 (1):222-229.
- Pessanha, P. D. O., Viana, A. P., Junior, A. T. A., Souza, R. D., Teixeira, M. C., Pereira, M. G. (2011) Avaliação da Diversidade Genética em Acessos de *Psidium* ssp. Via marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, 33 (1):129-136.
- Pinto, A. P. C. (2010). Transformação genética de maracujazeiro (*Passiflora alata* Curtis) para resistência ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Tese (Mestrado em ciências) – Piracicaba – SP, Universidade de São Paulo – USP, 64p.
- Pinto, C. A. G., Carvalho, M. L. M., Andrade, D. B., Leite, E. R., Chalfoun, I. (2015) Image analysis in the evaluation of the physiological potential of maize seeds. *Revista Ciência Agronômica*, 46 (2):319-328.
- Pinto, J. F. N., Reis, E. F., Faleiro, F. G., Barbosa, E. C. C., Nunes, H. F., Pinto, J. F. N. (2010) Seleção de descritores vegetativos para caracterização de acessos de guariroba (*Syagrus oleracea* (Mart.) Becc.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32 (3):832-840.
- Raghavan, V. (2003) One hundred years of zygotic embryo culture investigations. *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, 39 (5):437-442.
- Raghavan, V., Torrey, J. G. (1964) Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of capsella in culture. *Plant Physiol*, 39 (4):691-699.

- Rocha, D. I., Vieira, L. M., Tanaka, F. A. O., Silva, L. C., Otoni, W. C. (2012) Anatomical and ultrastructural analyses of *in vitro* organogenesis from root explants of commercial passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 111:69-78.
- Rosa, Y. B. C. J., Monte-Bello, C. C., Dornelas, M. C. (2016) *In vitro* organogenesis and efficient plant regeneration from root explants of *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant*, 52 (1):64-71.
- Santos, E. A., Viana, A. P., Freitas, J. C. O., Souza, M. M., Paiva, C. L., Rodrigues, D.L., Tavares, R. F. (2014) Phenotyping of *Passiflora edulis*, *P. setacea*, and their hybrids by a multivariate approach. *Genetics and Molecular Research*, 13 (4):9828-984.
- Santos, T. M., Flores, P. S., Oliveira, S. P., Silva, D. F. P., Bruckner, C. H. (2012) Tempo de armazenamento e métodos de quebra de dormência em sementes do maracujá-de-restinga. *Revista Brasileiro de Agropecuária Sustentável*, 2 (1):26-31.
- Santos, T. M., Flores, P. S., Oliveira, S. P., Silva, D. F. P., Bruckner, C. H. (2012) Tempo de armazenamento e métodos de quebra de dormência em sementes do maracujá-de-restinga. *Revista Brasileiro de Agropecuária Sustentável*, 2 (1):26-31.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R., Clarindo, W. R. (2016) The polyploidy and its key role in plant breeding. *Planta*, 243 (2):281-296.
- Shekhawat, M. S., Manokari, M., Ravindran, C. P. (2015) An improved micropropagation protocol by *ex vitro* rooting of *Passiflora edulis* Sims. *F. flavicarpa* Deg. through nodal segment culture. *Scientifica*, 2015:1-8.
- Short, P. S. (2011). *Passifloraceae*. In: Short, P. S: Cowie, I. D. (Eds.) *Flora of the Darwin Region*. Palmerston: Northern Territory Herbarium, Department of Natural Resources, Environment, the Arts and Sport, 1:1–5.
- Silva, C. V., Oliveira, L. S., Loriato V. A. P., Silva, L. C., Campos, J. M. S. Viccini, L. F., Oliveira, E. J., Otoni, W. C. (2011) Organogenesis from root explants of commercial populations of *Passiflora edulis* Sims and a wild passion fruit species, *P. cincinnata* Masters. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107: 407-416.

- Silva, F. H. L., Viana, A. P., Ferreira R. T., Freitas, J. C. O., Santos, J. O., Rodrigues, D. L. (2014) Measurement of genetic diversity in progênies of sour passion fruit by Ward-MLM methodology: A strategy for heterotic group formation. *Ciência e Agrotecnologia*, 38 (3):240-246.
- Skoog, F., Miller, C. O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia Society of Experimental Biology*, 11:118-231.
- Soares, A. L. C. (2013) Multiplicação, enraizamento e conservação *in vitro* de maracujazeiro nativo. Tese (Mestrado em Fisiologia vegetal) – Lavras – MG, Universidade Federal de Lavras – UFLA, 86p.
- Soares, W. S., Rêgo, M. M., Rêgo, E. R., Barroso, P. A., Nascimento, K. S., Ferreira, K. T. (2012) Estabelecimento *in vitro* e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L.), *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14: 138-142.
- Souza, J. D., Meletti, L. M. M. (1997) Maracujá: espécies, variedades, cultivo. 3. ed. Piracicaba – SP, 179p.
- Souza, M. M., Pereira, T. N. S., Silva, L. C., Reis, D. S. S., Sudré, C. P. (2003) Karytype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro. *Cytologia*, 68 (2):165-172.
- Souza, V. C., Lorenzi, H. (2012) Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. São Paulo, Nova Odessa, Instituto Plantarum. 704p.
- Suassuna, T. M. F., Bruckner, C. H., Carvalho, C. R., Borém, A. (2003) Self-incompatibility in passion fruit: Evidence of gametophytic-sporophytic control. *Theoretical and Applied Genetics*, 106 (2):298-302.
- Torres, G. X. (2018) Diversidade genética em população segregante de *Passiflora* via características de sementes. Tese (Mestrado em Produção vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 82p.
- Trevisan, F., Mendes B. M. J. (2005) Optimization of *in vitro* organogenesis in passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Scientia Agricola*. 62 (4):346-350.

