

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

Modo de Reprodução Preferencial em Genótipos de Vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don)

Gustavo Torres Dos Santos Amorim

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

**MODO DE REPRODUÇÃO PREFERENCIAL EM GENÓTIPOS DE
VINCA (*CATHARANTHUS ROSEUS* [L.] G. DON)**

GUSTAVO TORRES DOS SANTOS AMORIM

Sob a Orientação do Professor

Pedro Corrêa Damasceno Junior

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Fitotecnia** no Curso de Pós-graduação em Fitotecnia da UFRRJ, área de concentração Produção Vegetal.

Seropédica, RJ

Julho de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A524m Amorim, Gustavo Torres dos Santos , 1990-
Modo de Reprodução Preferencial em Genótipos de
Vinca (Catharanthus roseus [L.] G. DON) / Gustavo
Torres dos Santos Amorim. - Seropédica, 2019.
81 f. : il.

Orientador: Pedro Corrêa Damasceno Junior.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Fitotecnia, 2019.

1. Microscopia de fluorescência. 2. Marcadores
ISSR. 3. Plantas medicinais. 4. Cleistogamia. 5.
Melhoramento genético. I. Damasceno Junior, Pedro
Corrêa, 1973-, orient. II Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Fitotecnia III. Título.

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

MODO DE REPRODUÇÃO PREFERENCIAL EM GENÓTIPOS DE VINCA
(*CATHARANTHUS ROSEUS* [L.] G. DON)

GUSTAVO TORRES DOS SANTOS AMORIM

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Fitotecnia, no Curso de Pós-graduação em Fitotecnia da UFRRJ, área de concentração Produção Vegetal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/07/2019

BANCA EXAMINADORA:

Pedro Corrêa Damasceno Junior. D.Sc. Genética e Melhoramento de Plantas. UFRRJ.

(Orientador/Presidente)

Diolina Moura Silva. D.Sc. Ciências Agrárias. UFES.

(Membro Titular)

Bruna Rafaela da Silva Menezes. D.Sc. Genética e Melhoramento de Plantas. UFRRJ.

(Membro Titular)

À minha mãe,

*Márcia Torres dos Santos, como reconhecimento pelo incentivo, suporte e apoio para a
minha formação pessoal e profissional.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, a quem busquei nos momentos de aflição e dificuldade. A ele pedi forças para seguir firme na minha caminhada.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia (PPGF) pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Pedro Corrêa Damasceno Júnior pela orientação, incentivo, apoio e contribuição na pesquisa. Obrigado por todo suporte para alcançar os objetivos traçados.

Aos meus pais, Márcia e Leonardo, os meus maiores motivadores. Agradeço o apoio e suporte incondicional. Obrigado por sempre estarem ao meu lado em toda minha vida acadêmica.

À minha irmã Bruna. Obrigado por me apoiar e me ouvir em todos os momentos.

À minha namorada Viviane, que sempre me ouviu e acreditou em mim. Agradeço a paciência e por estar disponível para me ajudar sempre. Obrigado também pelos momentos de descontração e pela confiança de que tudo daria certo.

À minha avó Esther por ser um alicerce. Sua ajuda e apoio foram fundamentais na minha caminhada.

Em memória de meu avô Rubens, o responsável pelos primeiros contatos com as Ciências Agrárias.

Aos meus amigos Júnior, Nilo e Wallace. Obrigado pela amizade de longa data e essenciais momentos de descontração. Vocês foram muito importantes.

Aos amigos (as) da UFRRJ, em especial: Caio, Camila, Carlos, Cíntia, Mayara, Ricardo e Rita. Agradeço a amizade, ajuda nas atividades de pesquisa e por nossos momentos agradáveis juntos.

À técnica de laboratório Fernanda pela ajuda, parceria e apoio. Sua contribuição foi fundamental para a execução desta pesquisa.

Aos grandes amigos (as) Ana Rafaela, Fernanda, Matheus, Mayara, Tatiana, Tatiane, Thaísa e Vivian pelo companheirismo, contribuição na pesquisa e excelente convivência no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram com a minha formação profissional.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 0001.

RESUMO

AMORIM, Gustavo Torres dos Santos. **Modo de reprodução preferencial em genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don)**. 2019. 81p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) distingue-se por ser fonte exclusiva dos alcaloides vincristina e vimblastina, no entanto ocorrem em baixas concentrações na espécie. Tais alcaloides são utilizados em quimioterápicos para o tratamento de tumores, leucemias e linfomas. Sendo assim, é fundamental desenvolver um programa de melhoramento genético na busca de genótipos superiores quanto a produção de vincristina e vimblastina. Para isso, é necessário, inicialmente, o estudo do modo de reprodução preferencial da espécie para a aplicação correta dos métodos de melhoramento. Diante do exposto, esta pesquisa teve como objetivo estudar o modo de reprodução preferencial em 10 genótipos de vinca da coleção de germoplasma da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com base na relação pólen:óvulo (P:O), histoquímica dos grãos de pólen, emissão e desenvolvimento de tubos polínicos *in vivo*, viabilidade polínica e receptividade do estigma. Bem como estimar a diversidade genética via marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) entre os genótipos analisados. Para estimar a razão (P:O), anteras de cada flor foram excisadas, e os grãos de pólen foram contados sob microscópio; ovários das mesmas flores foram dissecados, e os óvulos foram contados sob estereomicroscópio. Na análise histoquímica dos grãos de pólen utilizou-se os corantes Sudan IV e a solução de I₂KI para detecção de lipídeo e amido, respectivamente. A emissão e desenvolvimento de tubos polínicos *in vivo* foram avaliados em botões florais e flores na antese, em microscopia de fluorescência, utilizando-se o fluorocromo azul de anilina a 0,1%. Para a viabilidade polínica, em botões florais, empregou-se a solução tripla de Alexander e para a receptividade do estigma adotou-se a solução de acetato de alfa-naftil, em flores fechadas e na antese. Na análise genotípica foram utilizados 15 *primers* ISSR. A matriz fenética foi estimada pelo índice de dissimilaridade de Jaccard e o agrupamento dos genótipos foi realizado via UPGMA (*Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean*). Verificou-se a consistência do padrão de agrupamento através da correlação cofenética. Os resultados da relação (P:O) indicaram que oito, dos 10 genótipos, apresentaram, simultaneamente, autogamia facultativa e alogamia facultativa (modo de reprodução misto). Porém, dois genótipos apresentaram somente um modo de reprodução, algamo facultativo, no UFRRJ VIN007, e autógamo facultativo no UFRRJ VIN004. Os estigmas receptivos e a elevada viabilidade polínica em botões florais estabeleceram condições favoráveis para a ocorrência da cleistogamia. Com base na emissão e desenvolvimento de tubos polínicos *in vivo*, constatou-se que dos oito genótipos com modo de reprodução misto, seis deles tiveram forte tendência a alogamia e todos foram autocompatíveis. Verificou-se também a ocorrência da cleistogamia em 50% dos genótipos. No caso, do UFRRJ VIN004 tal ocorrência foi acentuada, o que reforça a sua tendência a autogamia. Entretanto, observou-se que sete genótipos, incluindo o UFRRJ VIN007, exibiram forte tendência a alogamia. Diante disso, percebe-se grande diversidade de estratégias reprodutivas em vinca, já que tanto a autofecundação quanto a alogamia podem estar presentes. A alta diversidade genética obtida pode ser explicada pela forte tendência a alogamia constatada em 70% dos genótipos analisados.

Palavras-chave: Microscopia de fluorescência, marcadores ISSR, plantas medicinais, cleistogamia, melhoramento genético.

ABSTRACT

AMORIM, Gustavo Torres dos Santos. **Preferential reproduction mode in vinca genotypes (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don)**. 2019. 81p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The periwinkle (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) is distinguished because it is exclusive source of vincristine and vinblastine alkaloids, however they occur in low concentrations in the species. Such alkaloids are used in chemotherapy for the treatment of tumors, leukemias and lymphomas. Therefore, it is essential to develop a breeding program in search of superior genotypes for vincristine and vinblastine production. For this, it is necessary, initially, the study of the preferential reproduction mode of the species for the correct application of the breeding methods. Given the above, this research aimed to study the preferential mode of reproduction in 10 genotypes of periwinkle from the germplasm collection of the Federal Rural University of Rio de Janeiro, based on the pollen:ovule (P:O) ratio, histochemical pollen, emission and development of pollen tubes *in vivo*, pollen viability and receptivity of stigma. As well as to estimate genetic diversity using ISSR molecular markers (Inter Simple Sequence Repeats) among the analyzed genotypes. To estimate the ratio (P:O), anthers of each flower were excised, and pollen grains were counted under a microscope; ovaries of the same flowers were dissected, and the ovules were counted under stereomicroscope. In the histochemical analysis of pollen grains were used the dyes Sudan IV and the solution I₂KI for the detection of lipid and starch, respectively. The emission and development of pollen tubes *in vivo* were evaluated in flower buds and flowers in anthesis, under fluorescence microscopy, using 0.1% aniline blue fluorochrome. For the pollen viability, in flower buds, the triple solution of Alexander was used and for the receptivity of the stigma was adopted the solution of alpha-naphthyl acetate, in closed flowers and anthesis. In the genotypic analysis, 15 ISSR primers were used. The phenetic matrix was estimated by dissimilarity index of Jaccard and the grouping of the genotypes was performed by UPGMA (Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean). The consistency of the clustering pattern was verified through the cophenetic correlation. The results of the ratio (P:O) indicated that eight of the 10 genotypes presented both facultative self-pollinated and facultative cross pollinated (mixed mating). However, two genotypes presented only one mode of reproduction, facultative cross pollinated, in UFRRJ VIN007, and facultative self-pollinated in UFRRJ VIN004. The receptive stigmas and the high pollen viability in flower buds established favorable conditions for the occurrence of cleistogamy. Based on the emission and development of pollen tubes *in vivo*, it was verified that of the eight genotypes with mixed reproduction mode, six of them had a strong tendency to allogamy and all were self-compatible. It was also verified the occurrence of cleistogamy in 50% of the genotypes. In the case of UFRRJ VIN004 such occurrence was accentuated, which reinforces its tendency to autogamy. However, it was observed that seven genotypes, including UFRRJ VIN007, showed a strong tendency to allogamy. In view of this, a great diversity of reproductive strategies can be observed in periwinkle, since both self-pollinated and allogamy may be present. The high genetic diversity obtained can be explained by the strong tendency to allogamy found in 70% of the analyzed genotypes.

Keywords: Fluorescence microscopy, ISSR markers, medicinal plants, cleistogamy, plant breeding.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Coleção de germoplasma de vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ e respectiva diagramação dos acessos, identificados com o número de entrada ou incorporação na coleção.....	21
Tabela 2. Dados de passaporte dos genótipos de vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don) utilizados no estudo do modo de reprodução preferencial e na análise da diversidade genotípica.....	24
Tabela 3. Razão entre o número de grãos de pólen e o número de óvulos (relação P:O), como um indicativo do modo de reprodução preferencial (Cruden, 1977).....	25
Tabela 4. Relação de <i>primers</i> do tipo ISSR utilizados com respectivas temperaturas de anelamento (TA).....	34
Tabela 5. Tabela descritiva do número de grãos de pólen por botão floral (NGPB), número de grãos pólen por antera (NGPA), número de óvulos por botão floral (NOB) e relação pólen:óvulo (P:O) em dez genótipos de <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don.	36
Tabela 6. Média do número de grãos de pólen por botão floral (NGPB), número de grãos pólen por antera (NGPA) e número de óvulos por botão floral (NOB) referente à avaliação de dez genótipos de <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don.	37
Tabela 7. Relação pólen:óvulo (P:O) e modo de reprodução preferencial de dez genótipos de <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don, segundo a metodologia de Cruden (1977).....	37
Tabela 8. Porcentagem do número de botões florais (BF) e flores na antese (FA), para verificação de <i>cleistogamia</i> e <i>autofecundação natural</i> , com grãos de pólen no estigma (GPE), tubos polínicos no estigma (TPE), tubos polínicos no estilo (TPS) e tubos polínicos no ovário (TPO) em dez genótipos de <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don.....	40
Tabela 9. Porcentagem de botões florais, submetidos à autopolinização artificial, para verificação da <i>autoincompatibilidade</i> , com tubos polínicos no estigma (TPE), tubos polínicos no estilo (TBS) e tubos polínicos no ovário (TPO) em dez genótipos de <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don.	41
Tabela 10. Porcentagem média de grãos de pólen viáveis (%GPV) de botões florais em dez genótipos de <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don.	46
Tabela 11. Relação de <i>primers</i> de marcadores ISSR utilizados com número de marcas registradas, número de marcas monomórficas e polimórficas e porcentagem de polimorfismo dos fragmentos amplificados de DNA genômico de <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dados climáticos do Município de Seropédica – RJ entre outubro de 2017 a março de 2019. Fonte: INMET/SIPA/UFRRJ.....	21
Figura 2. Mudanças de vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don) pertencentes à coleção de germoplasma do Departamento de Fitotecnia (DFITO), do Instituto de Agronomia (IA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). A) Genótipo UFRRJ VIN005, adquirido em Petrópolis – RJ. B) Genótipo UFRRJ VIN048, adquirido em Holambra – SP. C) Genótipo UFRRJ VIN002, coletado em Volta Redonda – RJ. D) Genótipo UFRRJ VIN006, coletado em Cabo Frio – RJ. E) Genótipo UFRRJ VIN019, coletado em Valença – RJ. F) Genótipo UFRRJ VIN003, coletado em Seropédica – RJ.....	21
Figura 3. Dez genótipos pertencentes à coleção de germoplasma de vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ. A) UFRRJ VIN004. B) UFRRJ VIN005. C) UFRRJ VIN007. D) UFRRJ VIN008. E) UFRRJ VIN009. F) UFRRJ VIN014. G) UFRRJ VIN029. H) UFRRJ VIN037. I) UFRRJ VIN050. J) UFRRJ VIN055...	22
Figura 4. Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP) do Departamento de Fitotecnia (DFITO), do Instituto de Agronomia (IA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).....	23
Figura 5. Relação pólen:óvulo (P:O). A) Botão floral (flor fechada) coletado. B) Estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). C) Cinco anteras excisadas. D) Tubo Eppendorf contendo 0,5 mL de uma solução composta de 0,36 mL de solução de etanol 70%; 0,06 mL de solução de 0,5% de azul de metileno e 0,08 mL de detergente Tween 80 P.S. E) Vórtex (Vixar VM3000, Brasil). F) 1 microlitro (1 mL) da solução contendo grãos de pólen depositada em uma lâmina. G) Microscópio ótico (Olympus BX43, USA). H) Grãos de pólen em uma lâmina para a contagem.	26
Figura 6. Relação pólen:óvulo (P:O). A) Mesmo botão floral (flor fechada) de onde as anteras foram excisadas. B) Estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). C) Ovários. D) Ovário excisado longitudinalmente em uma gota de solução de 0,5% de azul de metileno. E) Óvulos distribuídos em uma lâmina para a contagem.	27
Figura 7. Histoquímica de grãos de pólen. A) Botão floral, próximo a antese, coletado. B) estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). C) Duas anteras excisadas em uma lâmina. D) Grãos de pólen. E) Grãos de pólen em uma gota de solução de iodeto de potássio (I ₂ KI). F) Grãos de pólen em uma gota de solução de Sudan IV. G) Microscópio ótico (Olympus BX43, USA).	28
Figura 8. Autopolinização artificial. A) Botão floral (flor fechada) submetido à autopolinização artificial. B) Corte longitudinal na corola do botão floral realizado com agulha de uma seringa para exposição do estigma. C) Corte longitudinal (seta) na corola do botão floral, em detalhe. D) Exposição do estigma que será autopolinizado (seta). E) Estigma que será autopolinizado em detalhe (seta). F) Por meio do corte realizado anteriormente, as anteras foram acessadas com o auxílio de um pincel para retirada dos grãos de pólen. G) Os grãos de pólen aderidos ao pincel foram transferidos para o estigma, efetuando-se a autopolinização (seta). H) Grãos de pólen aderidos à superfície do estigma após autopolinização, em detalhe. I) Identificação do botão floral autofecundado com uma linha de cor vermelha. J) Botão floral autofecundado protegido por sacola de papel.	29

Figura 9. Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos <i>in vivo</i> . A) Botão floral (flor fechada) coletado. B) Flor na antese (protegida por sacola de papel) coletada. C) Estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). D) Pistilo (estigma, estilo e ovário). E) Fluorocromo azul de anilina a 0,1%. F) Pistilos esmagados entre o conjunto lâmina/lamínula. G) Microscópio óptico (Olympus BX43, USA).	30
Figura 10. Viabilidade polínica. A) Botão floral (flor fechada) coletado. B) Estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). C) Cinco anteras hidratadas em água destilada. D) Grãos de pólen em uma lâmina. E) Grãos de pólen em uma gota da solução tripla de Alexander. F) Microscópio óptico (Olympus BX43, USA).	32
Figura 11. Receptividade do estigma. A) Botão floral (flor fechada) coletado. B) Flor na antese coletada. C) Estigma de flor na antese. D) Estigma de botão floral (flor fechada). E) Solução de acetato de alfa-naftil. F) Estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). G) Estigma receptivo com coloração escura.	33
Figura 12. Natureza histoquímica dos grãos de pólen de <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don. A) Grãos de pólen corados com Sudan IV não mostrando reação. B) Grãos de pólen corados com I ₂ KI com reação positiva. Escala = 80µm.	38
Figura 13. Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos <i>in vivo</i> . A) Presença de tubos polínicos no estigma e no estilo em pistilo de botão floral (flor fechada), no genótipo UFRRJ VIN014. B) Grãos de pólen (seta pequena) e tubos polínicos no estigma (setas grandes) em pistilo de botão floral. C) Tubos polínicos no estilo (seta grande) em pistilo de botão floral. D) Ausência de tubos polínicos no ovário em pistilo de botão floral. Escala = 200µm.....	42
Figura 14. Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos <i>in vivo</i> . A) Presença de tubos polínicos no estigma, estilo e ovário em pistilo de flor na antese, protegida por sacola de papel, no genótipo UFRRJ VIN004. B) Grãos de pólen (seta pequena) e tubos polínicos no estigma (seta grande) em pistilo de flor na antese, protegida por sacola de papel. C) Tubos polínicos no estilo (seta grande) em pistilo de flor na antese, protegida por sacola de papel. D) Presença de tubos polínicos no ovário (seta grande) em pistilo de flor na antese, protegida por sacola de papel. Escala = 200µm.....	43
Figura 15. Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos <i>in vivo</i> . A) Presença de tubos polínicos no estigma, estilo e ovário em pistilo de botão floral, submetido à autopolinização artificial, no genótipo UFRRJ VIN050. B) Grãos de pólen (seta pequena) e tubos polínicos no estigma (seta grande) em pistilo de botão floral, submetido à autopolinização artificial. C) Tubos polínicos no estilo (seta grande) em pistilo de botão floral, submetido à autopolinização artificial. D) Presença de tubos polínicos no ovário (setas grandes) em pistilo de botão floral, submetido à autopolinização artificial. Escala = 200µm.	44
Figura 16. Grãos de pólen viáveis e inviáveis de vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don) após coloração com a solução tripla de Alexander (ALEXANDER, 1969). A) Grãos de pólen inviáveis (setas pequenas) em menor porcentagem em relação aos viáveis (setas grandes). Escala = 80µm. B) Grãos de pólen viáveis (seta grande) apresentaram coloração púrpura e paredes íntegras. O grão de pólen inviável (seta pequena) apresentou citoplasma retraído e não corado. Escala = 40µm. C) Grão de pólen viável (seta grande) mostrando o citoplasma totalmente corado e grão de pólen inviável mostrando o citoplasma plasmolizado (seta	

pequena). Escala = 20µm. D) Grãos de pólen viáveis (seta grande) e inviável (seta pequena). Escala = 20µm.45

Figura 17. Receptividade dos estigmas de flores na antese e de botões florais (flores fechadas) corados com alfa-naftil em *Catharanthus roseus* [L.] G. Don. A) Estigma flor na antese que não foi submetido à solução de alfa-naftil (controle). B) Estigma receptivo de flor na antese. C) Estigma de botão floral (flor fechada) que não foi submetido à solução de alfa-naftil (controle). D) Estigma receptivo de botão floral (flor fechada). Amplificação = 15x.....47

Figura 18. Padrão de amplificação pelo *primer* (GACA)₄ de ISSR em gel de agarose de dez genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don.49

Figura 19. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido a partir da distância de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA, de dez genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don), pertencentes a Coleção de Germoplasma da UFRRJ.50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. OBJETIVO GERAL	2
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
4. JUSTIFICATIVAS.....	3
5. HIPÓTESES.....	3
6. REVISÃO DE LITERATURA	4
6.1. Aspectos gerais de <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don	4
6.1.1. Descrição botânica e morfológica	4
6.1.2. Aspectos agronômicos de cultivo.....	5
6.1.3. Centro de origem e de diversidade	6
6.2. Diversidade genética.....	7
6.2.1 Marcadores moleculares.....	8
6.2.2. Diversidade genética em <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don	10
6.3. Modo de reprodução	11
6.3.1. Modo de reprodução em <i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don	16
6.4. Aspectos gerais do melhoramento genético de vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don)	17
7. MATERIAL E MÉTODOS	20
7.1. Localização da pesquisa e condições edafoclimáticas.....	20
7.2. Coleção de germoplasma e condições experimentais.....	21
7.3. Relação pólen:óvulo (P:O).....	25
7.4. Histoquímica de grãos de pólen.....	27
7.5. Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos <i>in vivo</i>	28
7.6. Viabilidade polínica.....	31
7.7. Receptividade do estigma	32
7.8. Diversidade Genética.....	33
7.8.1. Genotipagem	33
7.8.2. Coleta e extração de DNA genômico	33
7.8.3. Quantificação do DNA genômico	34
7.8.4. Seleção de <i>primers</i> ISSR.....	34
7.8.5. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	35
7.8.6. Fotodocumentação e obtenção da matriz binária	35
7.8.7. Análises estatísticas da diversidade.....	35
8. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
9. CONCLUSÃO	53

10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
11.	ANEXO	73

1. INTRODUÇÃO GERAL

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que uma em cada seis pessoas morre de câncer anualmente no mundo, o que equivale a cerca de 8,8 milhões de pessoas (OMS, 2018). Nesse cenário, medicamentos oriundos de plantas medicinais têm sido desenvolvidos para o tratamento do câncer. Entre as plantas medicinais estudadas com este objetivo, a vinca ou maria-sem-vergonha (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don), espécie hermafrodita pertencente à família Apocynaceae, distingue-se por ser a única a produzir os princípios ativos vincristina (VCR) e vimblastina (VLB) dentre as 3000 espécies recomendadas no tratamento desta doença (SENBAGALAKSHMI et al. 2017). Tais alcaloides são classificados como quimioterápicos citotóxicos que agem durante a mitose celular, permitindo-lhes atingir células cancerígenas de crescimento rápido (BATES & EASTMAN, 2017).