- Tsuboi, H., Nakagawa, J. (1992) Efeito da escarificação por lixa, ácido sulfúrico e água quente na germinação de sementes de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* F. *flavicarpa* Deg.). *Científica*, 20:63-72.
- Ulmer, T., Macdougall, J. M. (2004) *Passiflora: Passionflowers of the world*. 1. ed. Portland: Timber Press, 432p.
- Vieira, L. M., Rocha, D. I., Taquetti, M. F., Silva, L. C., Campos, J. M. S., Viccini, L. F., Otoni, W. C. (2014) *In vitro* plant regeneration of *Passiflora setacea* D. C. (Passifloraceae): The influence of explant type, growth regulators, and incubation conditions. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 50 (6):738-745.
- Walter, R., Carvalho, V.S., Generoso, A.L., Rodrigues, R., Gravina, G. A. (2018) Cultivation of immature *Capsicum* spp. embryos for incompatible-crossing embryo rescue. *Acta Scientiarum Agronomy*, 40:1-8.
- Zucareli, V., Ferreira, G., Amaro, A. C. E., Araújo, F. P. D. (2009) Fotoperíodo, temperatura e reguladores vegetais na germinação de sementes de *Passiflora cincinnata* Mast. *Revista Brasileira de Sementes*, 31 (3):106-114.
- Zucareli, V., Ono, E. O., Ferreira, G., Krohn, N. G. (2014) Germinação de sementes de maracujazeiros: água, luz, temperatura e reguladores vegetais. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 3:98-113.

APÊNDICE

Tabela 1A. Estimativas da contribuição relativa de cada característica (S_j) para a divergência genética para variáveis de cor de sementes fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini, de 12 populações de *Passiflora* spp.

Variável	S _j	Valor em %
Abaixo do Otsu: Canal azul	154529.469198	4,55
Abaixo do Otsu: Canal verde	198538.239542	5,84
Abaixo do Otsu: Canal vermelho	218840.026991	6,44
Abaixo do Otsu: CIELab: a	7765.278729	0,22
Abaixo do Otsu: CIELab: b	41454.8658	1,22
Abaixo do Otsu: CIELab: L	135428.020959	3,98
Acima do Otsu: Canal azul	99270.089329	2,92
Acima do Otsu: Canal verde	80541.222143	2,37
Acima do Otsu: Canal vermelho	202146.384718	5,95
Acima do Otsu: CIELab: a	32180.630484	0,94
Acima do Otsu: CIELab: b	312440.34459	9,20
Acima do Otsu: CIELab: L	198405.98197	5,84
Brilho	8543.506214	0,25
CIELab: b	56352.174634	1,65
CIELab: Concentração	34494.208378	1,01
CIELab: Dispersão	174014.996142	5,12
CIELab: Dispersão de a	29514.553273	0,86
CIELab: Dispersão de b	150700.262659	4,43
CIELab: Dispersão de L	207586.380179	6,11
CIELab: L	219480.233455	6,46
Concentração da matiz	198403.431222	5,84
Dominância laranja	65621.425103	1,93
Dominância preta	40962.123031	1,20
Dominância vermelha	19296.133483	0,56
Intensidade	6065.406795	0,17
Luma	5732.164869	0,16
Luminosidade	9921.83399	0,29
Matiz	7128.55776	0,20
Média: Canal azul	9271.472982	0,27
Média: Canal verde	72367.510855	2,13
Média: Canal vermelho	45125.111735	1,32
Predominante: Canal azul	95323.400594	2,80
Predominante: Canal verde	172473.435993	5,07
Predominante: Canal vermelho	31655.507338	0,93
Cor: Saturação	28958.340018	0,85
Variância da matiz	25196.655559	0,74

Tabela 2A. Estimativas da contribuição relativa de cada característica (S_j) para a divergência genética para variáveis de geometria de sementes fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini, de 12 população de *Passiflora* spp.

Variável	S _j	Valor em %
Afinamento	38345.423645	2,75
Área	52609.281343	3,77
Área convexa	11554.793329	0,82
Circularidade	13026.211817	0,93
Circularidade por fator de forma	17391.458432	1,24
Circularidade por FFCg	27243.279038	1,95
Circularidade por FFCm	4576.446476	0,32
Complexidade da forma	5224.256388	0,37
Compressão	6179.206058	0,44
Convexidade do contorno	18840.246321	1,35
Deformação do contorno	46646.720507	3,34
Diâmetro contido	89388.139032	6,41
Diâmetro de Feret	131533.770204	9,44
Diâmetro máximo	70350.475391	5,04
Diâmetro máximo lateral	4633.522388	0,33
Diâmetro mínimo	6235.637632	0,44
Distâncias convexas	12183.270153	0,87
Esfericidade da forma	541.542673	0,03
Esfericidade da forma modificada	9976.745698	0,71
Extensão	383.963058	0,02
Índice de variação vertical	651.47926	0,04
Irregularidade do contorno	11422.146425	0,81
Mudança de segmentos de retas no perímetro	1865.604233	0,13
Mudança no perímetro	91.205346	0,00
Número de lacunas	237.420235	0,01
Número de quinas por Harris	18089.276067	1,29
Número de quinas por Susan	2731.661851	0,19
Perímetro	52285.880625	3,75
Perímetro convexo	81896.653629	5,87
Quociente de aspecto	5316.922058	0,38
Rácio de modificação	9973.580567	0,71
Retângulos circunscritos: Área média	39197.867904	2,81
Retângulos circunscritos: Lado oposto à maior aresta	24746.97538	1,77
Retângulos circunscritos: Lado oposto à menor aresta	20539.817926	1,47
Retângulos circunscritos: Maior área	21937.45313	1,57
Retângulos circunscritos: Maior aresta	38332.952203	2,75
Retângulos circunscritos: Maior perímetro	159652.991052	11,45
Retângulos circunscritos: Média das maiores arestas	145389.749363	10,43
Retângulos circunscritos: Média das menores arestas	1153.185158	0,08
Retângulos circunscritos: Menor área	28038.568837	2,01
Retângulos circunscritos: Menor aresta	2181.173899	0,15
Retângulos circunscritos: Menor perímetro	56207.122919	4,03
Retângulos circunscritos: Perímetro médio	78114.43748	5,60
Solidez do contorno	9553.783495	0,68
SURF	10132.053713	0,72
Variância elíptica	6642.251539	0,47

Tabela 3A. Estimativas da contribuição relativa de cada característica (S_j) para a divergência genética para variáveis de histograma de sementes fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini, de 12 populações de *Passiflora* spp.

Variável	S _j	Valor em %
Azul: Cumes	14013101.393198	0,06
Azul: Desvio padrão	144936479.921642	0,63
Azul: Entropia	5735644.768677	0,02
Azul: Índice máximo	29426775.034579	0,12
Azul: Média	218493631.1711	0,95
Azul: Mediana	31445214.02608	0,13
Azul: Valor máximo	358367.492144	0,00
Azul: Variância	1181286455.551122	5,14
HSL: Luminosidade: Cumes	6243491.122413	0,02
HSL: Luminosidade: Desvio padrão	24728199.142655	0,10
HSL: Luminosidade: Entropia	530928.638112	0,00
HSL: Luminosidade: Índice máximo	194569640.128887	0,84
HSL: Luminosidade: Média	123247146.046762	0,53
HSL: Luminosidade: Mediana	310455578.666397	1,35
HSL: Luminosidade: Valor máximo	464695.440604	0,00
HSL: Luminosidade: Variância	724660646.50019	3,15
HSL: Matiz: Cumes	69331343.807314	0,30
HSL: Matiz: Desvio padrão	1050712758.024666	4,57
HSL: Matiz: Entropia	7280235.447075	0,03
HSL: Matiz: Índice máximo	4219429.447548	0,01
HSL: Matiz: Índice mínimo	35641587.161971	0,15
HSL: Matiz: Média	443834536.617384	1,93
HSL: Matiz: Mediana	39946903.105422	0,17
HSL: Matiz: Valor máximo	554158.267652	0,00
HSL: Matiz: Variância	1426490473.364367	6,21
HSL: Saturação: Cumes	72630029.204341	0,31
HSL: Saturação: Desvio padrão	137364044.520099	0,59
HSL: Saturação: Entropia	9767367.33141	0,04
HSL: Saturação: Índice máximo	252788878.103362	1,10
HSL: Saturação: Índice mínimo	212794.95564	0,00
HSL: Saturação: Média	123165838.857171	0,53
HSL: Saturação: Mediana	235160830.127038	1,02
133	4177.005818	0,00
HSL: Saturação: Variância	312254334.755783	1,35
LBP: Cumes	434824.965487	0,00
LBP: Desvio padrão	50757439.605026	0,22
LBP: Entropia	465949.805031	0,00
LBP: Índice máximo	30490908.959984	0,13
LBP: Índice mínimo	2426176.90152	0,01
LBP: Média	65870493.349587	0,28
LBP: Mediana	42275818.361531	0,18
LBP: Valor máximo	467381.223323	0,00
LBP: Variância	72514428.043013	0,31
LPQ: Cumes	8542117.606123	0,03
LPQ: Desvio padrão	112316.415655	0,00
LPQ: Entropia	24920.557548	0,00
LPQ: Índice máximo	2954481.662686	0,01
LPQ: Índice mínimo	8669945.318359	0,03
LPQ: Média	366259.119953	0,00
LPQ: Mediana	2959071.484032	0,01

Tabela 3A, Cont.

LPQ: Valor máximo	5997.292242	0,00
LPQ: Variância	5070396.434271	0,02
Luminância: Cumes	12007831.530498	0,05
Luminância: Desvio padrão	106367479.700301	0,46
Luminância: Entropia	3904941.660447	0,01
Luminância: Índice máximo	212670547.403316	0,92
Luminância: Média	302933420.565612	1,31
Luminância: Mediana	188165057.945074	0,81
Luminância: Valor máximo	252767.49413	0,00
Luminância: Variância	418842206.886818	1,82
NDLPQ: Cumes	13265656.52133	0,05
NDLPQ: Desvio padrão	10531722.630468	0,04
NDLPQ: Entropia	1981461.630745	0,00
NDLPQ: Índice máximo	1928580.775989	0,00
NDLPQ: Índice mínimo	14495734.512677	0,06
NDLPQ: Média	4039070.758001	0,01
NDLPQ: Mediana	19237597.605405	0,08
NDLPQ: Valor máximo	99979.54228	0,00
NDLPQ: Variância	34643280.331479	0,15
Verde: Cumes	9877225.885635	0,04
Verde: Desvio padrão	25744649.070591	0,11
Verde: Entropia	8415628.605458	0,03
Verde: Índice máximo	247477948.256352	1,07
Verde: Média	107728710.116308	0,46
Verde: Mediana	11134707.668035	0,04
Verde: Valor máximo	64108.570571	0,00
Verde: Variância	1051093108.071473	4,57
Vermelho: Cumes	12617133.699286	0,05
Vermelho: Desvio padrão	48398718.415746	0,21
Vermelho: Entropia	4524545.694687	0,01
Vermelho: Índice máximo	130293433.282578	0,56
Vermelho: Média	152836526.04296	0,66
Vermelho: Mediana	117386427.675196	0,51
Vermelho: Valor máximo	599735.84526	0,00
Vermelho: Variância	1860167470.362223	8,10
YCbCr: Brilho: Cumes	4944655.31695	0,02
YCbCr: Brilho: Desvio padrão	65900701.654944	0,28
YCbCr: Brilho: Entropia	1502588.38533	0,00
YCbCr: Brilho: Índice máximo	298135155.374167	1,29
YCbCr: Brilho: Média	282104669.365628	1,22
YCbCr: Brilho: Mediana	211868812.363416	0,92
YCbCr: Brilho: Valor máximo	87307.578172	0,00
YCbCr: Brilho: Variância	2264577023.068464	9,86
YCbCr: Intensidade do azul: Cumes	1011150.919715	0,00
YCbCr: Intensidade do azul: Desvio padrão	86788814.148391	0,37
YCbCr: Intensidade do azul: Entropia	1129097.437284	0,00
YCbCr: Intensidade do azul: Índice máximo	155179423.388814	0,67
YCbCr: Intensidade do azul: Média	121356495.863599	0,52
YCbCr: Intensidade do azul: Valor máximo	158395757.410438	0,68
YCbCr: Intensidade do azul: Variância	3307462.587151	0,01
YCbCr: Intensidade do vermelho: Desvio padrão	1149773250.212081	5,00
YCbCr: Intensidade do vermelho: Entropia	54456805.488587	0,23

Tabela 3A, Cont.