A vinca é identificada por ser uma planta semi-herbácea, porte subarbustivo, de rápido crescimento e ciclo de vida perene (MORGAN, 1994). Fisiologicamente, produz alcaloides antineoplásicos importantes, como a vincristina e a vimblastina, presentes nas folhas e alcaloides anti-hipertensivos (serpentina, ajmalicina e reserpina), encontrados nas raízes (MISHRA et al. 2001). No entanto, mais de 130 alcaloides, chamados coletivamente de *terpenoid indole alkaloids* (TIAs), já foram extraídos da vinca (WANG et al. 2011). Alguns desses alcaloides são utilizados para o tratamento de linfomas, leucemias, cânceres de mama, pulmão, testículo e sarcoma de Kaposi (UNNATI et al. 2013).

Apesar da reconhecida importância medicinal, esses alcaloides apresentam níveis muito baixos na vinca (JUNAID et al. 2010). Segundo Tyler (1988) encontram-se concentrações de vincristina e vimblastina, de 20 mg.ton⁻¹ e 1g.ton⁻¹ de material vegetal, respectivamente. Esses reduzidos níveis de vincristina e vimblastina estão principalmente associados à separação espacial de locais biossintéticos (YU & DE LUCA, 2013). Os precursores biossintéticos, catarantina e vindolina, dos referidos alcaloides, são produzidos em regiões distintas nas folhas. A catarantina é acumulada quase exclusivamente nos exsudatos de cera na superfície da folha, enquanto a vindolina é produzida em células foliares internas especializadas (ROEPKE et al. 2010). Um outro entrave é que a síntese total destes alcaloides em laboratório não é simples, devido à complexidade estrutural das moléculas e etapas de reação que envolvem restrições estereoquímicas (VERMA et al. 2007).

Nesse sentido, busca-se construir bases de um programa de melhoramento genético da vinca, uma vez que existem poucos trabalhos para o desenvolvimento de genótipos com altos níveis de alcaloides, a partir das abordagens convencionais de melhoramento (SREEVALLI et al. 2002; VAN DER HEIJDEN et al. 2004). Para isso, é necessário o estudo do modo de reprodução preferencial da espécie, visto que os métodos de melhoramento aplicados para esse fim, são específicos e diferentes, em função do modo de reprodução preferencial (ALLARD, 1960). Alguns estudos experimentais evidenciaram que a autopolinização não ocorre na vinca e os lepidópteros são os responsáveis pela polinização (KULKARNI, 1999; SREEVALLI et al. 2000). Todavia, alguns genótipos que realizaram autofecundação também já foram identificados (KULKARNI et al. 2001, 2005a). Dessa forma, a vinca distingue-se por apresentar grande diversidade quanto ao modo de reprodução, sendo necessário conhecer como os genótipos deste estudo se comportam.

As espécies podem ser classificadas pelo seu modo de reprodução como autógamas ou alógamas, em ambas obrigatórias ou facultativas, dependendo da forma de polinização. As espécies autógamas desenvolveram mecanismos que favorecem a autopolinização, entre eles a cleistogamia, casmogamia e autocompatibilidade, por outro lado a alogamia pode ser favorecida pela dicogamia, hercogamia e autoincompatibilidade (FRANKEL & GALUN, 1977).

Existem diversas metodologias para estudo e determinação do modo de reprodução. De acordo com Cruden (1977), a relação pólen:óvulo (P:O) é uma estimativa que prediz o provável sistema reprodutivo da espécie. Além disso, é um melhor indicador quando comparado à análise da morfologia floral e do tamanho das flores. A razão (P:O) foi usada para determinar o modo de reprodução preferencial em diferentes famílias e espécies vegetais, incluindo *Zingiberaceae* (Wang et al. 2004), *Vaccinium ashei* (BREVIS et al. 2006), *Carica papaya* L. (DAMASCENO JUNIOR et al. 2009), *Papilionoideae* (ETCHEVERRY et al. 2012) e *Aloe saponaria* (CORREDOR-PRADO et al. 2015).

A natureza histoquímica dos grãos de pólen, lipídica ou amilácea, juntamente com o comportamento do polinizador são aspectos que podem auxiliar no estabelecimento do modo de reprodução (DAFNI, 1992). A receptividade do estigma e a viabilidade polínica são outros fatores que devem ser analisados. Segundo Vaissière et al. (2011), o número grãos de pólen viáveis e o período de receptividade do estigma podem inferir sobre o nível de polinização. Técnicas de microscopia de fluorescência tem sido aplicada como uma importante ferramenta auxiliar na determinação do modo de reprodução em espécies vegetais. Vários estudos confirmaram a validade dessa ferramenta (DAMASCENO JUNIOR et al. 2009; ABDELGADIR et al. 2012 e GAO et al. 2015). Nesse sentido, todas as metodologias descritas acima servirão de base no conhecimento do modo de reprodução preferencial em genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don.

Além do estudo do modo de reprodução preferencial, a existência de diversidade genética também é essencial para a condução adequada de programas de melhoramento. Visto que, o sucesso na seleção de genótipos é alcançado quando se dispõe de diversidade genética. Esta pode ser valiosa para inúmeras aplicações, com destaque para a identificação de genitores geneticamente distantes para cruzamentos e maior chance de recuperação de segregantes superiores em gerações avançadas (HALLAUER & MIRANDA FILHO, 1988).

A diversidade genética pode ser acessada através de marcadores moleculares, que revelam polimorfismo ao nível de DNA e não sofrem influência ambiental (SANTANA et al. 2016). Marcadores dominantes, como os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), são simples, reproduzíveis e revelam alto polimorfismo (TIWARI et al. 2015). Além de que podem ser utilizados para estimar a distância genética entre os genótipos e, assim, orientar a escolha de genitores geneticamente complementares. Alguns autores utilizaram os marcadores ISSR para estimar a diversidade genética entre genótipos de vinca (SHAW et al. 2009; LAL et al. 2011; IBRAHIM et al. 2013). Em todos os casos, os resultados indicaram considerável nível de polimorfismo na espécie em questão. Mais recentemente, alguns mapas de ligação foram confeccionados para a vinca (GUPTA et al. 2007; SHOKEEN et al. 2011; CHAUDHARY et al. 2011).

Desse modo, dada a importância da espécie na produção dos princípios ativos vincristina e vimblastina, estudos que visam a organização de uma coleção de germoplasma, bem como o conhecimento do modo de reprodução e da diversidade genética entre os genótipos são de suma importância quando se pretende o aumento da produção dos referidos alcaloides em programas de melhoramento da espécie.

2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por finalidade implantar uma coleção de germoplasma de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ. Assim como conhecer o modo de reprodução preferencial e estimar a diversidade genética entre dez genótipos da coleção, mediante o uso de marcadores de DNA do tipo ISSR.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este trabalho de dissertação objetivou-se conhecer o modo de reprodução preferencial de dez genótipos (UFRRJ VIN004, UFRRJ VIN005, UFRRJ VIN007, UFRRJ VIN008, UFRRJ VIN009, UFRRJ VIN014, UFRRJ VIN029, UFRRJ VIN037, UFRRJ VIN050 e UFRRJ VIN055) da referida coleção de germoplasma de vinca, a partir das seguintes análises:

- Relação pólen:óvulo (P:O);
- Natureza histoquímica dos grãos de pólen;
- Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos *in vivo*;
- Viabilidade polínica;
- Receptividade do estigma.

Bem como, estimar a diversidade genética entre os genótipos descritos acima, utilizando marcadores de DNA do tipo ISSR, em duas etapas, ou seja, através da genotipagem e análise estatística dos dados.

4. JUSTIFICATIVAS

Uma das razões que nortearam o desenvolvimento deste estudo são os baixos níveis encontrados dos alcaloides vincristina e vimblastina. Dessa forma, esta pesquisa centra-se no modo de reprodução preferencial dos genótipos da espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, posto que o modelo geral de um programa de melhoramento de cada espécie é tão motivado pelo seu modo de reprodução, como por qualquer outra característica exclusiva da espécie (ALLARD, 1960). Assim sendo, o conhecimento do sistema reprodutivo é fundamental para a condução de programas de melhoramento, pois os métodos de melhoramento são determinados em função da natureza alógama e autógama do material a ser melhorado. Essa compreensão é ainda mais substancial, em virtude da diversidade de sistemas reprodutivos da vinca encontrados na literatura.

A análise da diversidade genética entre os genótipos de vinca também é uma justificativa marcante para a realização deste estudo. Já que, a partir desta análise é possível a escolha de parentais de alta performance agrônômica, uma vez que, quando cruzados, resultam num maior efeito heterótico. Além disso, possibilita a identificação de genitores geneticamente complementares, que, ao serem inter cruzados, poderão originar populações com maior variabilidade e com maior probabilidade de recuperação de genótipos superiores nas gerações segregantes (CASTRO et al. 2011; CRUZ et al. 2012). Portanto, maior possibilidade de se localizar, na coleção, genótipos contendo os princípios ativos de interesse, vincristina e vimblastina.

Isto posto, o estudo do modo de reprodução preferencial e de diversidade genética podem dar suporte, futuramente, para um programa de melhoramento genético da vinca na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, com a finalidade de identificar genótipos com níveis satisfatórios dos alcaloides vincristina e vimblastina.

5. HIPÓTESES

A conclusão do modo de reprodução dos genótipos é uma das hipóteses prováveis. Ao final deste estudo, será possível conhecer o modo de reprodução preferencial dos genótipos de vinca, ou seja, a existência de cleistogamia, autogamia obrigatória, autogamia facultativa, alogamia facultativa ou alogamia obrigatória, através da natureza histoquímica dos grãos de pólen, emissão e desenvolvimento de tubos polínicos *in vivo*, razão pólen:óvulo (P:O), receptividade do estigma e viabilidade polínica. Dessa maneira, gerar resultados expressivos ao

definir os métodos de melhoramento mais adequados em função do modo de reprodução preferencial dos genótipos analisados.

A presença de variabilidade genética no banco de germoplasma, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, constitui-se em uma outra hipótese plausível, uma vez que os genótipos foram coletados e adquiridos em seis locais distintos. Para tal, a estimação da diversidade genética poderá fornecer genótipos portadores de características desejáveis, com capacidade de inclusão em programas de melhoramento da vinca. Caso contrário, será necessário a inserção de novos genótipos de vinca, essa introdução teria por objetivo ampliar a base genética, resultando em maiores chances de se identificar genótipos promissores quanto aos princípios ativos vincristina e vimblastina.

6. REVISÃO DE LITERATURA

6.1. Aspectos gerais de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don

6.1.1. Descrição botânica e morfológica

A vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) é uma espécie herbácea ou semi-herbácea pertencente à família Apocynaceae e ao gênero *Catharanthus*, composto por 8 espécies (ALLORGE et al. 2015). Esta espécie apresenta crescimento rápido, cuja altura varia de 75 cm-1,00 m, sub-lenhosa na base e muito ramificada (KULKARNI et al. 2016). Seu caule é arredondado, verde ou amarelo, às vezes vermelho ou roxo, levemente penugento (pubescente) ou glabro. É uma planta ereta ou decumbente, geralmente com látex no caule e suas raízes podem atingir até 70 cm de comprimento (PLAIZIER, 1981).

As folhas são opostas, usualmente elípticas a oblongas, com comprimento e largura de 2,50-9,00 e 1,00-3,50 cm, respectivamente. Estas folhas estão conectadas a pecíolos verdes ou vermelhos, curtos, de 1,00-1,80 cm de comprimento. A superfície adaxial apresenta coloração verde intenso, enquanto na superfície abaxial predomina o verde pálido, com nervura central também pálida (NEJAT et al. 2015). A extremidade da folha é arredondada para aguda, com um pequeno ponto que se prolonga a partir da nervura central, geralmente são pubescentes, porém, às vezes, sem pelos (TOLAMBIYA & MATHUR, 2016). Os alcaloides presentes nas folhas ocorrem em quantidades muito pequenas: vincristina em até 3 g.ton⁻¹ de material vegetal seco e vimblastina em uma quantidade ligeiramente maior (PROTA, 2015). Em contraponto, Tyler (1988) e Lata (2007), descreveram concentrações de vimblastina e vincristina de 1 g.ton⁻¹ e 20 mg.ton⁻¹ de material vegetal, respectivamente.

Segundo Kulkarni et al. (2016), as flores são hermafroditas, actinomórficas, completas e pentâmeras. Apresentam cores variando de branco, rosa escuro e malva, à rosa tradicional (NEJAT et al. 2015). As sépalas são ligeiramente fundidas na base com 3-5 mm de comprimento, eretas e verdes. A corola é cilíndrica de 2-3 cm de comprimento, alargando-se perto do topo na inserção dos estames e pode apresentar inúmeras cores: rosa, roxo ou branco com um centro roxo, vermelho, rosa, amarelo pálido ou branco (FLORA OF CHINA EDITORIAL COMMITTEE, 2015; PROTA, 2015). Os estames, que estão inseridos na parte mais larga do tubo da corola, são muito pequenos, com 0,25-0,5 mm de comprimento. As anteras são livres, oblongas e obtusas na base, com uma dimensão de 2,30-3,00 a 1,00-1,30 mm (PLAIZIER, 1981). A vinca possui morfologia floral única, com anteras e estigmas não visíveis no exterior das flores (MIYAJIMA, 2004).

O fruto é composto por dois folículos cilíndricos longos, divergentes ou paralelos, de 2,00-4,70 cm de comprimento, contendo de 10-30 sementes, deiscentes na maturidade. As sementes são pequenas com 1,50-3,00 mm de comprimento, oblongas, cilíndricas, não ariladas, e com hilo em uma depressão longitudinal (TOLAMBIYA & MATHUR, 2016; KULKARNI et al. 2016).

6.1.2. Aspectos agronômicos de cultivo

No que diz respeito aos aspectos agronômicos, existem poucas pesquisas na literatura para a espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don (FERREIRA, 2003). De acordo com Lata (2007), a qualidade e a concentração de alcaloides na vinca depende de fatores climáticos e de solo, propagação, semeadura, plantio, fertilização, irrigação e data de colheita. Também é preciso mencionar a variabilidade genética existente, pois essa pode ser uma das causas da produção inconstante na espécie.

A vinca apresenta distribuição cosmopolita, se desenvolvendo em climas variados. No entanto, o seu crescimento é facilitado nas áreas tropicais e subtropicais (NMPB, 2014). Em relação as necessidades hídricas, Naeem et al. (2017) descreveram que a cultura se estabelece bem com precipitação média anual de 800 a 1400 mm, podendo ser encontrada desde o nível do mar até 1500 m de altitude.

A cultura se desenvolve em uma grande variedade de solos, exceto aqueles excessivamente alcalinos ou encharcados (FAROOQUI, 2001). São preferidos os solos com pH de 5,5-6,5, ricos em húmus e de fertilidade média. Neste tipo de solo não há apenas um melhor desenvolvimento das raízes, mas também se torna fácil tirá-las no momento da colheita (NMPB, 2014; PROTA, 2015).

No tocante ao plantio e propagação da espécie, segundo Narkiewicz & Sadowska (1991), é igualmente possível por sementes e estacas. Sob as zonas tropicais e subtropicais, consideradas mais adequadas para o cultivo de vinca, as sementes são depositadas diretamente no solo (MAITI et al. 2000). No entanto, em regiões temperadas devem ser propagadas por estacas, previamente preparadas em casa de vegetação (SADOWSKA, 1989). Esses diferentes métodos de propagação não tiveram influência sobre o rendimento dos alcaloides (PAREEK et al. 1985). A taxa de semeadura para as sementes depositadas diretamente no solo ou para as mudas transplantadas é de 2-3 kg/ha e 0,5 kg/ha, respectivamente (GUPTA, 1977). O espaçamento preconizado no plantio das sementes é de 45 x 30 cm ou 45 x 45 cm. Para mudas de 45 a 60 dias de idade adota-se um espaçamento de 45 x 20 cm (NEJAT et al. 2015). A densidade de plantio mais recomendada é de 75000 plantas/ha (MAITI et al. 2000).

Dentre os tratos culturais empregados no cultivo da vinca destaca-se a adubação, uma vez que a nutrição mineral pode aumentar o teor e o rendimento de alcaloides (JANA, 1996). Estes são compostos nitrogenados, portanto, o nitrogênio pode desempenhar um papel importante na biossíntese e acumulação de alcaloides nas plantas. Todavia, segundo Tebet et al. (1996) e Sreevalli et al. (2004), a fertilização promove um aumento na biomassa das plantas e, com isso, ocorre maior rendimento de alcaloides e não no teor dos mesmos. Diante disso, já foram testadas diferentes aplicações de nitrogênio de 50 a 150 kg/ha com o objetivo de observar o rendimento de alcaloides. Hassan et al. (2009) encontraram maior rendimento de vincristina e vimblastina na dose de 150 kg/ha, o mesmo resultado foi observado nos trabalhos desenvolvidos por Gholamhosseinpour et al. (2011) e Rajeswara Rao et al. (1990). No que se refere ao momento de aplicação, Gupta (1977) descreve que o nitrogênio pode ser fornecido em duas parcelas (15 e 45 dias após o plantio), enquanto Hedge (1986) propõe três aplicações (1/3 no plantio, 1/3 aos 60 dias e 1/3 aos 120 dias após o plantio). Com relação aos outros macronutrientes, como fósforo e potássio, estes apresentaram um menor efeito sobre o rendimento dos alcaloides (LATA, 2007).

A irrigação configura-se como um fator importante no rendimento de alcaloides da vinca. Ahmed e El-Hassen (2001) relataram em duas cultivares de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don que com o aumento do intervalo de irrigação a altura da planta foi significativamente reduzida, já o número de ramos, o peso seco de raízes, a produção de folhas e o conteúdo de alcaloides foram maiores. Ademais, condições de déficit hídrico também podem causar alterações relevantes na cultura. Para isso, a produção de alcaloides foi monitorada frente a

condições de seca e os resultados mostraram diminuição do rendimento de alcaloides sob estresse hídrico (FRISCHKNECHT et al. 1987). Portanto, em áreas onde a precipitação é restrita recomenda-se o uso da irrigação. Porém, nos locais onde as chuvas são bem distribuídas esta prática é dispensável (NMPB, 2014).

A produtividade de folhas e raízes com irrigação é de 1,5 ton.ha⁻¹ e 0,5 ton.ha⁻¹, respectivamente e o rendimento de folhas e raízes sob condições de chuva é de 0,75 ton.ha⁻¹ (NMPB, 2014). A colheita da vinca, para folhas e raízes, realiza-se cerca de 12 meses a partir da semeadura. Esta atividade é efetuada arrancando-se toda a planta, porém as raízes são separadas do resto da planta e ambas as partes são processadas separadamente. Se houver apenas demanda por folhas, realiza-se duas colheitas, a primeira aos 6 meses e a segunda aos 9 meses, após a semeadura (PROTA, 2015). Levy et al. (1983) relataram que o comportamento dos componentes da parte aérea e da produção de ajmalicina nas raízes, em diferentes linhagens e híbridos, indica que o período ótimo de colheita se dá no alongamento da vagem. Nesta fase, o teor de ajmalicina das raízes e o peso das folhas atingiram seus máximos. Além deste resultado, os referidos autores observaram significativas correlações fenotípicas e ambientais entre os pesos da folha e da raiz. Deste modo, permite o uso duplo da planta, isto é, folhas para a extração de vincristina e raízes para a produção de ajmalicina.

As doenças são fatores limitantes para diversas plantas de interesse econômico, nesse sentido é fundamental mencionar as principais doenças encontradas na espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don. Entre as doenças fúngicas associadas à espécie, pelo menos 55 fungos foram relatados em diversos países do mundo (FARR et al. 2015). Segundo Alves (2016), no Brasil, já foram encontrados os seguintes fungos patogênicos relacionados à vinca: *Cercospora* sp. (mancha foliar), *Colletotrichum siamense* (necrose nas hastes), *Colletotrichum truncatum* (mancha foliar), *Corynespora cassiicola* (mancha alva) e *Lasiodiplodia theobromicola* (podridão de colo). No Distrito Federal, outros fungos foram registrados por Reis & Henrique (2007), a saber: *Phytophthora nicotianae* e *Rhizoctonia solani*. Contudo, no banco de dados “Fungos Relatados em Plantas no Brasil”, apenas *Botryosphaeria ribis* está listado como fitopatógeno (EMBRAPA, 2018). Além das doenças causadas por fungos, foram encontradas algumas viroses como: *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Catharanthus mosaic virus* (CatMV), provocando sintomas de má formação das folhas e de mosaico (SEABRA et al. 1999; MACIEL et al. 2011).

6.1.3. Centro de origem e de diversidade

A coordenação das pesquisas iniciais sobre a distribuição geográfica das espécies cultivadas foi desenvolvida pelo geneticista russo Nicolay Ivanovich Vavilov (1887-1943). Na sua concepção, o centro de origem de uma cultura correspondia à região geográfica onde o ancestral de uma dada espécie apresentava elevada diversidade genética e à medida que se aproximava da periferia da distribuição exibia menor variabilidade. Vavilov identificou essas regiões através de expedições de levantamento e coleta em todo o mundo. Nas últimas décadas, tal afirmação proposta por Vavilov foi contestada em relação à algumas espécies. Para o milho, por exemplo, não houve divergências quanto ao centro de origem. Mesmo assim, a teoria de Vavilov dificilmente é validada pelos autores contemporâneos, uma vez que o centro de origem de uma espécie pode não coincidir com a região em que esta manifesta maior diversidade genética.

Alguns autores investigaram os denominados “centros de Vavilov”, entre eles Zhukovsky (1965), um colaborador bem próximo de Vavilov, e, posteriormente Zeven e Zhukovsky (1975). Estes autores propuseram 12 megacentros de diversidade e, basicamente, acrescentaram mais quatro centros aos oito já propostos por Vavilov. Mais à frente novas considerações e críticas surgiram a respeito da teoria de Vavilov.

Uma das críticas à Vavilov foi feita por Harlan (1975), que sugere em certas culturas a existência dos centros de origem e em outras não. A partir disso, Harlan criou a teoria dos Centros e Não-centros, apoiada nos componentes espaço e ação humana como os principais motivadores do modelo de distribuição geográfica das espécies cultivadas. Em função da atividade humana, ou seja, formas de uso e manejo cultural das espécies, as civilizações influenciavam a dispersão geográfica das espécies e, portanto, para este autor, devem ser estudadas separadamente.

Hawkes (1983), também foi um crítico da teoria de Vavilov mencionando que a agricultura não teria se originado de uma única vez, e sim, provavelmente, concomitantemente em inúmeras regiões do globo terrestre, devido a necessidade do estabelecimento dos povos em um local fixo, deixando de ser nômades. Para tanto, Hawkes apresentou os seguintes conceitos: centros nucleares e regiões de grande diversidade. Centros nucleares seriam os locais que a agricultura teria se originado com provas arqueológicas da ocorrência dos ancestrais silvestres das espécies, enquanto regiões de grande diversidade seriam às áreas nas quais a agricultura teria se dispersado junto com o processo de migração do homem, tanto por seleção consciente quanto inconsciente. Neste último, não há sinais arqueológicos da presença do ancestral silvestre da espécie.

Atualmente, a definição proposta por Vavilov para centro de origem foi complementada com a inclusão da nova expressão centro de diversidade. O centro de origem seria a região geográfica onde o ancestral silvestre de uma cultura distribui-se em estado nativo, e compreende-se por centro de diversidade a região geográfica onde se concentra um número elevado de espécies de um gênero, ou de gêneros de uma família, contrastando com sua menor frequência em outras regiões (SALOMÃO, 2010).

O gênero *Catharanthus* é composto por oito espécies, das quais sete são endêmicas de Madagascar e uma, *Catharanthus pusillus*, é originária da Índia (NEJAT et al. 2015). Sendo assim, a espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don é considerada autóctone das Índias Ocidentais, mas foi originalmente descrita em Madagascar (ROSS, 1999). A vinca foi introduzida em Paris em 1757 e atualmente está presente em muitas regiões tropicais e subtropicais. Comercialmente é cultivada na Espanha, Estados Unidos, China, África, Austrália, Índia e Sul da Europa para fins medicinais (VAN DER HEIJDEN et al. 2004; DAS et al. 2017). O Brasil pode ser considerado como uma área geográfica onde existe diversidade morfológica e/ou genética na espécie, sendo assim, pode-se inferir que este país se caracteriza como um centro de diversidade.

6.2. Diversidade genética

Define-se diversidade genética como qualquer medida quantitativa ou diferença genética, ao nível de sequência ou frequência alélica, que possa ser calculada entre indivíduos, populações ou espécies (BEAUMONT et al. 1998; MOHAMMADI & PRASANNA, 2003). Falconer (1987) afirma que a diversidade genética se encontra na diferença entre as frequências alélicas. Em programas de melhoramento o estudo de diversidade genética é fundamental, pois permite a definição de estratégias de seleção objetivando cruzamentos mais eficientes e a localização de genes/alelos de interesse (FERREIRA, 2007). Dessa maneira, é necessário o conhecimento minucioso da diversidade genética para obtenção de materiais genéticos superiores. Segundo Milach (1998), o estudo da diversidade genética pode ser baseado em caracteres agronômicos ou moleculares, permitindo, desta forma, a obtenção de genótipos superiores.

O conhecimento da diversidade genética em uma coleção de germoplasma é muito válido, pois proporciona a organização dos bancos evitando genótipos muito próximos ou

duplicatas. De acordo com Beuselinck & Steiner (1992), a ocorrência de duplicatas dentro de coleções de germoplasma aumentam os custos e dificulta a manutenção adequada das mesmas.

Os estudos de diversidade genética apresentam grande relevância no melhoramento genético de plantas, por meio da quantificação da variabilidade genética e, assim, na identificação de genótipos superiores. Nas coleções de germoplasmas a estimação da diversidade genética entre acessos, contribui na identificação de genitores com capacidades combinatórias ou complementação alélicas favoráveis, quando o propósito é a exploração da heterose em híbridos.

Cruz e Carneiro (2003) afirmaram que a análise da diversidade genética permite conhecer o grau de seleção da variabilidade genética das populações vegetais e subsidia a seleção de genitores geneticamente mais divergentes, que poderão ser utilizados em intercruzamentos com possibilidade de aumentar a probabilidade de recuperação de segregantes superiores em gerações avançadas. Ainda segundo estes autores, esta análise permite a identificação de genitores divergentes e adequados para se obter híbridos de maior efeito heterótico.

Além de promover a identificação de genitores divergentes e possuidores de características complementares, a diversidade genética é de grande importância para estudos relacionados à evolução das espécies, fornecendo informações a respeito dos recursos disponíveis, bem como para auxiliar na localização e no intercâmbio desses recursos (CASTRO et al. 2011).

Nesse sentido, a diversidade genética pode ser utilizada de maneira eficiente, apenas se for corretamente avaliada e quantificada. Sendo a caracterização molecular de acessos fundamental para a exploração do potencial das coleções de germoplasma, tal caracterização pode ser realizada através de marcadores moleculares. Estes podem ser baseados em enzimas (isoenzimas e aloenzimas) e em ácidos nucleicos (marcadores de DNA) (PATERSON et al. 1991b).

6.2.1 Marcadores moleculares

Ferreira e Grattapaglia (1998) definiram marcador molecular como sendo “todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico do DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma”. Seu uso tem por finalidade revelar polimorfismos e avaliar diferenças entre dois ou mais indivíduos (BERED et al. 1997). Para isso, tem sido aplicado a muitas questões biológicas como o mapeamento genético, genética de populações, análises de diversidade e divergência genética (AGARWAL et al. 2008). Já em programas de melhoramento os marcadores moleculares podem ser empregados em uma etapa inicial, permitindo o gerenciamento da diversidade genética dos indivíduos utilizados, ou mesmo em etapas posteriores, como em trabalhos de seleção assistida por marcadores (SAM). Nas coleções de germoplasma os marcadores permitem a identificação e caracterização dos acessos, além disso são uma ferramenta auxiliar no processo de seleção e obtenção de ganhos genéticos (SOUZA, 2015).

Os primeiros marcadores a serem utilizados foram os morfológicos, estes são determinados por fenótipo de fácil identificação visual, normalmente identificados por um único loco e geralmente apresenta herdabilidade igual a 1,0 (RAMALHO et al. 2008). Porém, seu uso tornou-se limitado devido ao reduzido número de marcadores, a influência do ambiente na sua expressão, nem sempre possuem herdabilidade igual a 1,0 e são controlados comumente por alelos dominantes (FREITAS & BERED, 2003).

Com a técnica de PCR (reação da polimerase em cadeia) baseada na duplicação quantitativa da molécula de DNA, por meio de sua replicação *in vitro*, surgiram novos marcadores moleculares (MULLIS & FALOONA, 1987). Podendo ser classificados, segundo

Milach (1998), em dois grupos, os de hibridização e os de amplificação do DNA. Os principais marcadores identificados por hibridização são RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minissatélites ou locus VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Outros como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeat*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) e STS (*Sequence Tagged Sites*) são revelados por amplificação, via PCR (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Estes diferentes tipos diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade ao nível do DNA, assim como quanto à capacidade de gerar diferenças entre indivíduos (polimorfismo), custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (COSTA, 2010).

Deve-se ressaltar que cada marcador apresenta características próprias que devem ser consideradas na tomada de decisão de qual utilizar em uma análise. Os marcadores RAPD são os de menor custo. Além disso, por utilizar *primers* de sequência arbitrária, os marcadores RAPD permitem a realização de análises genéticas sem a necessidade de conhecimento prévio do DNA da espécie a ser estudada, porém como principal limitação apresentam um baixo conteúdo de informação genética por loco (LACERDA, 2002). Os marcadores AFLP são extremamente robustos com a detecção de altos índices de polimorfismos, revelando grande quantidade de locos e com alta repetibilidade, possui como desvantagem a herança dominante (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores microssatélites, também conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*), são de alta repetibilidade e de custo médio, no entanto a grande limitação está no seu desenvolvimento demorado e trabalhoso, devido à necessidade de construção de bibliotecas genômicas e *screening* de milhares de clones com sondas apropriadas (KÖLLIKER, 2001). Os marcadores ISSR são caracterizados por ser uma técnica simples, rápida, eficiente, possuir alta reprodutibilidade e gerar altos índices de polimorfismo (REDDY et al. 2002). Pode-se dizer que combinam a facilidade do RAPD com a robustez dos marcadores AFLP e SSR.

Entretanto, avanços em biologia molecular têm levado à introdução de outros tipos de marcadores moleculares. Dentre eles, os marcadores microssatélites gênicos (SSR-EST ou SSR's gênicos), *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) e *Target Region Amplification Polymorphism* (TRAP).

A presença de microssatélites em sequências codantes foi relatada por Wang et al. (1994) analisando repetições de microssatélites (mononucleotídicas e tetranucleotídicas) nos bancos de dados de sequências de DNA de diversas espécies vegetais. O banco de dados obtido é o resultado do sequenciamento de várias bibliotecas de cDNA, isto é, sequências de DNA correspondentes aos genes expressos nos diversos tecidos da planta em vários estágios de desenvolvimento (RUDD, 2003). Estas coleções de dados de sequências expressas (EST's) têm permitido o desenvolvimento de marcadores microssatélites a partir de sequências repetitivas no próprio banco de dados. Os marcadores microssatélites provenientes das EST's são também conhecidos como SSR-EST ou SSR's gênicos. Tais marcadores apresentam certas vantagens por serem desenvolvidos a partir de regiões transcritas do genoma, pois um marcador derivado de EST que esteja associado a um caráter de interesse pode ser parte do próprio gene controlando o caráter (THIEL et al. 2003). Além disso, possuem uma maior transferibilidade entre espécies correlacionadas podendo ser usados com sucesso no mapeamento comparativo (YU et al. 2004).

Os SNP's (*Single Nucleotide Polymorphism*) são variações de nucleotídeos ou pequenas inserções/deleções nas sequências de bases em fragmentos homólogos de DNA (COLLINS et al. 1998). Estudos recentes têm comprovado o potencial dos SNP's, como o marcador com maior potencial para detecção de variação entre genomas, sendo o tipo de polimorfismo de sequência de DNA mais comum entre alelos (BROOKES, 1999). Por isso e pela grande disponibilidade de EST's (*Expressed Sequence Tags*) nos bancos de dados, são considerados

um dos mais importantes marcadores para o mapeamento genético, geração de mapas de alta resolução e estudos de associação (ZHU et al. 2007). Do ponto de vista prático, os SNP's são marcadores bialélicos e codominantes, de forma que o conteúdo informativo em um único SNP é limitado, em comparação com os marcadores microssatélites (SSR) que são polialélicos (GUPTA et al. 2001; ORAGUZIE et al. 2007).

No início dos anos 2000, Hu & Vick (2003) desenvolveram a técnica *Target Region Amplification Polymorphism* (TRAP), baseada em ferramentas de bioinformática e dados de EST's (*Expressed Sequence Tags*) para obter marcadores a partir de sequências alvo de genes candidatos. Esta técnica utiliza dois *primers*, um de natureza fixa e outro de natureza arbitrária. Dessa maneira, o polimorfismo é produzido a partir da combinação de um primer fixo, desenhado a partir de uma sequência EST de interesse, e um *primer* aleatório.

Nesse sentido, torna-se evidente que existem diversas técnicas consolidadas para estimar a diversidade genética, através do uso de marcadores moleculares. Sendo assim, é possível avaliar as relações genéticas, verificar ou predizer o nível de variabilidade e sua distribuição dentro das coleções de germoplasma com maior segurança, rapidez e eficiência.

6.2.2. Diversidade genética em *Catharanthus roseus* [L.] G. Don

Apesar da variação considerável observada na espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don em todo o mundo, até alguns anos atrás, existiam poucos estudos sobre as relações genômicas da espécie (SHAW et al. 2009). Nesta investigação, em uma primeira tentativa, os autores citados anteriormente estudaram a diversidade genética entre 14 cultivares de vinca, por meio de marcadores RAPD e ISSR. Os *primers* RAPD resultaram na amplificação de 56 bandas, entre as quais 46 (82%) foram polimórficas. Já os *primers* ISSR, amplificaram 31 *loci*, dos quais 17 (55%) foram polimórficos e 14 (45%) monomórficos. No dendrograma construído baseado nos dados de RAPD e ISSR foram obtidos dois grupos. O menor grupo inclui as cultivares *Blue Pearl* e *Patricia White* e o maior grupo foi subdividido em dois subgrupos com *First Kiss Polka Dot* isolado do restante das cultivares. Portanto, os marcadores RAPD e ISSR foram eficientes para discriminar as 14 cultivares, constatando a relevância destes marcadores no estudo da diversidade genética em vinca.

Lal et al. (2011) avaliaram a diversidade genética em nove cultivares de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, a partir de marcadores moleculares RAPD, ISSR e SSR. Utilizando vinte *primers* RAPD, seis amplificaram 592 bandas, das quais 466 eram polimórficas, caracterizando alto polimorfismo (78,71%) entre cultivares, tal fato é semelhante aos resultados de Shaw et al. (2009). Com os marcadores ISSR e SSR, observou-se um polimorfismo de 78,94% e 76,62%, respectivamente. Tais resultados indicam considerável polimorfismo entre os genótipos estudados.

Ibrahim et al. (2013) adotaram as mesmas características dos trabalhos relatados acima, isto é, caracterização molecular de seis cultivares de vinca utilizando marcadores moleculares RAPD e ISSR. Estes autores observaram para os marcadores RAPD 18 bandas polimórficas (44%). Já com os marcadores ISSR, obtiveram 50 fragmentos amplificados, 30 deles foram polimórficos (60%). O dendrograma da combinação dos marcadores RAPD e ISSR resultou em dois grupos. O grupo menor incluiu a cultivar *Crimson red* e os grupos maiores as cultivares: *Milky white* com halo vermelho, *Dark pink*, *Milky white*, *Purple* e *Light pink*. Os índices de similaridade e analisando-se o dendrograma para as distâncias genéticas, revelaram que a maior similaridade foi de 92% entre cultivares *Crimson red* e *Light pink*, já para as cultivares *Milky white* com halo vermelho e *Dark pink*, a similaridade foi zero.

Nota-se que os trabalhos descritos acima efetuam poucas inferências em aspectos do melhoramento genético e conduzem enfoque maior na biologia molecular. No entanto, mais recentemente, trabalhos com mapas de ligação (GUPTA et al. 2007; SHOKEEN et al. 2011;

CHAUDHARY et al. 2011) e identificação e mapeamento de QTLs na vinca (SHARMA et al. 2012; CHAUDHARY et al. 2013; BARIK & SAO, 2015) fornecem importantes informações para programas de melhoramento da cultura, a partir da detecção de regiões no genoma associadas a características quantitativas.

6.3. Modo de reprodução

O conhecimento do modo de reprodução de uma espécie é essencial para a condução adequada de programas de melhoramento e conservação genética, já que os métodos aplicados para esse fim são diferentes e específicos, em função do sistema de reprodução prevalecente e também é essencial para a compreensão do processo de domesticação (SILVA et al. 2001; FERREIRA et al. 2004).