YCbCr: Intensidade do vermelho: Índice máximo	7830305.809032	0,03
YCbCr: Intensidade do vermelho: Média	89697500.759732	0,39
YCbCr: Intensidade do vermelho: Mediana	116789214.589605	0,50
YCbCr: Intensidade do vermelho: Valor máximo	206686424.816385	0,90
YCbCr: Intensidade do vermelho: Variância	1021002.115231	0,00
YIQ: Componente I: Cumes	480795634.36552	2,09
YIQ: Componente I: Desvio padrão	66930092.503275	0,29
YIQ: Componente I: Entropia	8003190.984192	0,03
YIQ: Componente I: Índice máximo	10569706.741198	0,04
YIQ: Componente I: Média	461715358.534632	2,01
YIQ: Componente I: Mediana	160521670.73185	0,69
YIQ: Componente I: Valor máximo	252691330.707854	1,10
YIQ: Componente I: Variância	2555048.477325	0,01
YIQ: Componente Q: Assimetria	1791004.282446	0,00
YIQ: Componente Q: Desvio padrão	9901882.48547	0,04
YIQ: Componente Q: Entropia	7031961.815851	0,03
YIQ: Componente Q: Índice máximo	92526448.566837	0,40
YIQ: Componente Q: Kurtosis	409170.277752	0,00
YIQ: Componente Q: Média	42406588.114998	0,18
YIQ: Componente Q: Mediana	5394733.972182	0,02
YIQ: Componente Q: Valor máximo	4821905.689198	0,02
YIQ: Componente Q: Variância	3036094.962349	0,01
YIQ: Intensidade: Cumes	2137275.457916	0,00
YIQ: Intensidade: Desvio padrão	179531157.877687	0,78
YIQ: Intensidade: Entropia	1502588.38533	0,00
YIQ: Intensidade: Índice máximo	319353671.323769	1,39
YIQ: Intensidade: Média	63250291.860081	0,27
YIQ: Intensidade: Mediana	61688138.343028	0,26
YIQ: Intensidade: Valor máximo	87307.578172	0,00
YIQ: Intensidade: Variância	1061985633.802024	4,62

Tabela 4A. Estimativas da contribuição relativa de cada característica (Sj) para a divergência genética para variáveis de textura de sementes fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini, de 12 população de *Passiflora* spp.

Variável	S.j	Valor em %
Fourier: Média das fases	2484.813122	0,00
Fourier: Média de magnitudes	2629.863541	0,00
Haralick: Contraste	112984.94984	0,03
Haralick: Correlação	5349.035086	0,00
Haralick: Dissimilaridade	273848.338584	0,07
Haralick: Energia	2017.482461	0,00
Haralick: Entropia	28560.129927	0,00
Haralick: Homogeneidade	23279.465665	0,00
Haralick: Média	408437.374574	0,11
Laws: ER	143113.524209	0,03
Laws: ES	138402.935203	0,03
Laws: EW	183166.029138	0,05
Laws: LE	41216.090785	0,01
Laws: LR	222146.532276	0,06
Laws: LS	18643.042933	0,00
Laws: LW	90160.401088	0,02
Laws: RW	138393.5227	0,03
Laws: SR	498066.957603	0,13
Laws: SW	543923.162399	0,14
Run Length: GLD	385998.686073	0,10
Run Length: GLNU	354102.071972	0,09
Run Length: HGRE	180081284.30831	49,45
Run Length: LRE	36507.477738	0,01
Run Length: LRHGE	1163755.42898	0,31
Run Length: RLD	175019265.119247	48,06
Run Length: RLNU	43076.349347	0,01
Run Length: SRE	12784.018742	0,00
Run Length: SRHGE	4141823.73364	1,13
SFM: Medida do espaço de frequência	23022.624577	0,00
SFM: Medida do espaço de frequência modificado	4064.730166	0,00
Haralick: Variância	17019.063568	0,00

Tabela 5A. Resumo da análise de variância para as variáveis de cor de semente de *Passiflora* spp: Abaixo do Otsu: Canal azul (C1), Abaixo do Otsu: Canal verde (C2), Abaixo do Otsu: Canal vermelho (C3), Abaixo do Otsu: CIELab: a (C4) Abaixo do Otsu: CIELab: b (C5) e Abaixo do Otsu: CIELab: L (C6) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		C1	C2	C3	C4	C5	C6
P	11	27,34**	90,91**	203,68**	6,19**	17,04**	24,22**
R	36	0,48	0,68	1,23	0,35	0,126	0,16
Média	-	34,97	39,60	52,51	5,60	5,44	17,53
C.V. %	-	1,99	2,08	2,11	3,36	6,53	2,31

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 6A. Resumo da análise de variância para as variáveis de cor de semente de *Passiflora* spp: Acima do Otsu: Canal azul (C7), Acima do Otsu: Canal verde (C8), Acima do Otsu: Canal vermelho (C9), Acima do Otsu: CIELab: a (C10) Acima do Otsu: CIELab: b (C11) e Acima do Otsu: CIELab: L (C12) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		C7	C8	C9	C10	C11	C12
P	11	102,89**	315,78**	539,11**	2,51**	41,81**	63,67**
R	36	2,32	3,22	4,09	0,04	0,33	0,58
Média	-	57,75	66,92	79,54	4,25	7,62	29,54
C.V. %	-	2,64	2,68	2,54	4,72	7,63	2,58

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 7A. Resumo da análise de variância para as variáveis de cor de semente de *Passiflora* spp: Brilho (C13), CIELab: b (C14), CIELab: Concentração (C15), CIELab: Dispersão (C16) CIELab: Dispersão de a (C17) CIELab: Dispersão de b (C18) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		C13	C14	C15	C16	C17	C18
P	11	0,003611**	18,01**	0,0063**	5,03**	0,61**	4,18**
R	36	0,000028	0,16	0,000053	0,64	0,0041	0,08
Média	-	0,23	2,59	0,81	10,84	5,38	6,59
C.V. %	-	2,19	15,84	0,89	2,34	1,19	4,35

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 8A. Resumo da análise de variância para as variáveis de cor de semente de *Passiflora* spp: CIELab: Dispersão de L (C19), CIELab: L (C20), Concentração da matiz (C21), Dominância laranja (C22) Dominância preta (C23) Dominância vermelha (C24) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		C19	C20	C21	C22	C23	C24
P	11	1,18**	23,93**	0,50**	0,10**	0,12**	0,02486**
R	36	0,029	0,18	0,042	0,000739	0,000778	0,000036
Média		4,56	20,0	2,69	0,31	0,59	2,54
C.V. %		3,75	2,15	7,69	8,68	4,70	23,64

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 9A. Resumo da análise de variância para as variáveis de cor de semente de *Passiflora* spp: Intensidade (C25), Luma (C26), Luminosidade (C27), Matiz (C28) Média: Canal azul (C29) Média: Canal verde (C30) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		C25	C26	C27	C28	C29	C30
P	11	0,0013**	0,0015**	0,0014**	760,88**	22,280**	94,74**
R	36	0,000022	0,000019	0,000019	12,33	0,57	0,80
Média	-	0,18	0,18	0,19	62,37	39,65	45,16
C.V. %	-	2,50	2,34	2,27	5,63	1,90	1,98