Segundo Brown (1990), as espécies vegetais podem ser incluídas em cinco classes de cruzamento, predominantemente alógama, predominantemente autógama, sistema misto de reprodução, parcialmente autógamas nos gametófitos e parcialmente apomíticas. Fryxell (1957) classificou em quatro os sistemas reprodutivos mais frequentes nas angiospermas: alogamia, autogamia, apomixia e sistema misto. Enquanto, Cruden (1977) propôs uma classificação do provável modo de reprodução das espécies em: cleistogâmica, autógama obrigatória ou facultativa, alógama obrigatória ou facultativa. Para este mesmo autor, as espécies autógamas facultativas realizam autofecundação com baixa taxa de polinização cruzada, ao passo que as alógamas facultativas efetuam polinização cruzada com baixa taxa de autofecundação.

De maneira geral, nas espécies autógamas a reprodução ocorre, preferencialmente, por autofecundações naturais, podendo, no entanto, ocorrer até 5% de cruzamentos naturais, isto é, realizam autofecundação acima de 95%. Por outro lado, as espécies alógamas reproduzem-se via cruzamentos naturais e eventualmente por autofecundações naturais, representam aquelas que, preferencialmente, realizam polinização cruzada acima de 95%.

Dentre as diversas variações fisiológicas, morfológicas e até genéticas, relacionadas à reprodução, podemos ressaltar as que comumente vêm sendo relatadas para favorecer a alogamia, entre elas destacam-se: a dicogamia, monoecia, dioecia, hercogamia e a autoincompatibilidade.

A dicogamia é uma estratégia encontrada, geralmente em flores hermafroditas, como sendo uma separação temporal na maturação dos órgãos reprodutivos, podendo se apresentar na forma de protândria (órgão masculino libera os grãos de pólen antes da receptividade estigmática), e protoginia (órgão feminino está pronto antes da abertura das anteras) (WEBB & LLOYD, 1986; BARRETT, 1998).

A monoecia é a condição em que as plantas produzem flores femininas e masculinas separadas espacialmente no mesmo indivíduo (BARRETT, 1998). Por outro lado, a dioecia é um polimorfismo sexual no qual as populações são compostas de plantas femininas e masculinas, isto é, separa completamente os órgãos sexuais, apresentando indivíduos masculinos, com flores estaminadas, e indivíduos femininos, com flores pistiladas (BAWA, 1980; BARRETT, 1998). Dessa maneira, ambos os mecanismos favorecem a polinização cruzada.

Um outro mecanismo que impede a autofecundação e favorece a alogamia se dá através da separação espacial entre as anteras e estigma, chamado de hercogamia (FETSCHER, 2001). A hercogamia também pode se apresentar na forma de heterostilia (WEBB & LLOYD, 1986). Esta define-se como um polimorfismo floral controlado geneticamente em que as populações podem ser compostas por dois (distilia) ou três (tristilia) tipos florais que diferem na altura de seus estigmas e anteras (GANDERS 1979; BARRETT, 1992; BARRETT & SHORE, 2008). Grande parte das espécies heterostílicas são distílicas, e apresentam indivíduos com flores de estames longos e estilete curto, denominado brevistila, e outros com flores de estames curtos e

estilete longo, chamado longistila. Além da distília, espécies heterostílicas podem exibir mecanismos de incompatibilidade (BARRETT, 1992).

A autoincompatibilidade é a incapacidade de uma planta fértil formar sementes quando fertilizada pelo seu próprio pólen, ou seja, é a falta de capacidade de uma planta fértil, hermafrodita, produzir zigotos após a polinização. Esse processo é dado pela presença de uma séria alélica no loco S altamente polimórfico (SCHIFINO-WITTMANN & DALL'AGNOL, 2002). É um dos mecanismos mais importantes e eficientes que as espécies vegetais hermafroditas utilizam para evitar autofecundações e, assim, favorecer a alogamia, promovendo, desta forma, a manutenção da variabilidade genética (LEWIS & JONES, 1992).

Existem dois tipos principais de autoincompatibilidade: gametofítica e esporofítica. No sistema gametofítico, a incompatibilidade é controlada por um único alelo S e não há nenhuma relação de dominância entre eles. Quando um grão de pólen contém um alelo S, também presente no estigma, o desenvolvimento do tubo polínico não acontece. Já no sistema esporofítico, o que determinará a ocorrência ou não da incompatibilidade não será o alelo que o grão de pólen carrega, mas sim os alelos presentes no tecido diploide da planta mãe. Neste sistema existe relação de dominância entre os alelos S. Portanto, não agem de forma independente, isto é, dependem fortemente do genitor materno (SCHIFINO-WITTMANN & DALL'AGNOL, 2002).

Por outro lado, as plantas autóгамas desenvolveram mecanismos que favorecem a autogamia. Entre eles destaca-se a cleistogamia, um fenômeno comum em plantas cultivadas e homogâmicas, isto é, os grãos de pólen e o estigma estão receptivos ao mesmo tempo quando a flor ainda está fechada (FRANKEL & GALUN, 1977).

Sendo assim, percebe-se que as plantas exibem uma grande diversidade de sistemas reprodutivos e para compreensão, além das análises habituais de polinização controlada e natural, também é importante a investigação minuciosa de aspectos como: número de grãos de pólen por antera, viabilidade dos grãos de pólen, desenvolvimento do tubo polínico, razão de grãos de pólen por óvulo, dimensões do ovário, determinação do período de receptividade do estigma, dentre outros (CRUDEN & MILLER-WARD, 1981). Diante disso, algumas metodologias foram desenvolvidas com a finalidade de conhecer o modo de reprodução das espécies.

A razão pólen:óvulo (P:O), segundo Cruden (1977) é uma estimativa que sugere o provável modo de reprodução das espécies. Essa metodologia é a melhor forma de prever o sistema reprodutivo, quando comparado a características morfológicas. Além disso, é uma ferramenta rápida e de baixo custo em relação as técnicas que utilizam os marcadores moleculares ou as que necessitam de realizar cruzamentos (CRUDEN, 2000).

Cruden (1977) estudou a razão (P:O) em 80 espécies diferentes e propôs uma classificação baseada na proporção de grãos de pólen por óvulos, e assim, classificou as espécies em cleistogâmica (P:O = 2,7 - 5,4), autógamma obrigatória (P:O = 18,1 - 39,0) ou facultativa (P:O = 31,9 - 396,0), ou alógama obrigatória (P:O = 2.108,0 - 195.525,0) ou facultativa (P:O = 244,7 - 2.588,0). Após este estudo, chegou à seguinte conclusão: quanto mais eficiente for a transferência de pólen para o estigma, menor será a relação (P:O). Portanto, quanto maior o grau de autogamia, a espécie terá menor razão (P:O) e espécies de polinização cruzada indicavam maiores valores de relação (P:O).

Diversas pesquisas validaram a relação (P:O) como um estimador do modo de reprodução de plantas (MIONE & ANDERSON, 1992; LÓPEZ et al. 1999; WANG et al. 2005; GALLONI et al. 2007; BORGES et al. 2009; MICHALSKI & DURKA, 2009). No entanto, alguns estudos afirmaram que a relação (P:O) nem sempre é um bom indicador (WANG et al. 2004; CHOUTEAU et al. 2006; BREVIS et al. 2006; HOKCHED & RAMÍREZ, 2008; ETCHEVERRY et al. 2011).

Os resultados de Garcia et al. (2014) concordam parcialmente com a classificação de Cruden (1977). Estes autores estudaram a razão (P:O) em quatro espécies de *Passiflora*, sendo duas autocompatíveis (*P. foetida* e *P. suberosa*) e duas autoincompatíveis (*P. caerulea* e *P. misera*) e observaram que entre as autocompatíveis e as autoincompatíveis a razão P:O diferiu significativamente. Nas autoincompatíveis a relação (P:O) foi maior e, portanto, está de acordo com a teoria de Cruden (1977), pois espécies autoincompatíveis têm o valor da razão (P:O) superior às espécies autocompatíveis. Entretanto, observaram que embora a razão (P:O) tenha sido superior nas autoincompatíveis, esse indicador classificou a *P. caerulea* no intervalo entre autógama facultativa e alógama facultativa e a *P. misera* como alógama facultativa. Tal fato indica que relação (P:O) foi mais baixa do que deveria, já que as espécies são autoincompatíveis e a autofecundação não é viável. Faife-Cabrera et al. (2016) também obtiveram resultados que concordam parcialmente com Cruden (1977).

Os resultados em discordância com a classificação de Cruden (1977) podem ser explicados por fatores que influenciam no resultado da relação (P:O). Entre eles o ambiente, eficiência dos polinizadores, mecanismo de polinização, interação polinizador-flor e morfologia floral (CRUDEN, 2000; JURGENS & GOTTSBERGER, 2002; CHOUTEAU et al. 2006; MICHALSKI & DURKA, 2009). Ademais, Cruden (2000) discute que o estimador (P:O) pode ser confuso, especialmente para espécies alógamas com baixa relação (P:O).

Segundo Cruden (1977), a razão (P:O) é um dos fatores a ser analisado para estimar o sistema reprodutivo das espécies. Portanto, mais estudos devem ser executados para afirmar que a estimativa da relação (P:O) reflete o real modo de reprodução da espécie. Como é o caso da natureza histoquímica dos grãos de pólen, que pode ser uma ferramenta para predizer o modo de reprodução das espécies. De acordo com Dafni (1992), a histoquímica dos grãos de pólen, sejam lipídicos ou amiláceos, e o comportamento do polinizador são fatores que podem estar relacionados ao modo de reprodução.

De acordo com Baker & Baker (1979), duas classes de pólen podem ser observadas nas Angiospermas. Uma classe possui o pólen, no momento da dispersão, chamado de *starchless*, isto é, contendo pouco ou nenhum amido. Enquanto, em alguns grupos, o pólen é disperso com muito amido no citoplasma da célula vegetativa (*starchy*). Segundo os referidos autores, a distribuição dos tipos de reserva possui relação com as estratégias ecológicas das espécies, por exemplo, com os tipos de polinizadores. Quando os grãos de pólen são parte ou toda a recompensa recebida pelas abelhas, a seleção favoreceu grãos de pólen sem amido (rico em lipídio) e, quando a nutrição de insetos não está envolvida, favoreceu o pólen amiláceo (Baker & Baker, 1979).

Baker & Baker (1979) relataram que grãos de pólen amiláceos ocorrem em espécies autógamas e alógamas, cuja polinização pode ser realizada pelo vento, por lepidópteros ou por aves. Ao passo que, grãos de pólen do tipo lipídico é característico de espécies polinizadas por abelhas e moscas.

A emissão e desenvolvimento de tubos polínicos *in vivo* é mais uma metodologia que permite inferir sobre o sistema reprodutivo das espécies. Além disso, possibilita verificar a eficácia de cruzamentos entre genótipos ou se existe autoincompatibilidade, e até mesmo cleistogamia. Dessa maneira, esta técnica permite acompanhar processos relativos à polinização e fertilização das espécies.

Todo o processo de polinização e fertilização consiste em várias etapas sucessivas iniciadas após a chegada do grão de pólen no estigma, sua adesão, hidratação e germinação para desenvolver tubos polínicos (ZHENG et al. 2018). Técnicas de microscopia permitem analisar características associadas ao desenvolvimento dos tubos polínicos e suas taxas de crescimento, servindo também para analisar hibridações efetivas em programas de melhoramento genético e, assim, analisar algumas formas de autoincompatibilidade nas espécies (KEARNS & INOUE, 1993; BANDEIRA et al. 2011; VIEIRA et al. 2015). A técnica de microscopia de

fluorescência, utiliza o fluorocromo azul de anilina e baseia-se na coloração da calose localizada na camada interior do tubo polínico, que emite luz fluorescente quando é iluminada por radiações no espectro da luz azul ou do ultravioleta, permitindo a visualização de tubos polínicos no estigma e ao longo do estilete. Isto resulta em informações relacionadas com a compatibilidade de genótipos e viabilidade do pólen (FANG et al. 2009; KALINGANIRE, 2000).

Muitos autores têm utilizado esta metodologia para acompanhar o desenvolvimento dos tubos polínicos, após polinização, para averiguar o sucesso ou não do cruzamento entre genótipos (GAO et al. 2015; VIEIRA et al. 2015; MARTINS et al. 2015) ou para verificar se existe autoincompatibilidade na espécie de estudo (TANGMITCHAROEN & OWENS, 1997; PRIMO & MACHADO, 2009; MILATOVIĆ et al. 2018; HERRERA et al. 2018). Também é possível observar a ocorrência de cleistogamia por meio do uso da microscopia de fluorescência (PHILBRICK et al. 2006; DAMASCENO JUNIOR et al. 2009).

Além das ferramentas descritas acima, estudos sobre a viabilidade polínica também podem estimar o potencial reprodutivo de uma espécie. Estes estudos podem ser utilizados no monitoramento dos grãos de pólen armazenados, com a finalidade de garantir a fecundação no cruzamento entre genótipos de locais distantes ou com floração em diferentes épocas (DANNER et al. 2011). Portanto, no melhoramento genético são fundamentais, pois permitem direcionamento e confiabilidade nos cruzamentos efetuados e, assim, aumentar a eficiência na obtenção de híbridos, bem como auxiliar na identificação de gametas masculinos com potencial para o uso em programas de hibridação (KRISHNAKUMAR et al. 1992).

A avaliação da viabilidade polínica é o primeiro passo no conhecimento das chances que o grão de pólen tem para se desenvolver no estigma da flor, sendo uma fase essencial para que a fertilização ocorra (DAFNI, 1992). Sendo assim, existe uma gama de metodologias utilizadas para estimar a viabilidade do grão de pólen (OLIVEIRA et al. 2001). De acordo com Galetta (1983), a viabilidade polínica pode ser estimada através de quatro principais métodos: métodos colorimétricos, germinação *in vitro*, germinação *in vivo* e porcentagem de frutificação efetiva.

O uso dos métodos colorimétricos para estimar a viabilidade polínica é o método mais rápido, fácil e, geralmente, o mais utilizado pelos pesquisadores. Estes métodos são bastante usados para uma avaliação rápida, pois os corantes reagem muito facilmente com constituintes celulares presentes nos grãos de pólen (PAGLIARINI & POZZOBON, 2005). Contudo, para alguns autores, esta metodologia não é adequada para estimar a viabilidade polínica (HESLOP-HARRISON & HESLOP-HARRISON, 1970; GALLETTA, 1983; RODRIGUEZ-RIANO & DAFNI, 2000). Diversos corantes como solução de lugol, método de reação fluorocromática (*Fluorochromatic Reaction* - FCR), solução tripla de Alexander e corantes vitais como o sal de tetrazólio podem ser adotados (DAMASCENO JUNIOR et al. 2008).

Corantes como lugol (I₂KI) e Sudan IV podem ser utilizados em estudos de viabilidade polínica (HUANG et al. 2004, MUNHOZ et al. 2008). De acordo com Johansen (1940), grãos de pólen preto ou púrpura são positivos para amido, quando reagem com I₂KI. Ao passo que, grãos de pólen com coloração vermelha indicam a presença de lipídeos, quando reagem positivamente para Sudan IV (VAISSIÈRE, 1991). Todavia, estes testes baseiam-se apenas na detecção de amido e lipídeos, que podem estar presentes tanto em grãos de pólen viáveis como nos inviáveis (RODRIGUEZ-RIANO & DAFNI, 2000).

O método de reação fluorocromática, também conhecido como teste do FCR, por meio da aplicação do corante diacetato de fluoresceína, está intimamente associado a integridade da membrana do grão de pólen, que participará do desenvolvimento do tubo polínico. Os grãos de pólen pouco fluorescentes e sem fluorescência são considerados inviáveis e os grãos de pólen fluorescentes são tidos como viáveis (HESLOP-HARRISON & SHIVANNA, 1984). Segundo Damasceno Junior et al. (2008), o método FCR é o mais indicado para estimar a viabilidade, a

germinação e a capacidade de fertilização, em relação a outros corantes, em virtude da alta correlação com o potencial de germinação de grãos de pólen maduros, refletindo assim uma situação real *in vivo*. Este método tem como desvantagem a utilização de fluorocromos e, dessa maneira, é indispensável microscópios equipados com fluorescência (DAFNI, 1992).

O método de Alexander (1969) é realizado com uma solução tripla, constituída por verde malaquita, fucsina ácida e *orange G*. O primeiro tem afinidade pela celulose presente na parede celular, corando-a de verde, enquanto o protoplasma é corado pela fucsina ácida e o *orange G* é um intensificador. Desta forma, os grãos de pólen inviáveis por não apresentarem protoplasma, coram-se de verde.

O teste colorimétrico com 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) é fundamentado na atividade de enzimas desidrogenases relacionadas com a atividade respiratória de tecidos vivos (COOK & STANLEY, 1960). À medida que o TTC reage com o hidrogênio oriundo da respiração celular os grãos de pólen são corados de vermelho (HOEKSTRA & BRUINSMA, 1975). A coloração vermelha é resultado da redução da solução salina de 2,3,5- cloreto de trifeniltetrazólio, por meio das enzimas ativas nos tecidos vivos. Dessa maneira, a cor vermelha sugere grãos de pólen viáveis, enquanto tecidos mortos apresentam-se sem cor.

Embora os testes colorimétricos sejam métodos simples e rápidos, não proporcionam informações acerca da capacidade germinativa dos grãos de pólen. Tal fato, pode ser alcançado através de testes de germinação *in vitro*. Este método utiliza meios de cultura que possibilitam as condições necessárias para que os grãos de pólen desenvolvam seus tubos polínicos. Tais condições variam entre as espécies e são influenciadas por fatores como os componentes do meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação (STANLEY & LINSKENS, 1974; TAYLOR & HEPLER, 1997).

Os grãos de pólen das angiospermas necessitam de alguma fonte de carbono, de boro e de outros nutrientes para o seu desenvolvimento (MIRANDA & CLEMENT, 1990; FRANZON et al. 2005). A sacarose, fonte de carbono, promove o equilíbrio osmótico entre os grãos de pólen e o meio de germinação, assim como viabiliza o desenvolvimento dos tubos polínicos (STANLEY & LINSKENS, 1974; NUNES et al. 2001). Por sua vez, o boro aumenta a eficiência da sacarose no desenvolvimento dos grãos de pólen e dos tubos polínicos (ALMEIDA et al. 1987). Além disso, forma um complexo ionizável com o açúcar denominado açúcar-borato, que reage mais rapidamente com as membranas celulares (ASKIN et al. 1990; FRANZON et al. 2005).

Pelo fato de simular as condições do estigma e estilo, a germinação *in vitro* é a técnica mais utilizada para estimar a viabilidade polínica (KEARNS & INOUE, 1993; MARCELLÁN & CAMADRO, 1996). Ademais, a sua rapidez, eficiência, e a possibilidade de apresentar alta correlação com a pegamento de frutos e sementes também contribuem para ser um dos métodos mais utilizados (DAFNI & FIRMAGE, 2000). Enquanto, os métodos *in vivo* e a porcentagem de frutificação efetiva são procedimentos demorados e trabalhosos, dessa maneira outros métodos são comumente empregados (KARAKAYA, 2011).

Além de estimar a viabilidade dos grãos de pólen, avaliar a receptividade do estigma é essencial para auxiliar o melhoramento genético e o desenvolvimento de hibridações controladas. De acordo com Dafni (1992), a receptividade do estigma pode ser investigada para identificar a melhor idade da flor para realizar polinização artificial e aumentar a eficiência da polinização. Para isso, é necessário que os grãos de pólen sejam transferidos para o estigma receptivo, isto é, que o estigma permita o desenvolvimento dos grãos de pólen viáveis e compatíveis (DAFNI & FIRMAGE, 2000; YI et al. 2006).

A superfície estigmática e seus componentes têm um papel importante nos processos de adesão do pólen, hidratação, germinação e desenvolvimento do tubo polínico no estigma (CRISPIM et al. 2017). Os estigmas geralmente são classificados em dois grupos: estigmas úmidos, que são cobertos com células superficiais, que muitas vezes se lisam para liberar uma

secreção superficial viscosa contendo proteínas, lipídios, polissacarídeos e pigmentos. Os estigmas secos são aqueles em que as células superficiais são intactas e são cobertas por uma parede celular primária, uma cutícula cerosa e uma película proteica (EDLUND et al. 2004).

A receptividade do estigma está relacionada à atividade de enzimas como peroxidase, esterase e desidrogenase (HESLOP-HESLOP-HARRISON & SHIVANNA, 1977; DAFNI & MAUÉS, 1998). A observação da atividade dessas enzimas pode ser usada para caracterizar a receptividade do estigma (DAFNI, 1992; KEARNS & INOUE, 1993). No entanto, o método usado para avaliar a receptividade estigmática pode variar de acordo com a espécie e deve considerar o desenvolvimento do grão de pólen no estigma (STONE et al. 1995). O tempo de receptividade pode variar de minutos a alguns dias (DAFNI, 1992; HESLOP-HARRISON, 1992; SHIVANNA, 2003). Segundo Shivanna (2003), detalhes da receptividade do estigma foram estudados em apenas um número limitado de espécies.

Grande parte das metodologias mencionadas acima foram utilizadas por Damasceno Junior et al. (2009). Estes autores, com base na natureza histoquímica dos grãos de pólen, receptividade do estigma, teste de germinação *in vivo* dos grãos de pólen e na razão pólen:óvulo, concluíram que os genótipos hermafroditas de mamão analisados foram cleistógamos e o modo preferencial de reprodução foi classificado como autógamo facultativo. Concluiu-se também que os grãos de pólen do mamão foram de natureza lipídica. Os resultados obtidos são fundamentais para os programas de melhoramento genético do mamão.

Dessa maneira, fica evidenciado que o conhecimento dos mecanismos reprodutivos das espécies é primordial. Visto que, a aplicação correta dos métodos de melhoramento depende do estudo do modo de reprodução preferencial.

6.3.1. Modo de reprodução em *Catharanthus roseus* [L.] G. Don

O conhecimento dos mecanismos de polinização, modo de reprodução, presença ou ausência de autoincompatibilidade são pré-requisitos essenciais para a compreensão do comportamento reprodutivo de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don. A informação sobre esses aspectos é necessária para o desenvolvimento de técnicas de hibridação e para a escolha e execução dos métodos de melhoramento da cultura.

O modo de reprodução da espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don é marcado por algumas divergências, dessa forma podem ocorrer diferentes afirmações quanto ao seu sistema reprodutivo. Alguns autores, como Knuth (1909) e Boke (1949) afirmaram que a vinca realiza autofecundação. Mais à frente, tal fato também foi corroborado por Levy et al. (1983) e Milo et al. (1985). No entanto, Nejat et al. (2015) declararam que se trata de uma espécie alógama e que a polinização ocorre a partir de insetos, especialmente, borboletas e mariposas, adaptadas a estrutura floral da vinca. Além disso, alguns trabalhos mencionam a existência de separação física entre o estigma e as anteras, fenômeno conhecido como hercogamia (KULKARNI et al. 2001; SREEVALLI, et al. 2000). Uma outra justificativa encontrada na literatura diz respeito a uma mucilagem presente na porção superior do estigma da vinca e, portanto, essa região absorve os grãos de pólen. Sendo assim, esse processo evita a autopolinização, uma vez que a porção receptiva se localiza apenas na base do estigma (KULKARNI et al. 2004).

Kulkarni et al. (2005) observaram que o estigma em três variedades de vinca estava receptivo antes e depois da abertura da floral. Nestes genótipos, o estigma foi receptivo 1 dia antes da antese e até 2 dias após a antese. Contudo, Bhattacharya & Mandal (2003) relataram que o período de receptividade máximo ocorre no segundo dia após a antese. Sreevalli (2002) observou que a maior receptividade ocorreu entre 06:00 e 10:00 horas e entre 15:00 e 17:00 horas.

Alguns genótipos que realizam autofecundação já foram observados na vinca. Nestes casos, a autopolinização ocorreu após a antese devido ao alongamento contínuo do ovário ou

do estilete, superando a separação espacial do estigma e das anteras (KULKARNI et al. 2004). Miyajima et al. (2004) investigaram a polinização em duas cultivares de vinca, *Parasol* e *Cooler Peppermint*, com o objetivo de melhorar a produção comercial de sementes. Os autores citados anteriormente concluíram que as flores dessas cultivares foram cleistógamas.

Nejat et al. (2015) afirmaram que a vinca é uma espécie única por causa de sua autocompatibilidade, ao contrário da maioria das outras espécies da família. No entanto, existe autoincompatibilidade envolvendo a hibridação interespecífica natural, sendo muito comum em Madagascar (CHAUDHARY, 2011; PROTA, 2015).

Em vista disso, revela-se que a vinca exibe uma grande diversidade de mecanismos reprodutivos, sendo necessário uma investigação criteriosa e minuciosa dos diferentes aspectos relacionados ao sistema reprodutivo da espécie. Ainda não se sabe de maneira conclusiva se a espécie é alógama ou autógama. Assim sendo, tal fato precisa ser estudado.

6.4. Aspectos gerais do melhoramento genético de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don)

Apesar da expressiva importância medicinal da espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don como fonte de alcaloides antineoplásicos, estudos sobre melhoramento e aspectos genéticos dessa espécie eram poucos e esporádicos até o final da década de 1990 (KULKARNI et al. 2016).

No primeiro estudo de melhoramento genético em *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, Levy et al. (1983) avaliaram os componentes de rendimento da parte aérea e o conteúdo de ajmalicina das raízes em três linhagens endogâmicas, com diferentes cores de flores, e nos seus híbridos. Nesta pesquisa, observaram 29 e 24% de heterose significativa e positiva para peso seco de folhas e raízes por planta, respectivamente, no híbrido F₁ envolvendo as linhagens parentais (corola rosa x corola branca com halo vermelho). Porém, nenhuma heterose foi obtida para o conteúdo de ajmalicina nas raízes. Diante destes resultados, concluíram que a ausência de heterose para o teor de ajmalicina nas raízes não favoreceu o desenvolvimento de cultivares híbridas de vinca.

A estimativa do teor de alcaloides, em vinca, pode ser demorada e, assim, limita o número de plantas que podem ser avaliadas no programa de melhoramento. Sendo assim, qualquer característica com alta herdabilidade e com alta correlação com o conteúdo de alcaloides é útil para a triagem preliminar dos princípios ativos de interesse, tal como para a seleção indireta dessa importante característica (KULKARNI et al. 2016).

Sharma et al. (2012) avaliaram 197 linhagens endogâmicas ao longo de dois anos com o objetivo de caracterizar a variabilidade de sete características de biomassa e vinte e três características do conteúdo de alcaloides e de rendimento. No que se refere ao conteúdo total de alcaloides nas folhas e raízes foram encontradas baixas herdabilidades (5 e 13%, respectivamente). No entanto, Dwivedi et al. (1999) já encontraram altas herdabilidades no sentido amplo para o rendimento foliar e para os conteúdos totais de alcaloides, vindolina, catarantina, vincristina e vimblastina, indicando que as diferenças entre os genótipos analisados são especialmente devidas a causas genéticas. Chaudhary et al. (2013) observaram altas herdabilidades para o teor de vindolina, catarantina, vimblastina, vincristina, ajmalicina e serpentina nas folhas. O mesmo se repetiu para o conteúdo dos referidos alcaloides nas raízes, exceto para ajmalicina. Altas herdabilidades também foram relatadas para o conteúdo de vindolina, catarantina, vincristina mais vimblastina nas folhas e catarantina e serpentina nas raízes (BARIK & SAO, 2015).

Levy et al. (1983) constataram que os pesos das raízes, brotos e folhas foram positivamente e significativamente correlacionados, mas nenhuma correlação significativa foi encontrada entre o conteúdo de ajmalicina e o peso das partes vegetativas. Chaudhary et al. (2013) relataram através da análise de correlação que o acúmulo dos alcaloides (vindolina,

catarantina, vimblastina, vincristina, ajmalicina e serpentina) nas folhas foi independente do das raízes e vice-versa. No entanto, Sharma et al. (2012) observaram que a produção de folhas e raízes, produção foliar e produção de alcaloides nas folhas, produção de raízes e produção de alcaloides radiculares correlacionaram-se de maneira positiva. Isso indica que a melhora concomitante desses pares de caracteres pode ser possível através da seleção. Os referidos autores também verificaram que o teor de alcaloides foliares totais correlacionou-se positivamente com os conteúdos de catarantina, vindolina e percentual de vimblastina mais vincristina nas folhas sugerindo que a seleção de alcaloides totais nas folhas deve ser efetiva na melhora dos teores de catarantina, vindolina e percentual de vimblastina mais vincristina nas folhas.

Mishra et al. (2001) encontraram altas correlações para área foliar e produção de folhas com a produção de alcaloides foliares e entre a produção de raízes e o rendimento de alcaloides radiculares. Neste estudo, outras correlações também foram observadas como aquelas entre o número de folhas e o rendimento de vimblastina foliar, concentração de alcaloides nas raízes e concentração de vimblastina foliar e rendimento de vincristina e vimblastina. Estas correlações parecem favoráveis para a melhoria da produção de alcaloides em *Catharanthus roseus* [L.] G. Don.

Saadedin et al. (2018) avaliaram a produção de alcaloides e seus precursores nas folhas de doze cultivares de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don. A produção de vincristina, vimblastina e seus precursores, vindolina e catarantina, não se relacionaram com a cor das flores das cultivares. Este resultado concorda com Magnotta et al. (2006), onde nenhuma relação foi obtida entre a cor das flores e os teores de vindolina e catarantina em 50 cultivares de vinca. Sevestre-Rigouzzo et al. (1993) encontraram altos teores de vindolina nas folhas e serpentina nas raízes, independentemente da cor da flor. Entretanto, Idrees et al. (2010) e Bhutkar & Bhise, (2011) afirmaram que as folhas de plantas com flor rosa apresentaram maior conteúdo de alcaloides em relação as flores brancas.

Em importante estudo no início dos anos 2000, Mishra et al. (2001) avaliaram 53 caracteres de crescimento, desenvolvimento, morfológicos e rendimento de alcaloides em duas estações em 32 genótipos, oriundos de diferentes regiões da Índia e de mais outros três países próximos. Foram observadas grandes diferenças entre os genótipos para 6 características morfológicas e 14 agrônômicas, as quais mostraram-se altamente significativas. Estas variações foram de 3, 80 e 15 vezes entre os valores mais baixos e mais altos para o rendimento de matéria seca de foliar, conteúdo de vimblastina e vincristina nas folhas, respectivamente. O genótipo Crc-31 apresentou teor de vincristina 74 vezes maior e vimblastina 12 vezes maior do que os respectivos valores mais baixos entre todos os acessos. Além do referido acesso, os autores recomendaram os genótipos Crc-1, Crc-10 e Crc-21 para a obtenção de altos rendimentos de vincristina e vimblastina.

O gênero *Catharanthus* apresenta oito espécies, entre elas *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, dessa maneira a exploração de híbridos interespecíficos pode ser uma forma de melhoramento genético da cultura para produção de alcaloides. A hibridação natural entre as espécies *Catharanthus longifolius* (Pichon) Pichon e *Catharanthus roseus* [L.] G. Don já foi observada em Madagascar. No entanto, *Catharanthus roseus* [L.] G. Don como genitor feminino não conseguiu produzir frutos, sendo assim não foram observadas introgressões de *Catharanthus longifolius* (Pichon) Pichon para *Catharanthus roseus* [L.] G. Don. Já na utilização de *Catharanthus longifolius* (Pichon) Pichon como genitor feminino, os cruzamentos foram bem-sucedidos com alta produção de sementes e boa capacidade germinativa no F₁ (SEVESTRE-RIGOUZZO et al. 1993). A avaliação dos híbridos interespecíficos verificou heterose significativa para os teores de ajmalicina, catarantina e serpentina nas folhas e nas raízes e para o conteúdo de vindolina nas folhas. Além disso, os híbridos também apresentaram maiores rendimentos de raízes e folhas com relação aos parentais.

Ao longo dos anos, estudos genômicos estruturais, especialmente mapas de ligação, sustentaram os programas de melhoramento de plantas em várias culturas, pois fornecem uma base para a clonagem baseada em mapas e a seleção assistida por marcadores (TANKSLEY et al. 1989). O primeiro mapa genético de ligação de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don foi construído por Gupta et al. (2007). Neste estudo, o mapa de ligação foi construído a partir de uma população F₂ de 144 plantas obtida do cruzamento entre *Pink Delhi* x *gsr8*. O mapa foi composto de 125 marcadores moleculares (79 RAPD, 7 ISSR, 2 EST-SSR e 37 outros marcadores de DNA baseados em PCR) e seis morfológicos (pigmentação do caule, pigmentação e forma da lâmina foliar, tamanho do pecíolo das folhas e da vagem e cor da pétala) e abrangeu 1132 cM do genoma em dois grandes (GL1 e GL2) e 12 pequenos grupos de ligação (GL3 a GL14), totalizando 14 grupos de ligação. Observou-se ligação entre os marcadores morfológicos relacionados com o tamanho do pecíolo das folhas e a forma da lâmina foliar no GL1 e a pigmentação do caule, pecíolo e das folhas e o tamanho da vagem no GL8.

O segundo mapa de ligação genético foi desenvolvido por meio de 423 marcadores moleculares codominantes (314 STMS, 64 GTMs e 45 STMS) em uma população F₂ composta por 111 indivíduos através do cruzamento entre dois genótipos contrastantes (CrN1 x CrN82) (SHOKEEN et al. 2011). Um total de 114 marcadores foram mapeados em oito grupos de ligação que abrangeram uma região de 632,7 cM do genoma com uma distância média entre marcadores de 5,55 cM. Este foi o primeiro relato do desenvolvimento em larga escala de marcadores STMS e GTMs em *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Ademais, é a primeira vez que um mapa de ligação foi baseado apenas em marcadores codominantes.

Outro mapa de ligação foi construído para a vinca por Chaudhary et al. (2011), onde a população de mapeamento consistiu em 191 linhagens endogâmicas recombinantes na geração F_{2:7}, desenvolvida a partir do cruzamento entre a linhagem mutante (*gsr-8*) e a cultivar *Delhi Pink*. O mutante *gsr-8* foi redesignado como *lli* para a característica morfológica de inflorescência sem folhas. Nesta pesquisa, objetivou-se o mapeamento do loco inflorescência sem folhas (*lli*). O loco *lli* foi localizado em um intervalo de 3,9 cM no meio do grupo de ligação 4 (GL4). Verificou-se também que os genótipos *lli* são agronomicamente superiores, uma vez que a inflorescência é densamente povoada com flores abertas a cada dia em relação a inflorescência das plantas *LLI*. Além disso, o mapa de ligação abrangeu 1790,4 cM do genoma com 8 GLs e a distância entre os marcadores foi de 10,3 cM.

A identificação e mapeamento de QTLs é uma poderosa abordagem genética para identificar genes e/ou alelos favoráveis de características de interesse com marcadores de DNA e, assim, é possível introgridir os alelos desejáveis associados aos QTLs ao germoplasma medicinal por meio da seleção assistida por marcadores (MAS) (LORZ & WENZEL, 2005). O primeiro estudo de QTL em *Catharanthus roseus* (L.) G. Don foi desenvolvido por Sharma et al. (2012). Estes autores utilizaram uma população de 197 linhagens endogâmicas recombinantes as quais foram avaliadas quanto a sete características de biomassa e 23 características de conteúdo de alcaloides e de rendimento. As referidas linhagens foram genotipadas por meio de 178 marcadores de DNA que formaram um mapa genético com oito grupos de ligação (GL), medindo 1786,5 cM, com uma distância média de 10,0 cM entre os marcadores. A aplicação da análise de marcador único, mapeamento de intervalo simples e mapeamento de intervalo composto identificou um total de 20 QTLs, 11 em relação aos teores de alcaloides nos seguintes órgãos da planta: folhas (*qTAL*), caules (*qTAS*) e raízes (*qTAR*), sete para índices de colheita (*qHIL*, *qHIS* e *qHIR*) e dois para toda a característica de biomassa vegetal (*qTDW*). Os QTLs identificados foram associados a cinco dos oito GLs.

Chaudhary et al. (2013) também identificaram 20 QTLs, sendo cinco para concentração de catarantina nas folhas, quatro para as concentrações de vindolina nas folhas, quatro para as concentrações de catarantina e serpentina nas raízes, dois para ajmalicina nas raízes e 1 para

vimblastina mais vincristina nas folhas, situadas em quatro grupos de ligação (GL1, GL3, GL4 e GL6). O genótipo D54, neste estudo, apresentou altas concentrações de vindolina (VL), vimblastina (VBL) e catarantina (CL) nas folhas e de catarantina nas raízes (CR). Além disso, a genotipagem mostrou que o genótipo D54 foi positivo para 13 dos 14 alelos de QTLs detectados como favoráveis para as características CL, VL, VBL e CR. O acesso D54 possuía 9 dos 14 marcadores de DNA identificados mais próximos a *qCL2-qCL4*, *qVL2-qVL4*, *qVBL1*, *qCR2*, *qCR4*, 4 identificados próximos a *qVL1*, *qCR1* e *qCR3* e não possuía os marcadores identificados próximos a *qCLI*. O genótipo citado anteriormente exemplificou as possibilidades de executar seleção assistida por marcadores (MAS) para genótipos com características melhoradas de VL, CL e CR. Portanto, os referidos autores demonstraram a viabilidade da seleção assistida por marcadores para características associadas ao rendimento de alcaloides pela primeira vez na vinca.

Provavelmente o estudo mais recente de QTLs em *Catharanthus roseus* (L.) G. Don foi executado por Barik & Sao (2015). Estes autores observaram no mapa genético a identificação de 20 QTLs, isto é, cinco para o teor de catarantina nas folhas, quatro para o teor de vindolina nas folhas, um para o teor de vimblastina mais vincristina nas folhas. Já nas raízes, quatro para o teor de catarantina e serpentina e dois para o teor de ajmalicina. Os QTLs foram detectados apenas em 4 dos 8 GLs. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Chaudhary et al. (2013).

Diante do exposto, nota-se que existem poderosas abordagens no melhoramento genético de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Dentre elas, a localização de genes e/ou alelos promissores com marcadores de DNA por meio da identificação e mapeamento de QTLs.

7. MATERIAL E MÉTODOS

7.1. Localização da pesquisa e condições edafoclimáticas

O presente trabalho foi conduzido em casa de vegetação no campo experimental do Departamento de Solos (DSOLOS), do Instituto de Agronomia (IA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no município de Seropédica – RJ (22°45' S; 43° 41' W) (RAMOS et al. 1973), região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. Os dados climáticos do Município de Seropédica – RJ no período de realização desta pesquisa são apresentados na Figura 1 (INMET, 2019).

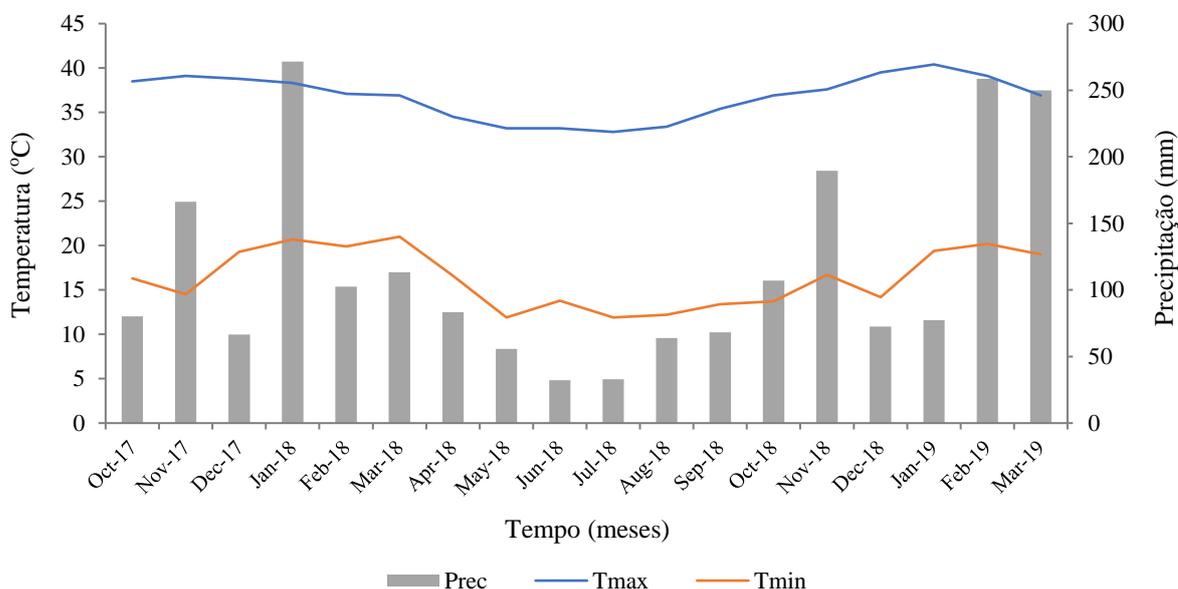


Figura 1. Dados climáticos do Município de Seropédica – RJ entre outubro de 2017 a março de 2019. Fonte: INMET/SIPA/UFRRJ.