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 10A. Resumo da análise de variância para as variáveis de cor de semente de *Passiflora* spp: Média: Canal vermelho (C31), Predominante: Canal azul (C32), Predominante: Canal verde (C33), Predominante: Canal vermelho (C34) Saturação (C35) Variância da matiz (C36) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		C31	C32	C33	C34	C35	C36
P	11	212,80**	35,33**	137,51**	340,60**	0,013**	13,03**
R	36	1,46	0,87	1,68	3,81	0,000064	0,79
Média	-	57,97	33,07	39,24	53,66	0,38	
C.V. %	-	2,08	2,82	3,30	3,64	2,10	

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 11A. Resumo da análise de variância para as variáveis de geometria de semente de *Passiflora* spp: Afinamento (G01), Área (G02), Área convexa (G03), Circularidade (G04) Circularidade por fator de forma (G05) Circularidade por FFCg (G06) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		G01	G02	G03	G04	G05	G06
P	11	0,0069**	0,0024**	0,0023**	0,003**	0,0037**	2,06**
R	36	0,0007	0,000008	0,000014	0,000042	0,00033	0,015
Média	-	0,71	0,10	0,11	0,605	0,30	3,79
C.V. %	-	3,70	2,64	3,32	1,06	5,89	3,29

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 12A. Resumo da análise de variância para as variáveis de geometria de semente de *Passiflora* spp: Circularidade por FFCm (G07), Complexidade da forma (G08), Compressão (G09), Convexidade do contorno (G10) Deformação do contorno (G11) Diâmetro contido (G12) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		G07	G08	G09	G10	G11	G12
P	11	0,0037**	0,0031**	0,0014**	0,0022**	94,91**	0,0037**
R	36	0,000194	0,00011	0,000031	0,00032	0,32	0,000022
Média	-	0,65	3,01	0,77	0,89	32,13	0,27
C.V. %	-	2,12	0,35	0,71	1,99	1,76	1,70

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 13A. Resumo da análise de variância para as variáveis de geometria de semente de *Passiflora* spp: Diâmetro de Feret (G13), Diâmetro máximo (G14), Diâmetro máximo lateral (G15), Diâmetro mínimo (G16) Distâncias convexas (G17) Esfericidade da forma (G18) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		G13	G14	G15	G16	G17	G18
P	11	0,010**	0,10**	0,0042**	0,0045**	479,17**	8,18**
R	36	0,00005	0,00002	0,00002	0,00001	19,89	1,59
Média	-	0,48	0,47	0,30	0,28	144,75	18,05
C.V. %	-	1,03	1,10	1,55	1,52	3,08	6,99

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 14A. Resumo da análise de variância para as variáveis de geometria de semente de *Passiflora* spp: Esfericidade da forma modificada (G19), Extensão (G20), Índice de variação vertical (G21), Irregularidade do contorno (G22) Mudança de segmentos de retas no perímetro (G23) Mudança no perímetro (G24) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		G19	G20	G21	G22	G23	G24
P	11	0,0035**	0,0002**	0,19**	0,0006**	0,0001**	0,0001**
R	36	0,00001	0,00001	0,004	0,00008	0,0003	0,0001
Média	-	0,28	0,74	0,63	5,04	4,89	0,97
C.V. %	-	1,54	0,54	10,83	18,10	11,29	1,07

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 15A. Resumo da análise de variância para as variáveis de geometria de semente de *Passiflora* spp: Número de lacunas (G25), Número de quinas por Harris (G26), Número de quinas por Susan (G27), Perímetro (G28) Perímetro convexo (G29) Quociente de aspecto (G30) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		G25	G26	G27	G28	G29	G30
P	11	0,45**	2983,57**	2040,87**	0,05**	0,06**	0,004**
R	36	0,18	42,49	75,41	0,002	0,0001	0,00004
Média	-	7,66	130,61	65,03	1,38	1,24	0,60
C.V. %	-	176,10	4,99	13,35	3,27	0,98	1,13

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 16A. Resumo da análise de variância para as variáveis de geometria de semente de *Passiflora* spp: Rácio de modificação (G31), Retângulos circunscritos: Área média (G32), Retângulos: Lado oposto à maior aresta (G33), Retângulos: Lado oposto à menor aresta (G34) Retângulos: Maior área (G35) Retângulos: Maior aresta (G36) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		G31	G32	G33	G34	G35	G36
P	11	0,004**	0,004**	0,0040**	0,10**	0,004**	0,011**
R	36	0,00004	0,00001	0,00003	0,00003	0,00001	0,00002
Média	0,58	0,15	0,30	0,47	0,16	0,48	0,58
C.V. %	1,14	2,43	1,95	1,15	2,71	0,97	1,14

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 17A. Resumo da análise de variância para as variáveis de geometria de semente de *Passiflora* spp: Retângulos: Maior perímetro (G37), Retângulos: Média das maiores arestas (G38), Retângulos: Média das menores arestas (G39), Retângulos: Menor área (G40) Retângulos: Menor aresta (G41) Retângulos: Menor perímetro (G42) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		G37	G38	G39	G40	G41	G42
P	11	0,104**	0,0093**	0,0045**	0,0042**	0,0043**	0,10**
R	36	0,00021	0,000025	0,000017	0,00001	0,00001	0,00021
Média	-	1,61	0,45	0,33	0,14	0,30	1,54
C.V. %	-	0,91	1,10	1,21	2,30	1,45	0,94

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 18A. Resumo da análise de variância para as variáveis de geometria e textura de semente de *Passiflora* spp: Retângulos circunscritos: Perímetro médio (G43), Solidez do contorno (G44), SURF (G45), Variância elíptica (G46) Fourier: Média das fases (T01), Fourier: Média de magnitudes (T02) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		G43	G44	G45	G46	T01	T02
P	11	0,10**	0,000201**	790,79**	2,85**	0,00016 ^{ns}	0,39**
R	36	0,00024	0,000008	7,43	0,69	0,00016	0,007
Média	-	1,57	0,96	43,07	55,79	1,57	1,63
C.V. %	-	0,98	0,29	6,32	0,47	0,81	5,46

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. Ns não significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 19A. Resumo da análise de variância para as variáveis de textura de semente de *Passiflora* spp: Retângulos circunscritos: Haralick: Contraste (T03), Haralick: Correlação (T04), Dissimilaridade (T05), Haralick: Energia (T06) Haralick: Entropia (T07), Homogeneidade (T08) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio					
		T03	T04	T05	T06	T07	T08
P	11	852,26**	0,00093**	2,14**	0,00029**	0,32**	0,006**
R	36	31,50	0,000064	0,064	0,000011	0,0078	0,0001
Média	-	41,45	0,90	3,99	4,95	6,61	0,28
C.V. %	-	13,53	0,88	6,37	6,72	1,33	4,00