7.2. Coleção de germoplasma e condições experimentais

O estudo do modo de reprodução preferencial e a análise da diversidade genética foram realizados a partir de genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don pertencentes à coleção de germoplasma de vinca do Departamento de Fitotecnia (DFITO), do Instituto de Agronomia (IA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Atualmente, esta coleção conta com 55 genótipos (Anexo B). Tais genótipos foram adquiridos e coletados em 6 diferentes procedências (Petrópolis - RJ, Cabo Frio - RJ, Seropédica - RJ, Valença - RJ, Volta Redonda - RJ e Holambra - SP), no estado biológico de mudas (Figura 2).

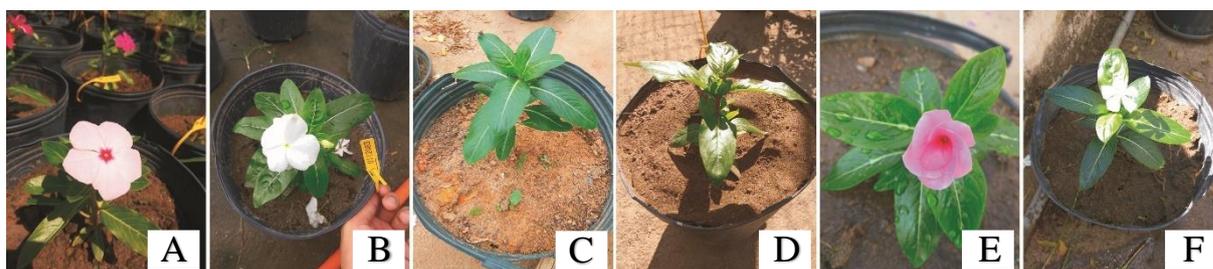


Figura 2. Mudas de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) pertencentes à coleção de germoplasma do Departamento de Fitotecnia (DFITO), do Instituto de Agronomia (IA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). A) Genótipo UFRRJ VIN005, adquirido em Petrópolis – RJ. B) Genótipo UFRRJ VIN048, adquirido em Holambra – SP. C) Genótipo UFRRJ VIN002, coletado em Volta Redonda – RJ. D) Genótipo UFRRJ VIN006, coletado em Cabo Frio – RJ. E) Genótipo UFRRJ VIN019, coletado em Valença – RJ. F) Genótipo UFRRJ VIN003, coletado em Seropédica – RJ.

As mudas foram transferidas para o campo experimental em outubro de 2017, onde foram plantadas em vasos de 8 litros, de acordo com a procedência, contendo substrato na proporção de 1:1:1 (areia, terra e esterco bovino curtido). Cada procedência possui um número distinto de genótipos (Tabela 1). Sendo, cada planta tratada como um acesso.

Tabela 1. Coleção de germoplasma de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ e respectiva diagramação dos acessos, identificados com o número de entrada ou incorporação na coleção.

035	040	010	013	016	X	X	X	X	X
045	046	047	048	049	051	006	011	021	033
050	019	002	022	027	038	041	042	043	044
018	020	023	026	030	031	032	036	037	039
052	053	054	055	001	028	034	003	012	015
004	005	007	008	009	014	017	024	025	029

Casa de Vegetação

Legenda: Petrópolis – RJ, Cabo Frio – RJ, Seropédica – RJ, Valença – RJ, Volta Redonda – RJ, Holambra – SP.

Após a implementação da coleção de germoplasma, analisou-se os genótipos quanto ao vigor, sanidade e produção expressiva de flores. Dessa maneira, foram selecionados os seguintes genótipos: UFRRJ VIN004, UFRRJ VIN005, UFRRJ VIN007, UFRRJ VIN008, UFRRJ VIN009, UFRRJ VIN014, UFRRJ VIN029, UFRRJ VIN037, UFRRJ VIN050 e UFRRJ VIN055, totalizando 10 acessos (Figura 3).



Figura 3. Dez genótipos pertencentes à coleção de germoplasma de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ. A) UFRRJ VIN004. B) UFRRJ VIN005. C) UFRRJ VIN007. D) UFRRJ VIN008. E) UFRRJ VIN009. F) UFRRJ VIN014. G) UFRRJ VIN029. H) UFRRJ VIN037. I) UFRRJ VIN050. J) UFRRJ VIN055.

Os dez genótipos tiveram seus dados de passaporte preenchidos, conforme recomendação do Bioversity International (2007). Os genótipos foram devidamente identificados com um número de acesso, por meio de placas fixadas nos vasos. Cada número de acesso representou um nome de acesso, caracterizado por “UFRRJ VIN” seguido do número de entrada ou incorporação dele nas dependências da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ (Tabela 2). Esse processo também foi executado nos demais genótipos que compõem a coleção de germoplasma (Anexo A).

Além dos dados de passaporte preenchidos, os genótipos UFRRJ VIN004, UFRRJ VIN005, UFRRJ VIN007, UFRRJ VIN008, UFRRJ VIN009, UFRRJ VIN014, UFRRJ VIN029, UFRRJ VIN037, UFRRJ VIN050 e UFRRJ VIN055 também foram registrados no Herbário do Instituto de Botânica (UFRRJ, Brasil) com os respectivos códigos: RBR 46264, RBR 46263, RBR 46262, RBR 46261, RBR 46260, RBR 46259, RBR 46258, RBR 46257, RBR 46256 e RBR 46255. Estes podem ser acessados eletronicamente (<http://rbr.jbrj.gov.br/v2/consulta.php>).

Os dados aqui apresentados foram coletados entre outubro de 2017 e março de 2019. Neste período, as análises relativas ao modo de reprodução preferencial e da diversidade genotípica foram executadas no Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP) do DFITO/IA/UFRRJ (Figura 4).



Figura 4. Laboratório de Citogenética e Biologia Molecular de Plantas (LCBMP) do Departamento de Fitotecnia (DFITO), do Instituto de Agronomia (IA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Tabela 2. Dados de passaporte dos genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) utilizados no estudo do modo de reprodução preferencial e na análise da diversidade genotípica.

Número de acesso	Gênero	Espécie	Nome de acesso	Data de coleta	Latitude do local de coleta	Longitude do local de coleta	Altitude do local de coleta	Estado biológico	Armazenamento de germoplasma
112005	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	UFRRJ VIN004	30/09/2017	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34m	Muda	A campo
112006	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	UFRRJ VIN005	30/09/2017	22°23'34.1"S	43°07'51.9"W	683,21m	Muda	A campo
112008	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	UFRRJ VIN007	30/09/2017	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34m	Muda	A campo
112009	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	UFRRJ VIN008	30/09/2017	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34m	Muda	A campo
112010	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	UFRRJ VIN009	30/09/2017	22°23'34.1"S	43°07'51.9"W	683,21m	Muda	A campo
112015	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	UFRRJ VIN014	30/09/2017	22°23'44.7"S	43°08'10.7"W	679,39m	Muda	A campo
112030	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	UFRRJ VIN029	30/09/2017	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34m	Muda	A campo
112049	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	UFRRJ VIN037	19/09/2017	22°46'09"S	43°41'38"W	22,00m	Muda	A campo
112086	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	UFRRJ VIN050	09/11/2017	22°45'35"S	43°41'48"W	38,81m	Muda	A campo
111794	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	UFRRJ VIN055	30/09/2017	22°22'04.1"S	43°07'29.7"W	639,97m	Muda	A campo

7.3. Relação pólen:óvulo (P:O)

Com base na relação (P:O) os genótipos foram classificados, conforme Cruden (1977). Esta metodologia classifica a espécie em cleistogâmica (P:O = 2,7 - 5,4), autógama obrigatória (P:O = 18,1 - 39,0), autógama facultativa (P:O = 31,9 - 396,0), alógama facultativa (P:O = 244,7 - 2.588,0), alógama obrigatória (P:O = 2.108,0 - 195.525,0) (Tabela 3).

Tabela 3. Razão entre o número de grãos de pólen e o número de óvulos (relação P:O), como um indicativo do modo de reprodução preferencial (Cruden, 1977).

Modo de Reprodução	Relação P:O
Cleistogamia	2,7 - 5,4
Autógama obrigatória	18,1 - 39,0
Autógama facultativa	31,9 - 396,0
Alógama facultativa	244,7 - 2.588,0
Alógama obrigatória	2.108,0 - 195.525,0

Para tal, botões florais foram colhidos (Figura 5A), fixados em etanol 70% e armazenados em geladeira a temperatura de 4°C até o momento de uso. A estimativa do número de grãos de pólen foi realizada, conforme Dafni (1992). Para isso, em estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália) (Figura 5B), todas as anteras (cinco) foram excisadas (Figura 5C) e transferidas para um tubo Eppendorf contendo 0,5 mL de uma solução composta de 0,36 mL de solução de etanol 70%; 0,06 mL de solução de 0,5% de azul de metileno e 0,08 mL de detergente Tween 80 P.S. (Figura 5D). O tubo Eppendorf foi agitado em vórtex (Vixar VM3000, Brasil), durante 60 segundos à 2000 rpm (Figura 5E). Em seguida, 1 microlitro (1 mL) da solução contendo grãos de pólen foi depositada em uma lâmina (Figura 5F), e montado o conjunto lâmina/lamínula para observação em microscópio ótico (Olympus BX43, USA) (Figura 5G).

Foram utilizados 5 botões florais (repetições) por genótipo. Para cada botão floral preparou-se 10 lâminas. Nestas lâminas foram contados os grãos de pólen (Figura 5H), que foram multiplicados por 500 (fator de diluição), conforme Damasceno Junior et al. (2009). Dessa maneira, estimou-se a média do número de grãos de pólen por botão floral (NGPB) e por antera (NGPA) de cada genótipo.

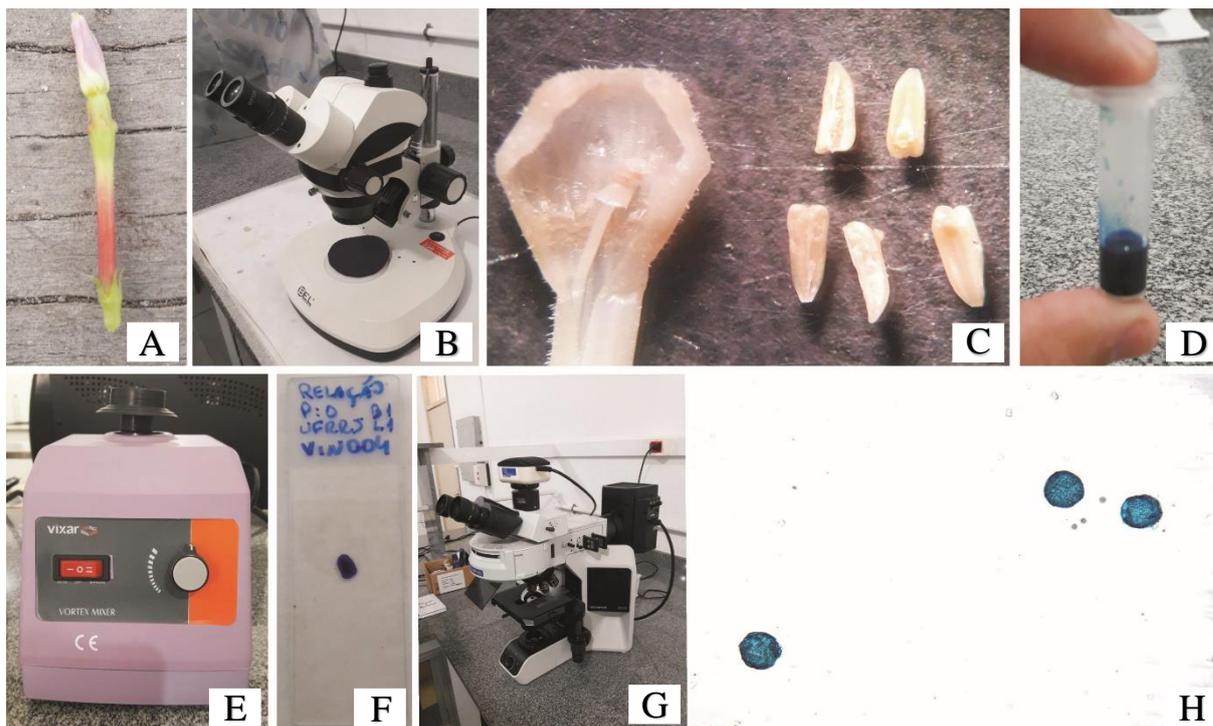


Figura 5. Relação pólen:óvulo (P:O). A) Botão floral (flor fechada) coletado. B) Estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). C) Cinco anteras excisadas. D) Tubo Eppendorf contendo 0,5 mL de uma solução composta de 0,36 mL de solução de etanol 70%; 0,06 mL de solução de 0,5% de azul de metileno e 0,08 mL de detergente Tween 80 P.S. E) Vórtex (Vixar VM3000, Brasil). F) 1 microlitro (1 mL) da solução contendo grãos de pólen depositada em uma lâmina. G) Microscópio ótico (Olympus BX43, USA). H) Grãos de pólen em uma lâmina para a contagem.

O número de óvulos foi obtido a partir do ovário dissecado dos mesmos botões florais de onde as anteras foram excisadas (Figura 6A). Para tanto, em estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália) (Figura 6B), os ovários foram excisados longitudinalmente em uma gota de solução de 0,5% de azul de metileno (um corante básico, que se liga a moléculas carregadas negativamente) para facilitar a observação durante a contagem dos óvulos (Figura 6C e 6D). Após isso, os óvulos foram retirados e distribuídos em uma lâmina (Figura 6E). Cada lâmina correspondeu a um botão floral, sendo assim a média do número de óvulos por botão floral (NOB) por genótipo foi estimada.

Em seguida, a relação (P:O) foi obtida a partir da média de todos os botões do NGPB dividido pela média de todos os botões do NOB, por genótipo. A determinação do modo de reprodução foi baseada na divisão do número de grãos de pólen pelo número de óvulos, conforme Cruden (1977).

As análises estatísticas foram realizadas no Programa R (R Development Core Team, 2011), onde as médias do número de grãos de pólen por botão floral (NGPB), do número de grãos de pólen por antera (NGPA) e do número de óvulos por botão floral (NOB) foram comparadas por meio do teste t-Student.

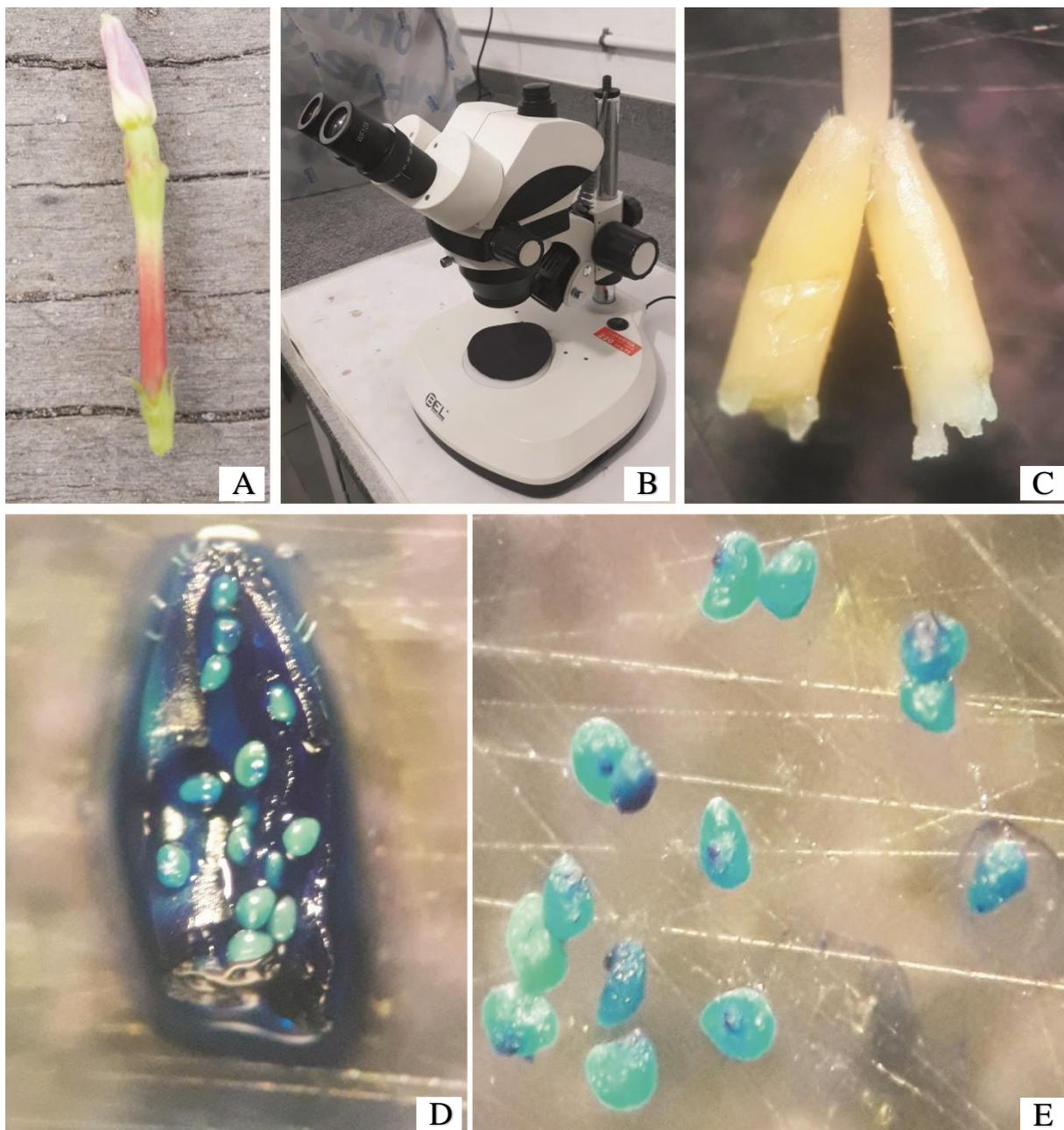


Figura 6. Relação pólen:óvulo (P:O). A) Mesmo botão floral (flor fechada) de onde as anteras foram excisadas. B) Estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). C) Ovários. D) Ovário excisado longitudinalmente em uma gota de solução de 0,5% de azul de metileno. E) Óvulos distribuídos em uma lâmina para a contagem.

7.4. Histoquímica de grãos de pólen

Dez botões florais, próximos a antese, por genótipo, foram colhidos (Figura 7A), fixados em solução de etanol 70% e conservados no refrigerador a 4°C até o momento de uso. Os botões florais (repetições) foram dissecados sob estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália) (Figura 7B). Em seguida, duas anteras por botão floral por genótipo foram excisadas em uma lâmina (Figura 7C) e, assim, obteve-se os grãos de pólen (Figura 7D). Após isso, adicionou-se aos grãos de pólen uma gota de solução de iodeto de potássio (I₂KI) (Figura 7E) (JOHANSEN, 1940). Grãos de pólen preto ou púrpura são positivos para amido, quando reagem com I₂KI. Outras duas anteras do mesmo botão floral foram excisadas e adicionou-se aos grãos de pólen

uma gota de solução de Sudan IV (Figura 7F) (VAISSIÈRE, 1991). Grãos de pólen com coloração vermelha indica a presença de lipídeo, quando reagem positivamente para Sudan IV.

Foram preparadas dez lâminas por genótipo, as quais foram observadas em microscópio ótico (Olympus BX43, USA) (Figura 7G). Em cada lâmina foram analisados 250 grãos de pólen, totalizando 2500 grãos de pólen por genótipo por metodologia de coloração. A partir da coloração obtida, computou-se a porcentagem média de grãos de pólen amiláceos e lipídicos por genótipo.

No Programa R (R Development Core Team, 2011) executou-se o teste t-Student para comparação das porcentagens médias entre os genótipos analisados.

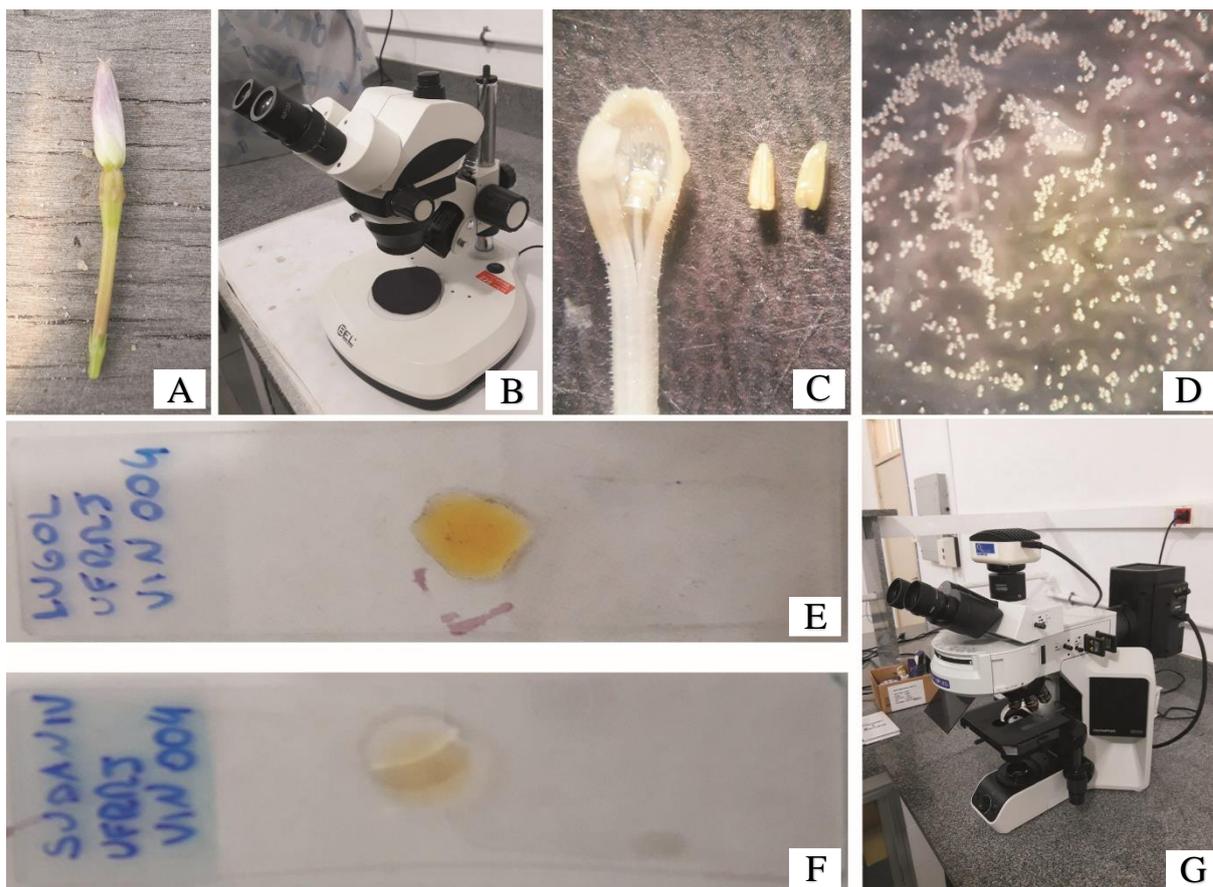


Figura 7. Histoquímica de grãos de pólen. A) Botão floral, próximo a antese, coletado. B) estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). C) Duas anteras excisadas em uma lâmina. D) Grãos de pólen. E) Grãos de pólen em uma gota de solução de iodeto de potássio (I_2KI). F) Grãos de pólen em uma gota de solução de Sudan IV. G) Microscópio ótico (Olympus BX43, USA).

7.5. Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos *in vivo*

Nesta análise realizou-se a coleta de botões florais e flores na antese. Em cada genótipo, 10 botões florais (flores fechadas) e 10 flores na antese (protegidas por sacolas de papel) foram analisados quanto a ocorrência de cleistogamia e autopolinização natural, respectivamente. No que se refere a autopolinização artificial também foram analisados outros 10 botões florais, por genótipo. As autofecundações artificiais foram efetuadas, conforme a Figura 8.

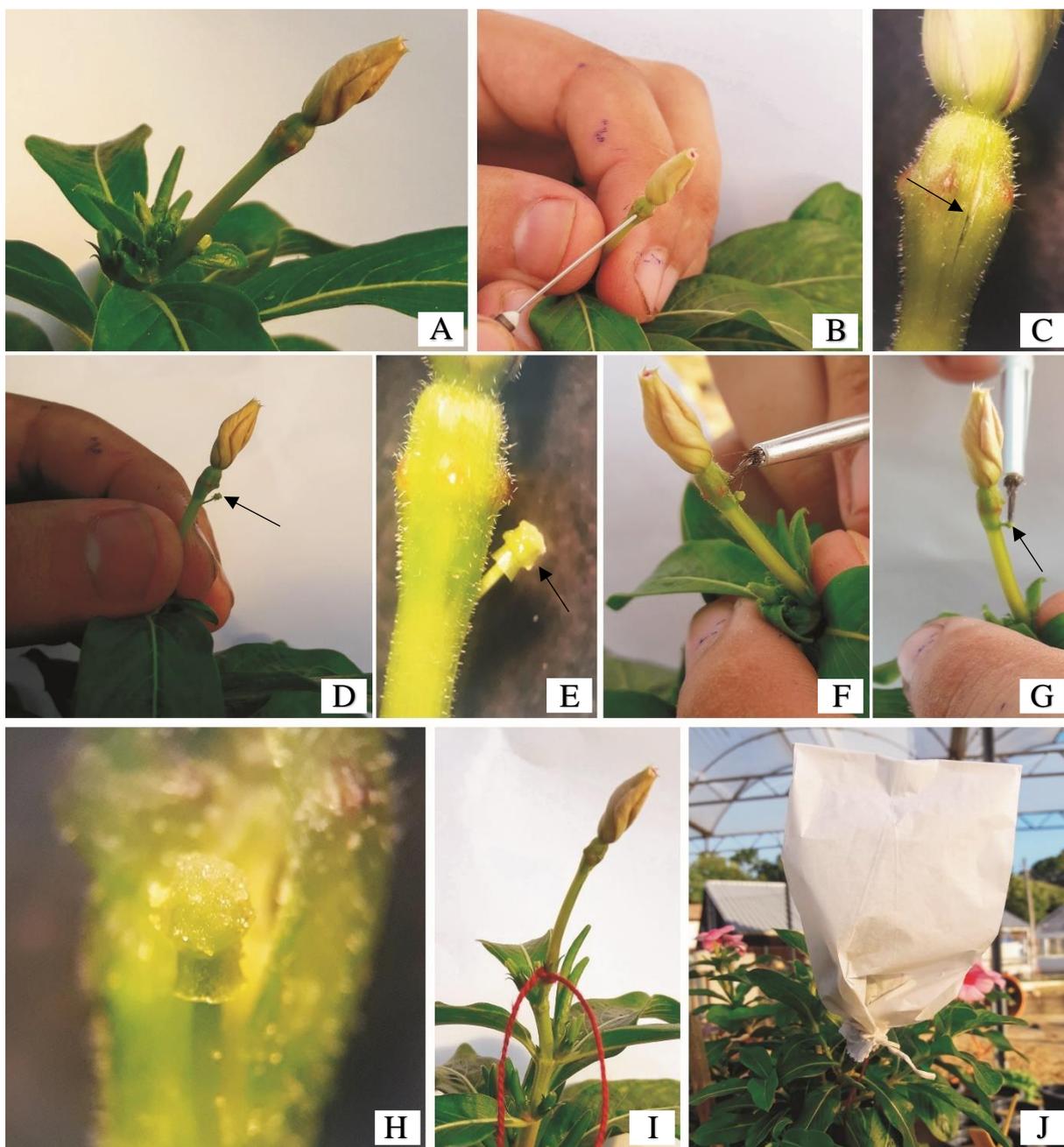


Figura 8. Autopolinização artificial. A) Botão floral (flor fechada) submetido à autopolinização artificial. B) Corte longitudinal na corola do botão floral realizado com agulha de uma seringa para exposição do estigma. C) Corte longitudinal (seta) na corola do botão floral, em detalhe. D) Exposição do estigma que será autopolinizado (seta). E) Estigma que será autopolinizado em detalhe (seta). F) Por meio do corte realizado anteriormente, as anteras foram acessadas com o auxílio de um pincel para retirada dos grãos de pólen. G) Os grãos de pólen aderidos ao pincel foram transferidos para o estigma, efetuando-se a autopolinização (seta). H) Grãos de pólen aderidos à superfície do estigma após autopolinização, em detalhe. I) Identificação do botão floral autofecundado com uma linha de cor vermelha. J) Botão floral autofecundado protegido por sacola de papel.

Os referidos botões florais e flores na antese coletadas (Figura 9A e 9B), foram fixadas imediatamente em FAA (formalina a 37%, ácido acético e etanol a 30%, na proporção de 5:5:90) por no mínimo 24 horas até o momento de uso. Após as 24 horas foram enxaguados em

água destilada. Dos botões florais e flores na antese, após dissecação em estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália) (Figura 9C), somente os pistilos (Figura 9D) foram imersos em hidróxido de sódio 8N por 12 horas. O excesso de hidróxido de sódio foi removido em água destilada, para depois os pistilos serem imersos em fluorocromo azul de anilina a 0,1% por 4 horas (Figura 9E) (DAFNI, 1992). Cada pistilo foi esmagado entre o conjunto lâmina/lamínula (Figura 9F) e observados em microscópio óptico (Olympus BX43, USA) (Figura 9G), com filtros de excitação de 370 nm e de emissão de 509 nm para detecção de tubos polínicos.

Para cada botão floral e para cada flor na antese (repetições) preparou-se uma lâmina. Analisadas as lâminas, computou-se o percentual do número de botões florais (BF) e flores na antese (FA) por genótipo, que apresentaram pelo menos um feixe de tubos polínicos no estigma (TPE), estilo (TPS) e ovário (TPO) de todos os pistilos analisados. Esta análise dará suporte para a existência ou não da cleistogamia em botões florais, assim como da autoincompatibilidade nos botões florais submetidos à autofecundação artificial.

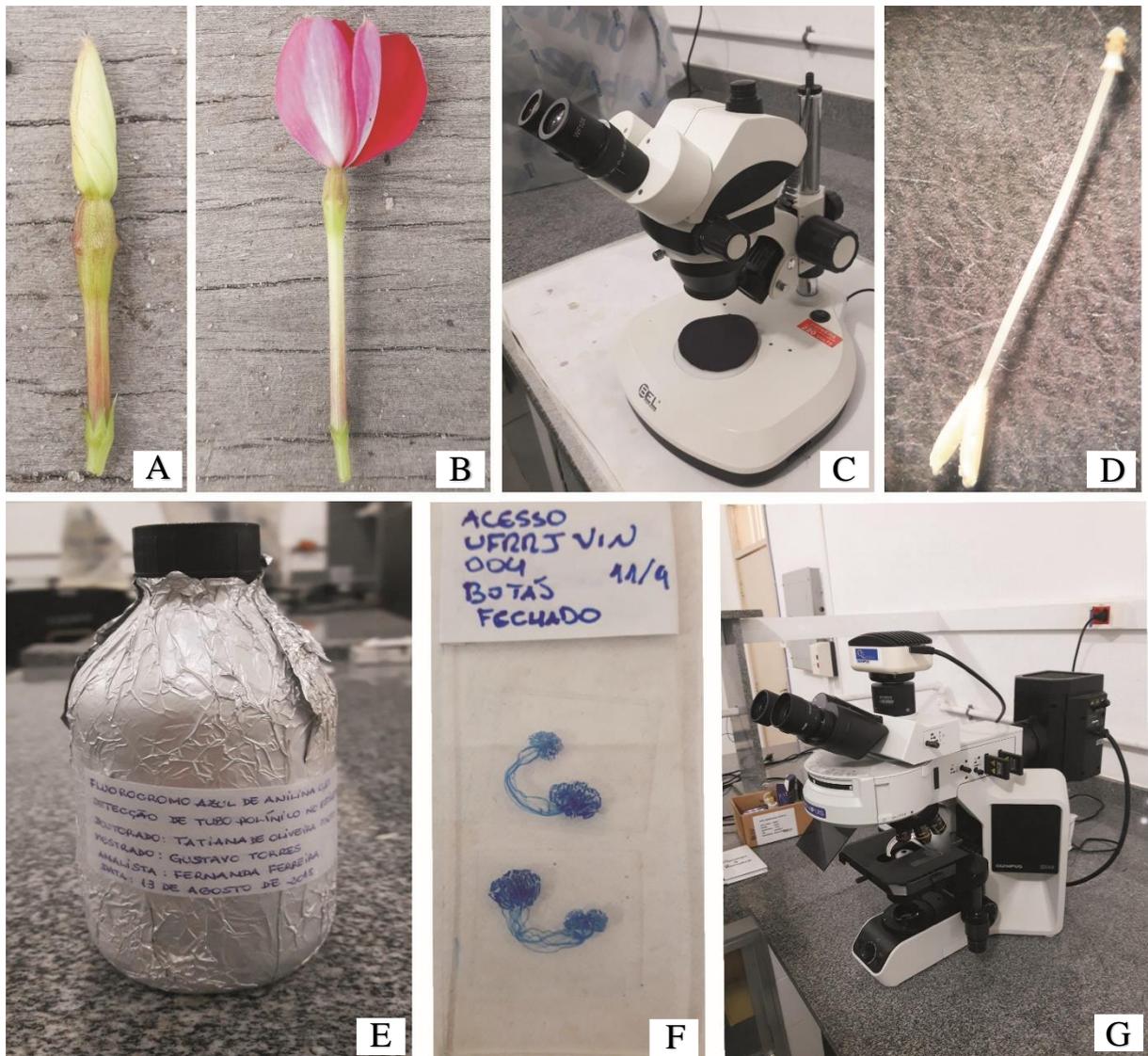


Figura 9. Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos *in vivo*. A) Botão floral (flor fechada) coletado. B) Flor na antese (protegida por sacola de papel) coletada. C) Estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). D) Pistilo (estigma, estilo e ovário). E) Fluorocromo azul de anilina a

0,1%. F) Pistilos esmagados entre o conjunto lâmina/lamínula. G) Microscópio óptico (Olympus BX43, USA).

7.6. Viabilidade polínica

Para avaliar a viabilidade dos grãos de pólen utilizou-se a solução tripla de Alexander (ALEXANDER, 1969). Tal solução é constituída por verde malaquita, fucsina ácida e *orange* G. O primeiro tem afinidade pela celulose presente na parede celular, corando-a de verde, enquanto a fucsina ácida cora o protoplasma de vermelho/púrpura e o *orange* G é um intensificador.

Nesta análise dez botões florais por genótipo (Figura 10A), foram fixados em etanol 70%, em frascos previamente identificados, e conservados a 4°C até o momento de uso. Os botões florais mencionados anteriormente foram dissecados em estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália) (Figura 10B) para retirada das cinco anteras. Estas foram hidratadas em água destilada por 1 hora (Figura 10C). Em seguida, as anteras, de cada botão floral, foram excisadas e, assim, obteve-se os grãos de pólen (Figura 10D). Aos mesmos adicionou-se uma gota da solução tripla de Alexander (Figura 10E). Prosseguindo, o excesso de corante e debris foram retirados da lâmina. Após cinco minutos, o conjunto lâmina/lamínula foi montado e observado em microscópio óptico (Olympus BX43, USA) (Figura 10F).

Foram preparadas dez lâminas por genótipo e em cada lâmina analisou-se 500 grãos de pólen. Conforme Alexander (1969), grãos de pólen com a coloração vermelho/púrpura foram considerados viáveis e grãos de pólen corados de verde/azul foram considerados inviáveis. Visto que, o grão de pólen inviável cora-se desta forma por não apresentar protoplasma. A partir da coloração obtida, computou-se a porcentagem média de grãos de pólen viáveis (% GPV) por genótipo. No Programa R (R Development Core Team, 2011) executou-se o teste t-Student para comparação das referidas porcentagens médias entre os genótipos analisados. Deve-se ressaltar que todos os botões florais utilizados nesta metodologia também foram usados na metodologia abaixo citada, “Receptividade do estigma”.

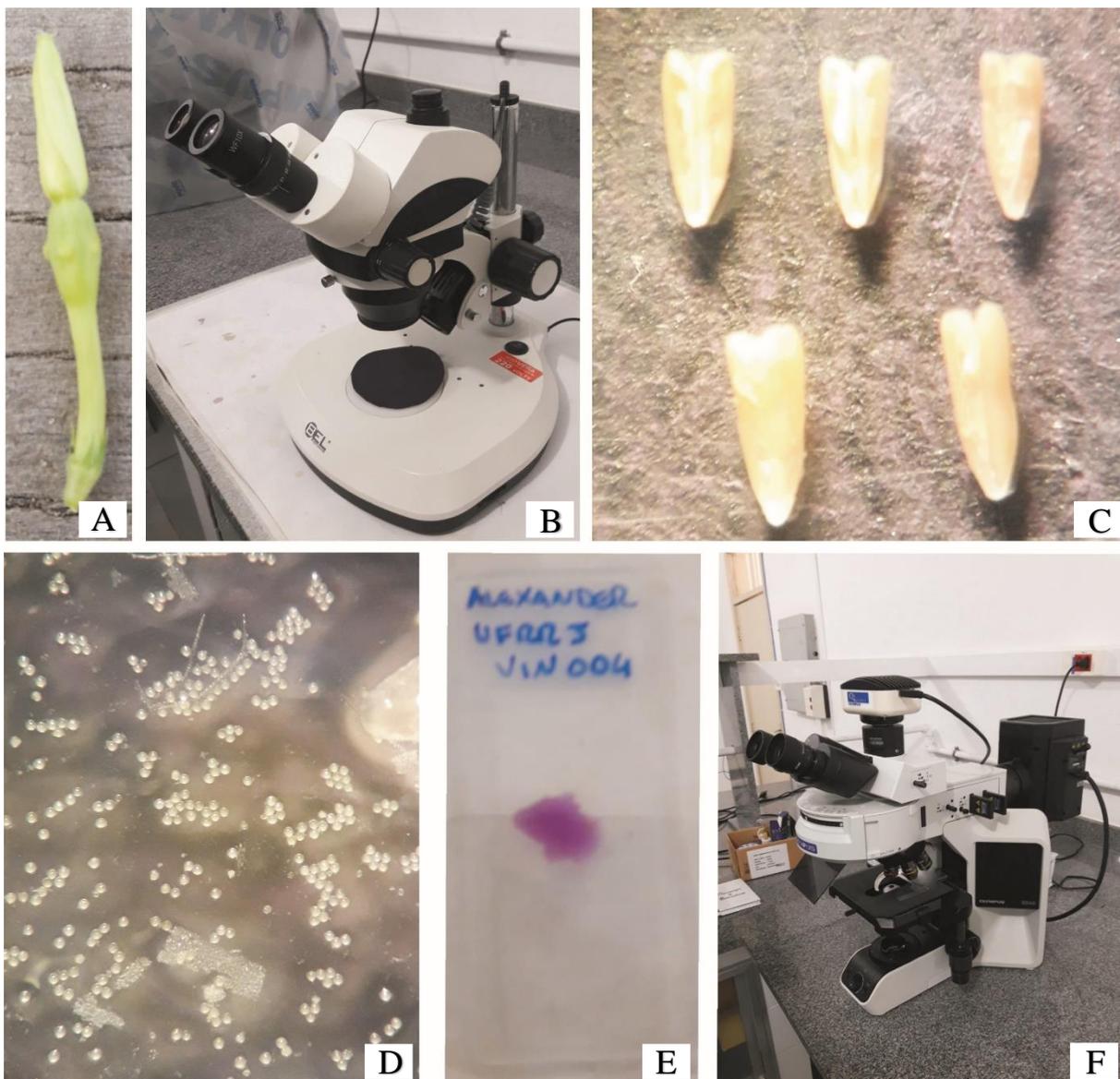


Figura 10. Viabilidade polínica. A) Botão floral (flor fechada) coletado. B) Estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). C) Cinco anteras hidratadas em água destilada. D) Grãos de pólen em uma lâmina. E) Grãos de pólen em uma gota da solução tripla de Alexander. F) Microscópio óptico (Olympus BX43, USA).