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 20A. Resumo da análise de variância para as variáveis de textura de semente de *Passiflora* spp: Retângulos circunscritos: Haralick: Média (T09), Laws: ER (T10), Laws: ES (G11), Laws: EW (T12) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio			
		T09	T10	T11	T12
P	11	112,07**	225200143.63**	170691064.19**	201954285.74**
R	36	0,90	6904583.66	8240864.27	6662588.75
Média	-	47,88	118944.48	112032.72	112786.85
C.V.%	-	1,98	2,20	2,56	2,28

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 21A. Resumo da análise de variância para as variáveis de textura de semente de *Passiflora* spp: Retângulos circunscritos: Laws: LE (T13), Laws: LR (T14) Laws: LS (T15), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		T13	T14	T15
P	11	5151884615.30**	440399248.39**	1005978708.25**
R	36	441891277.75	3379377.03	27354385.12
Média	-	83972.65	130153.01	76558.25
C.V. %	-	25.03	1,41	6,83

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 22A. Resumo da análise de variância para as variáveis de textura Laws: LW (G16), Laws: RW (G17), Laws: SR (G18) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		T16	T17	T18
P	11	338495488.45**	235970723.35**	198185219.70**
R	36	6093130.88	7452483.05	6294503.20
Média	-	131922.45	118103.25	115210.35
C.V.%	-	1,87	2,31	2,17

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 23A. Resumo da análise de variância para as variáveis de textura de semente de *Passiflora* spp: Retângulos circunscritos: Laws: SW (T19), Run Length: GLD (T20) Run Length: GLNU (T21), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		T19	T20	T21
P	11	202101408.71**	678580.73**	482770.48**
R	36	5478867.21	7391.26	3933.07
Média	-	110848.64	1485.08	1474.61
C.V. %	-	2,11	5,78	4,25

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 24A. Resumo da análise de variância para as variáveis de textura Run Length: HGRE (T22), Run Length: LRE (T23), Run Length: LRHGE (T24), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		T22	T23	T24
P	11	1170547.69**	0,05**	1368211.47**
R	36	10508.77	0,001	17334.40
Média	-	2625.44	1,49	3541.18
C.V. %	-	3,90	2,45	3,71

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 25A. Resumo da análise de variância para as variáveis textura Run Length: RLD (T25), Run Length: RLNU (T26) Run Length: SRE (T27), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		T25	T26	T27
P	11	4682204.44**	356465635.36**	0,000897**
R	36	42035.78	1432379.50	0,000025
Média	-	5250.89	43367.46	0,90
C.V. %	-	3,90	2,75	0,54

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 26A. Resumo da análise de variância para as variáveis de textura Run Length: SRHGE (T28), SFM: Medida do espaço de frequência (T29) SFM: Medida do espaço de frequência modificado (T30), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		T28	T29	T30
P	11	1115156.05**	7,60**	5,18**
R	36	9982.06	0,19	0,11
Média	-	2449.94	6,61	4,48
C.V. %	-	4,07	6,73	7,46

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 27A. Resumo da análise de variância para as variáveis de textura e histograma, Haralick: Variância (T31), NDLPQ: Mediana (H01), NDLPQ: Valor máximo (H02), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		T31	H01	H02
P	11	12525.30**	1.95**	11.51**
R	36	311.42	0,11	0,36
Média	-	205,84	2,74	15,70
C.V. %	-	8,57	12,47	3,82

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 28A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, NDLPQ: Variância (H03), Verde: Cumes (H04), Verde: Desvio padrão (H05), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H03	H04	H05
P	11	0,08**	12,31**	24,05**
R	36	0,001	0,44	0,58
Média	-	3,84	30,67	40,56
C.V. %	-	0,83	2,17	1,88

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 29A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, Verde: Entropia (H06), Verde: Índice máximo (H07), Verde: Média (H08), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini

	GL	Quadrado Médio		
		H06	H07	H08
P	11	17,87**	0,00036**	10894,73**
R	36	0,43	0,000011	345,01
Média	-	35,86	4,95	253,37
C.V. %	-	1,83	6,72	7,33

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 30A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, Verde: Mediana (H09), Verde: Valor máximo (H10), Verde: Variância (H11) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H09	H10	H11
P	11	0.14**	13,98**	0,06**
R	36	0,0082	0,307	0,0012
Média	-	1,42	13,08	3,77
C.V. %	-	6,37	4,23	0,94

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 31A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, Vermelho: Cumes (H12), Vermelho: Desvio padrão (H13), Vermelho: Entropia (H14), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H12	H13	H14
P	11	89.09**	92.59**	85.62**
R	36	0,884	0.783	0.775
Média	-	42,77	49,39	46,74
C.V. %	-	2,19	1,79	1,88

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 32A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, Vermelho: Índice máximo (H15), Vermelho: Média (H16), Vermelho: Mediana (H17), Vermelho: fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H15	H16	H17
P	11	0.00016**	8791.52**	62,088**
R	36	0.000014	248.85	0,350642
Média	-	4,60	181,35	9,92
C.V. %	-	8,09	8,69	5,95

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 33A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, Valor máximo (H18), Vermelho: Variância (H19), YCbCr: Brilho: Cumes (H20) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H18	H19	H20
P	11	429.50**	0,039**	133.73**
R	36	3,41	0.0010	29.46
Média	-	64,25	3,33	15,67
C.V. %	-	2,87	0,98	34,63

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 34A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Brilho: Desvio padrão (H21), YCbCr: Brilho: Entropia (22), YCbCr: Brilho: Índice máximo (H23) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H21	H22	H23
P	11	339.80**	381.19**	97.07**
R	36	4,17	6,17	12.88
Média	-	20,15	43,74	17,34
C.V. %	-	10,14	6,17	20,69

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 35A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Brilho: Média (H24), YCbCr: Brilho: Mediana (H25), YCbCr: Brilho: Valor máximo (H26), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H24	H25	H26
P	11	0,00067**	9647929.57**	6,98**
R	36	0,000031	74482.01	0,09
Média	-	0,12	4342.83	8,43
C.V. %	-	4,37	6,28	3,57

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 36A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Brilho: Variância (H27), YCbCr: Intensidade do azul: Cumes (H28), YCbCr: Intensidade do azul: Desvio padrão (H29), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H27	H28	H29
P	11	50,88**	0,06**	1574.75**
R	36	0,14	0,0002	14.66
Média	-	28,57	4,63	105,10
C.V. %	-	1,33	0,30	3,64

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 37A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Intensidade do azul: Entropia (H30), YCbCr: Intensidade do azul: Índice máximo (H31), YCbCr: Intensidade do azul: Média (H32) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H30	H31	H32
P	11	0,02**	875.08**	1105.35**
R	36	0,0016	4,36	6,14
Média	-	0,93	96,37	99,13
C.V. %	-	4,37	2,16	2,50

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 38A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, (H33), YCbCr: Intensidade do azul: Valor máximo (H34), YCbCr: Intensidade do azul: Variância (H35), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H33	H34	H35
P	11	0,000034**	161430.44**	0,018**
R	36	0,000003	535.19	0,0049
Média	-	0,028	836.41	32,86
C.V. %	-	5,79	2,76	0,21

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 39A. Intensidade do vermelho: Desvio padrão (H36), YCbCr: Intensidade do vermelho: Entropia (H37), YCbCr: Intensidade do vermelho: Índice máximo (H38), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H36	H37	H38
P	11	1,91**	0,0033**	3777.72**
R	36	0,14	0,000075	107.12
Média	-	88,14	4,37	206,41
C.V. %	-	0,43	0,19	5,01

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 40A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Intensidade do vermelho: Média (H39), YCbCr: Intensidade do vermelho: Mediana (H40), YCbCr: Intensidade do vermelho: Mediana (H41), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H39	H40	H41
P	11	143,99**	15,89**	5,71**
R	36	5,56	0,28	0,16
Média	-	41,41	130,67	128,92
C.V. %	-	5,69	0,40	0,31

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 41A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Intensidade do vermelho: Variância (H42), YIQ: Componente I: Cumes (H43), YIQ: Componente I: Desvio padrão (H44), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H42	H43	H44
P	11	0,00020**	59726.32**	4,90**
R	36	0,000008	4618.34	1,06
Média	-	4,47	7770.28	52,86
C.V. %	-	6,44	0,87	1,94

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 42A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Componente I: Entropia (H45), YIQ: Componente I: Índice máximo (H46), YIQ: Componente I: Média (H47) fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H45	H46	H47
P	11	0,73**	0,0011**	212,35 ^{ns}
R	36	0,22	0,00017	227,88
Média	-	77,06	5,40	121,73
C.V. %	-	0,61	0,24	12,40

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F e Não significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 43A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Componente I: Mediana (H48), YIQ: Componente I: Valor máximo (H49), YIQ: Componente I: Variância (H50), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H48	H49	H50
P	11	75,24 ^{ns}	0,0079 ^{ns}	0,010 ^{ns}
R	36	75,65	0,01	0,007
Média	-	105,81	127,53	127,49
C.V. %	-	8,22	7,84	6,88

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F e Não significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 44A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, Componente Q: Assimetria (H51), YIQ: Componente Q: Desvio padrão (H52), YIQ: Componente Q: Entropia (H53), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H51	H52	H53
P	11	0,00004 ^{ns}	17322.80 ^{**}	0,140156 ^{**}
R	36	0,000022	5658.55	0,007667
Média	-	1,45	5948.87	1,50
C.V. %	-	32,32	1,26	5,81

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. ^{**}Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F e Não significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 45A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Componente Q: Índice máximo (H54), YIQ: Componente Q: Kurtosis (H55), YIQ: Componente Q: Média (H56), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H54	H55	H56
P	11	17,60 ^{**}	0,08 ^{**}	115,65 ^{**}
R	36	0.33	0,0013	1,11
Média	-	13,86	3,82	41,19
C.V. %	-	4,19	0,94	2,56

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. ^{**}Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 46A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Componente Q: Mediana (H57), YIQ: Componente Q: Valor máximo (H58), YIQ: Componente Q: Variância (H59), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H57	H58	H59
P	11	110,39 ^{**}	99,75 ^{**}	0,00017 ^{**}
R	36	0,89	0,85	0,000011
Média	-	47,93	45,06	0,04
C.V. %	-	1,97	2,05	7,61

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. ^{**}Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 47A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Intensidade: Cumes (H60), YIQ: Intensidade: Desvio padrão (H61), YIQ: Intensidade: Entropia (H62), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H60	H61	H62
P	11	12079.61**	8,33**	0,25**
R	36	303.98	0,28	0,022
Média	-	204,28	24,33	72,29
C.V. %	-	8,53	2,20	0,20

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 48A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Intensidade: Índice máximo (H63), YIQ: Intensidade: Média (H64), YIQ: Intensidade: Mediana (H65), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H63	H64	H65
P	11	0,0072**	210,33**	583,19**
R	36	0,00017	94,07	72,05
Média	-	5,18	113,89	65,32
C.V. %	-	0,25	8,51	12,99

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 49A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Intensidade: Valor máximo (H66), NDLPQ: Mediana (H67), DLPQ: Valor máximo (H68). fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H66	H67	H68
P	11	0,60**	0,51 ^{ns}	0,000095**
R	36	0,01	0,32	.000003
Média	-	126,43	125,49	0,15
C.V. %	-	0,10	0,45	0,11

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F e Não significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 50A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, NDLPQ: Variância (H69), Verde: Cumes (H70), Verde: Desvio padrão (H71), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H69	H70	H71
P	11	5333.05**	0.15**	17.59**
R	36	472.130	.0091	0.333
Média	-	5226.37	1.48	14.11
C.V. %	-	0.41	6.44	4.09

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 51A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, Verde: Entropia (H72), Verde: Índice máximo (H73), Verde: Média (H74), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H72	H73	H74
P	11	0.080**	100.21**	98.99**
R	36	0.0011	0.885	0.853
Média	-	3.84	38.72	46.12
C.V. %	-	0.88	2.42	2.00

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 52A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, Verde: Mediana (H75), Verde: Valor máximo (H76), Verde: Variância (H77), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H75	H76	H77
P	11	92.46**	0.00017**	12708.50**
R	36	0.821	0.000011	310.335
Média	-	43.15	0.043	211.25
C.V. %	-	2.10065	7.61	8.33

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 53A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, Vermelho: Cumes (H78), Vermelho: Desvio padrão (H79), Vermelho: Entropia (H80), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H78	H79	H80
P	11	0.18**	20.24**	0.08**
R	36	0.0083	0.323	0.0011
Média	-	1.58	15.98	4.05
C.V. %	-	5.77	3.55	0.84

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 54A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, Vermelho: Índice máximo (H81), Vermelho: Média (H82), Vermelho: Mediana (H83), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H81	H82	H83
P	11	294.21**	218.45**	240.66**
R	36	1.947	1.508	1.616
Média	-	54.39	58.92	56.96
C.V. %	-	2.56	2.08	2.23

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 55A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, Vermelho: Valor máximo (H84), Vermelho: Variância (H85), YCbCr: Brilho: Cumes (H86), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H84	H85	H86
P	11	0.00016**	18726.87**	0.11**
R	36	0.000006	364.833	.011
Média	-	3.47	267.99	1.49
C.V. %	-	6.77	7.12	7.21

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 56A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Brilho: Desvio padrão (H87), YCbCr: Brilho: Entropia (H88), YCbCr: Brilho: Índice máximo (H89), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H87	H88	H89
P	11	17.50**	0.079**	116.45**
R	36	0.33	0.0013	1.096
Média	-	13.74	3.81	42.34
C.V. %	-	4.22	0.95	2.47

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 57A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Brilho: Média (H90), YCbCr: Brilho: Mediana (H91), YCbCr: Brilho: Valor máximo (H92), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H90	H91	H92
P	11	113.47**	101.26**	0.00017**
R	36	0.907	0.873	0.000014
Média	-	48.79	45.97	0.044
C.V. %	-	1.95	2.03	8.39

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 58A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Brilho: Variância (H93), YCbCr: Intensidade do azul: Cumes (H94), YCbCr: Intensidade do azul: Desvio padrão (H95), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H93	H94	H95
P	11	11765.78**	0.012**	5.18**
R	36	298.25	0.0011	0.107
Média	-	201.11	1.04	5.99
C.V. %	-	8.58	3.31	5.47

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 59A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Intensidade do azul: Entropia (H96), YCbCr: Intensidade do azul: Índice máximo (H97), YCbCr: Intensidade do azul: Média (H98), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H96	H97	H98
P	11	0.18**	29.96**	13.96**
R	36	0.0013	0.149	0.122
Média	-	2.73	120.25	122.05
C.V. %	-	1.35	0.32	0.28

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 60A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Intensidade do azul: Valor máximo (H100), YCbCr: Intensidade do azul: Variância (101), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H99	H100	H101
P	11	22.95**	0.0058**	598.92**
R	36	0.116	0.000033	15.396
Média	-	120.58	0.16	37.58
C.V. %	-	0.28	3.60	10.43

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 61A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Intensidade do vermelho: Desvio padrão (102), YCbCr: Intensidade do vermelho: Entropia (103), YCbCr: Intensidade do vermelho: Índice máximo (104), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H102	H103	H104
P	11	3.37**	0.15**	20.25**
R	36	0.075	0.00093	0.123
Média	-	5.17	2.67	135.52
C.V. %	-	5.30	1.13	0.25

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 62A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Intensidade do vermelho: Média (105), YCbCr: Intensidade do vermelho: Mediana (106), YCbCr: Intensidade do vermelho: Valor máximo (107), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H105	H106	H107
P	11	11.06**	16.51**	0.004**
R	36	0.096	0.087	.000022
Média	-	133.85	135.06	0.15
C.V. %	-	0.23	0.21	2.96

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 63A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YCbCr: Intensidade do vermelho: Variância (108), YIQ: Componente I: Cumes (109), YIQ: Componente I: Desvio padrão (110), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H108	H109	H110
P	11	275.61**	2.78**	7.94**
R	36	8.409	0.169	0.181
Média	-	27.86	5.33	7.71
C.V. %	-	10.40	7.72	5.51

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 64A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Componente I: Entropia (111), YIQ: Componente I: Índice máximo (112), YIQ: Componente I: Média (113), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H111	H112	H113
P	11	0.17**	45.25**	23.26**
R	36	0.0010	0.288	0.206
Média	-	2.98	138.49	136.002
C.V. %	-	1.09	0.38	0.33

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 65A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Componente I: Mediana (114), YIQ: Componente I: Valor máximo (115), YIQ: Componente I: Variância (116), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H114	H115	H116
P	11	36.45**	0.0040**	1453.69**
R	36	0.184	0.000036	43.876
Média	-	137.90	0.14	62.05
C.V. %	-	0.31	4.26	10.67

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 66A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Componente Q: Assimetria (117), YIQ: Componente Q: Desvio padrão (118), YIQ: Componente Q: Entropia (119), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H117	H118	H119
P	11	0.064**	0.19**	0.11**
R	36	0.00042	0.0014	0.00055
Média	-	0.22	1.42	1.72
C.V. %	-	9.25	2.64	1.36

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 67A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Componente Q: Índice máximo (120), YIQ: Componente Q: Kurtosis (121), YIQ: Componente Q: Média (121), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H120	H121	H122
P	11	1.84**	0.089**	1.14**
R	36	0.013	0.00061	0.0082
Média	-	127.74	-2.81	127.83
C.V. %	-	9.24	-0.88	7.10

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 68A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Componente Q: Mediana (123), YIQ: Componente Q: Valor máximo (124), YIQ: Componente Q: Variância (125), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H123	H124	H125
P	11	1.402954**	0.01**	1.51**
R	36	0.0089	0.000053	.012
Média	-	127.79	0.31	2.11
C.V. %	-	7.38	2.29	5.32

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 69A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Intensidade: Cumes (126), YIQ: Intensidade: Desvio padrão (127), YIQ: Intensidade: Entropia (128), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H126	H127	H128
P	11	0.11**	17.51**	0.079**
R	36	0.012	0.337	0.0013
Média	-	1.49	13.75	3.81
C.V. %	-	7.38	4.22	0.95

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 70A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Intensidade: Índice máximo (129), YIQ: Intensidade: Média (130), YIQ: Intensidade: Mediana (131), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio		
		H129	H130	H131
P	11	116.72**	113.64**	101.33**
R	36	1.140	0.908	0.874
Média	-	42.34	48.79	45.98
C.V. %	-	2.52	1.95	2.03

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Tabela 71A. Resumo da análise de variância para as variáveis de histograma, YIQ: Intensidade: Valor máximo (132), YIQ: Intensidade: Variância (133), fornecidas pelo equipamento GroundEye® mini.

	GL	Quadrado Médio	
		H132	H133
P	11	0.00017**	11777.14**
R	36	0.000014	298.510
Média	-	0.044	201.17
C.V. %	-	8.39	8.58

P: População, R: Resíduo e CV (%): Coeficiente de variação. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.