7.7. Receptividade do estigma

Nesta análise duas situações foram utilizadas: uma com botões florais (flores fechadas) e outra com flores na antese (Figura 11A e 11B). Em ambas as situações utilizou-se um controle para comparar a coloração dos estigmas após imersão na solução de acetato de alfa-naftil, com a dos estigmas não submetidos à esta solução (controle). Foram analisados, quanto à receptividade, estigmas de 10 flores na antese e de 10 flores fechadas, por genótipo (Figura 11C e 11D).

A receptividade foi analisada emergindo os estigmas na solução de acetato de alfa-naftil (Figura 11E), por 5 minutos (PEARSE, 1953). Os estigmas foram observados sob um estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália) (Figura 11F). Sendo classificados como receptivos os estigmas que apresentaram coloração escura, o que indica a atividade da enzima esterase (Figura 11G) (DAFNI, 1992).

Cabe ressaltar que antes de submeter os estigmas à solução de acetato de alfa-naftil, estes eram previamente observados em estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). Isto foi realizado para evitar que algum dano no tecido vegetal pudesse levar a um falso resultado.

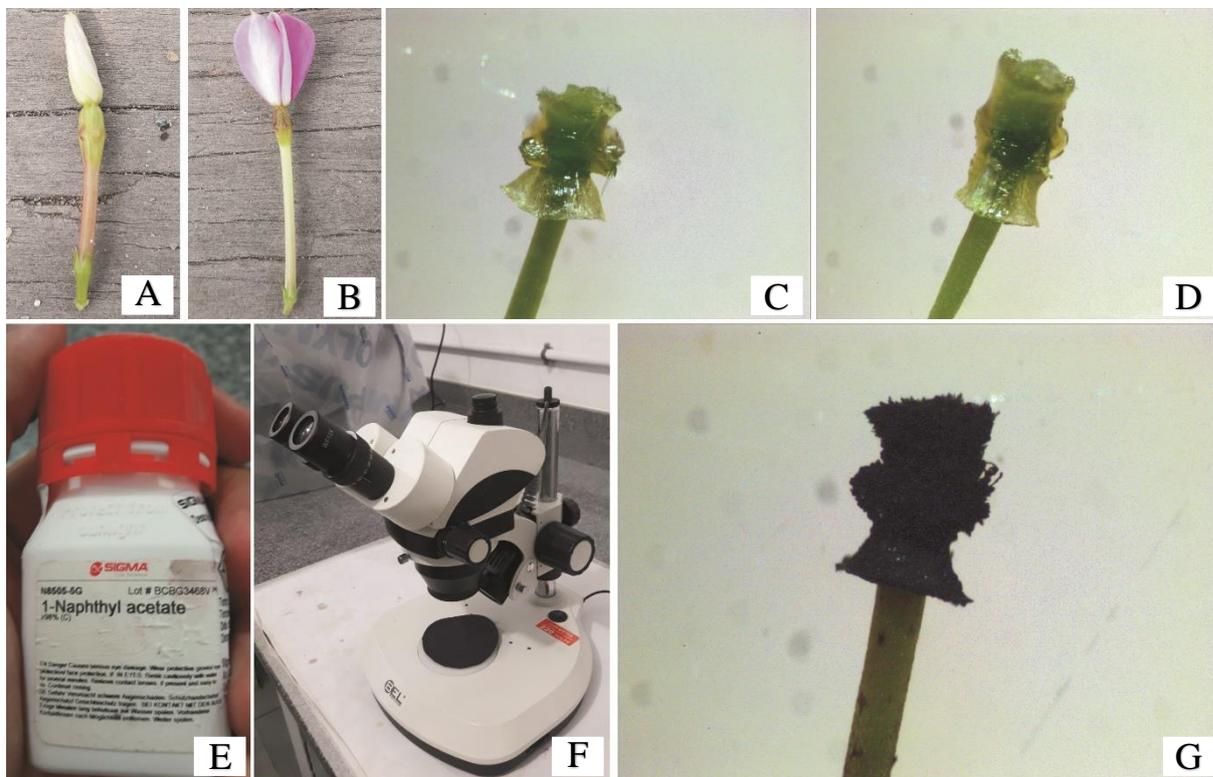


Figura 11. Receptividade do estigma. A) Botão floral (flor fechada) coletado. B) Flor na antese coletada. C) Estigma de flor na antese. D) Estigma de botão floral (flor fechada). E) Solução de acetato de alfa-naftil. F) Estereomicroscópio (Bel Photonics, Itália). G) Estigma receptivo com coloração escura.

7.8. Diversidade Genética

7.8.1. Genotipagem

Para a genotipagem utilizou-se os mesmos 10 genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) que compõem o estudo do modo de reprodução preferencial.

7.8.2. Coleta e extração de DNA genômico

No início da manhã foram coletadas folhas jovens dos referidos genótipos. Estas folhas foram envolvidas em papel alumínio, identificadas e colocadas em caixas de isopor contendo gelo em escama. Logo em seguida, foram levadas para o Laboratório de Citogenética e Biologia molecular de Plantas (LCBMP) do Departamento de Fitotecnia (DFITO), do Instituto de Agronomia (IA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), para o início da extração do DNA genômico. O protocolo de extração adotado foi o CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) proposto por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações.

Uma vez no laboratório foram macerados cerca de 100 mg de tecido vegetal em nitrogênio líquido, até formar um pó fino gelado. Este pó foi transferido para tubos Eppendorf de 2 mL, previamente identificados. Aos tubos Eppendorf, contendo as amostras, foram

adicionados 850 µl de tampão de extração, pré-aquecido a 65°C e incubado em banho-maria a 65°C por quarenta minutos e agitados suavemente a cada dez minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em microcentrífuga (Hettich MIKRO 120, Alemanha) a 14.000 rpm por cinco minutos. Após esse processo, o sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 mL, onde adicionou-se 800 µl de clorofórmio: álcool isoamílico (CIA/24:1). Estes tubos foram suavemente invertidos por aproximadamente 10 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para novos tubos de 1,5 mL e em cada tubo foram adicionados 400 µl de isopropanol gelado, seguido da inversão suave e seu armazenamento em freezer a -20°C, por duas horas e meia.

Os tubos com a solução incubada foram retirados do freezer e centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm, após isso o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado três vezes. Sendo uma vez com 200 µl de etanol 95% e duas vezes com 200 µl de etanol 70%. Após o descarte do último sobrenadante o material no tubo foi seco em temperatura ambiente, sobre papel toalha, até que o etanol evapore.

Os precipitados foram ressuspensos em 200 µl de TE [1 mL de Tris-HCl (1 M/pH 8,0), 0,2 mL de EDTA (0,5 M/pH 8,0)] contendo RNase e incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, acrescentou-se ao material 20 µl de NaCl (5m/L) e 150 µl de isopropanol gelado. Feito isso, os tubos foram armazenados em freezer a -4°C por um período *over night*.

No dia seguinte procedeu-se uma nova centrifugação por 10 minutos a 14.000 rpm e repetiu-se o processo de lavagem com etanol e secagem do precipitado, conforme descrito anteriormente. Por fim, os precipitados foram ressuspensos em 200 µl de TE [1 mL de Tris-HCl (1 M/pH 8,0), 0,2 mL de EDTA (0,5 M/pH 8,0)], com o auxílio de um vórtex (Vixar VM3000, Brasil) e armazenados em tubos de 1,5 mL e acondicionados em freezer. Assim, finalizou-se o processo de extração do DNA genômico.

7.8.3. Quantificação do DNA genômico

A integridade do DNA foi observada por eletroforese em gel de agarose a 2%, onde utilizou-se 5 µl de DNA e 2 µl de uma solução de gel *red* e *blue juice*. As concentrações de DNA nas amostras foram estimadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific Nanodrop 2000, EUA). Em seguida, o DNA foi diluído para a concentração de 5ng.µL⁻¹ para as reações de polimerase em cadeia (PCR).

7.8.4. Seleção de *primers* ISSR

Foi realizado um *screening* com 38 *primers* do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) dos quais 15 apresentaram polimorfismo. As sequências e temperaturas de anelamento encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Relação de *primers* do tipo ISSR utilizados com respectivas temperaturas de anelamento (TA).

Sequência 5' – 3'	TA (°C)
(GAA) ₆ AA	52°C
(GTG) ₃ GC	52°C
(GACA) ₄	50°C
C(GA) ₇	50°C
(AC) ₈ T	50°C
(GATA) ₂ (GACA) ₂	48°C
(GGAT) ₃ GA	48°C

Continua.

(GA) ₈ YT	47°C
(AG) ₈ C	45°C
(GAG) ₃ GC	45°C
(CT) ₈ G	44°C
(GA) ₆ CC	42°C
(CT) ₈ AC	40°C
(CT) ₈ TG	40°C
(AC) ₈ YG	40°C

Legenda: Y = C ou T.

7.8.5. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas conforme Williams et al. (1990), com algumas modificações. As concentrações adotadas para um volume final de reação de 13 µl de solução foram: 1,5 µl de solução de DNTPs; 1,5 µl de solução tampão 20x para PCR; 0,5µl de Cloreto de Magnésio; 0,12 µl da enzima Taq DNA Polimerase, 6,38 µl de água ultra-pura, 2 µl de DNA (5ng.µl⁻¹) e 1 µl de *primer*.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Eppendorf Mastercycler Pro, Alemanha), conduzidas da seguinte maneira: um minuto a 94°C para a desnaturação inicial, seguida de 40 ciclos, um composto por um minuto a 94°C, 40-52°C por um minuto (dependendo do *primer* ISSR utilizado) e três minutos a 72°C. Por fim, a extensão final por sete minutos a 72°C.

7.8.6. Fotodocumentação e obtenção da matriz binária

Os produtos das reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% e visualizados após coloração com gel *red* e *blue juice*. Os produtos amplificados foram fotodocumentados por meio do equipamento Bio-imaging System, MiniBis 16mm, Israel, e as imagens, de alta resolução, foram capturadas no programa GelCapture. Os perfis ISSR foram obtidos pela presença ou ausência de bandas de alta intensidade.

Todos os géis obtidos foram avaliados manualmente, e as bandas polimórficas foram caracterizadas como presença (valor 1) ou ausência (valor 0). Somente as bandas com alta fluorescência foram consideradas. Após análise das bandas foi obtida a matriz binária, a qual foi submetida a análise estatística.

7.8.7. Análises estatísticas da diversidade

Formada a matriz de dados binários, a matriz de distância genética foi calculada utilizando o índice de dissimilaridade de Jaccard (1908). A análise de agrupamento foi realizada usando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Mean*) (SOKAL & MICHENER, 1958). Para estimar o número ótimo de grupos no dendrograma foi utilizada a técnica de Kelley et al. (1996) (*Kelley-Gardner-Sutcliffe penalty function*). A consistência do padrão de agrupamento foi verificada através do grau de ajuste entre a representação gráfica da matriz de distância original (matriz fenética) e a matriz de agrupamento obtida (matriz cofenética), por meio do coeficiente de correlação cofenética (SOKAL & ROHLF, 1962), utilizando o Teste de Mantel com 1000 permutações (MANTEL, 1967).

Todas as análises estatísticas descritas acima foram realizadas no Programa R, versão 1.7.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da estatística descritiva com os valores mínimos, máximos, médios, desvio padrão e coeficiente de variação do número de grãos de pólen por botão floral (NGPB), número de grãos pólen por antera (NGPA), número de óvulos por botão floral (NOB) e relação pólen:óvulo (P:O) são apresentados na Tabela 5.

As médias do NGPB, NGPA, NOB e relação (P:O) foram de 11.049,00; 2.209,80; 34,78 e 329,6755, respectivamente. A média da razão (P:O) definiu o modo de reprodução preferencial como autógamo facultativo/alógamo facultativo (modo de reprodução misto), conforme Cruden (1977). Verificou-se que o valor máximo e mínimo para NGPB foi de 13.050,00 e 6.650,00, nesta ordem. O NGPA apresentou valor máximo de 2.610,00 e mínimo de 1.330,00. O valor máximo para o NOB foi de 48,00 e mínimo de 22,00. Para a relação (P:O), os valores máximo e mínimo foram de 500,00 e 176,1905, respectivamente.

Entre as variáveis NGPB, NGPA, NOB e relação (P:O), observou-se os seguintes coeficientes de variação (CV): 12,45711; 12,45711; 18,95036 e 23,44561%, respectivamente (Tabela 5). Pode-se observar que a relação (P:O) apresentou alta variabilidade, apontada por seu coeficiente de variação (CV) acima de 20%. Isso pode ter ocorrido porque para estimar esta razão estão envolvidas duas variáveis distintas, ou seja, NGPB e NOB. Essa relação pode ter elevado o valor do CV.

Tabela 5. Tabela descritiva do número de grãos de pólen por botão floral (NGPB), número de grãos pólen por antera (NGPA), número de óvulos por botão floral (NOB) e relação pólen:óvulo (P:O) em dez genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don.

Variáveis	Mínimo	Máximo	Média	Desvio padrão	CV (%)
NGPB	6.650,00	13.050,00	11.049,00	1.376,386	12,45711
NGPA	1.330,00	2.610,00	2.209,80	275,2772	12,45711
NOB	22,00	48,00	34,78	6,590934	18,95036
P:O	176,1905	500,00	329,6755	77,29445	23,44561

CV (%) = Coeficiente de variação; NGPB = número de grãos de pólen por botão floral; NGPA = número de grãos pólen por antera; NOB = número de óvulos por botão floral; P:O = relação pólen:óvulo.

Os valores médios e o teste t-Student ao nível de 5% de probabilidade das variáveis NGPB, NGPA e NOB estão presentes na Tabela 6.

Os genótipos de maiores médias para o NGPB e NGPA foram: UFRRJ VIN005, UFRRJ VIN007, UFRRJ VIN037 e UFRRJ VIN050. O teste t ($p > 0,05$) mostrou que não houve diferença significativa entre os acessos anteriormente citados. O genótipo UFRRJ VIN004 obteve as menores médias para o NGPB e NGPA. Estas médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$) de todos os acessos.

Para o NOB os acessos com as maiores médias foram os seguintes: UFRRJ VIN004, UFRRJ VIN009, UFRRJ VIN029 e UFRRJ VIN037. Já as menores médias foram observadas nos genótipos: UFRRJ VIN005, UFRRJ VIN007 e UFRRJ VIN055.

Tabela 6. Média do número de grãos de pólen por botão floral (NGPB), número de grãos pólen por antera (NGPA) e número de óvulos por botão floral (NOB) referente à avaliação de dez genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don.

Genótipos	NGPB	NGPA	NOB
UFRRJ VIN004	8.150d	1.630d	36,60ab
UFRRJ VIN005	12.250a	2.450a	31,60bcd
UFRRJ VIN007	11.680ab	2.336ab	26,80bcd
UFRRJ VIN008	11.030bc	2.206bc	34,00bc
UFRRJ VIN009	10.730c	2.146bc	41,80a
UFRRJ VIN014	10.090c	2.018bc	33,20bc
UFRRJ VIN029	10.920bc	2.184bc	38,20a
UFRRJ VIN037	12.290a	2.458a	41,60a
UFRRJ VIN050	12.290a	2.458a	36,00bc
UFRRJ VIN055	11.060bc	2.212bc	28,00bcd

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student, $\alpha=0,05$ de significância.

Os resultados da relação (P:O) indicaram que oito (UFRRJ VIN005, UFRRJ VIN008, UFRRJ VIN009, UFRRJ VIN014, UFRRJ VIN029, UFRRJ VIN037, UFRRJ VIN050 e UFRRJ VIN055), dos 10 genótipos, apresentaram, simultaneamente, autogamia facultativa e alogamia facultativa (modo de reprodução misto). Porém, dois genótipos apresentaram somente um modo de reprodução, alógamo facultativo, no UFRRJ VIN007, e autógeno facultativo no UFRRJ VIN004 (Tabela 7).

A razão (P:O) reflete a probabilidade dos grãos de pólen atingirem o estigma. Uma transferência de grãos de pólen mais eficiente resultará em uma menor relação (P:O). Assim, plantas autóegas devem ter uma relação (P:O) menor que as plantas de polinização cruzada (CRUDEN, 1977). Isto foi observado no genótipo UFRRJ VIN004, classificado como autógeno facultativo (Tabela 7).

Miyajima et al. (2004) estudaram a polinização da vinca nos genótipos *Parasol* e *Cooler Peppermint*, com o objetivo de melhorar a produção comercial de sementes. Estes autores utilizaram a classificação sugerida por Cruden (1977) e observaram razão (P:O) de 80-150. Dessa maneira, tais genótipos foram classificados como autógenos facultativos, assim como o genótipo UFRRJ VIN004.

Diante do exposto, observou-se predominância do modo de reprodução preferencial misto nos genótipos de vinca analisados. No entanto, os genótipos UFRRJ VIN004 e UFRRJ VIN007 apresentaram tendência para a autogamia e alogamia, respectivamente. Tal fato indica diversidade no que se refere ao sistema reprodutivo dos genótipos estudados, pois podem realizar autofecundação bem como polinização cruzada.

Tabela 7. Relação pólen:óvulo (P:O) e modo de reprodução preferencial de dez genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, segundo a metodologia de Cruden (1977).

Genótipos	P:O	Modo de Reprodução Preferencial
UFRRJ VIN004	222,67	Autógama facultativa

Continua.

UFRRJ VIN005	387,66	Autógama facultativa/Alógama facultativa
UFRRJ VIN007	435,82	Alógama facultativa
UFRRJ VIN008	324,41	Autógama facultativa/Alógama facultativa
UFRRJ VIN009	256,70	Autógama facultativa/Alógama facultativa
UFRRJ VIN014	303,91	Autógama facultativa/Alógama facultativa
UFRRJ VIN029	285,86	Autógama facultativa/Alógama facultativa
UFRRJ VIN037	295,43	Autógama facultativa/Alógama facultativa
UFRRJ VIN050	341,38	Autógama facultativa/Alógama facultativa
UFRRJ VIN055	395,00	Autógama facultativa/Alógama facultativa

Os grãos de pólen analisados reagiram, na sua totalidade, negativamente quando na presença de Sudan IV (Figura 12A), e positivos a solução de iodeto de potássio (I_2KI) (Figura 12B). Portanto, a natureza histoquímica dos grãos de pólen foi amilácea em todos os genótipos analisados. Como todos os grãos de pólen (100%) reagiram positivamente a solução de I_2KI , não foi necessário realizar o teste t-Student para comparação das porcentagens médias de grãos de pólen amiláceos entre os genótipos estudados.

Baker & Baker (1979) relataram que grãos de pólen do tipo amiláceo ocorrem em espécies autógamas e alógamas, cuja polinização pode ser realizada pelo vento, por lepidópteros ou por aves. Tal fato, reforça o modo de reprodução preferencial misto observado na Tabela 7.

Várias espécies, como *Solanum pennellii*, *Solanum lycopersicoides* e *Solanum sitiens* (GARCÍA, 2007), *Hedychium spicatum* e *Hedychium spicatum* var. *Acuminatum* (WANG et al. 2004) também apresentaram grãos de pólen do tipo amiláceo.

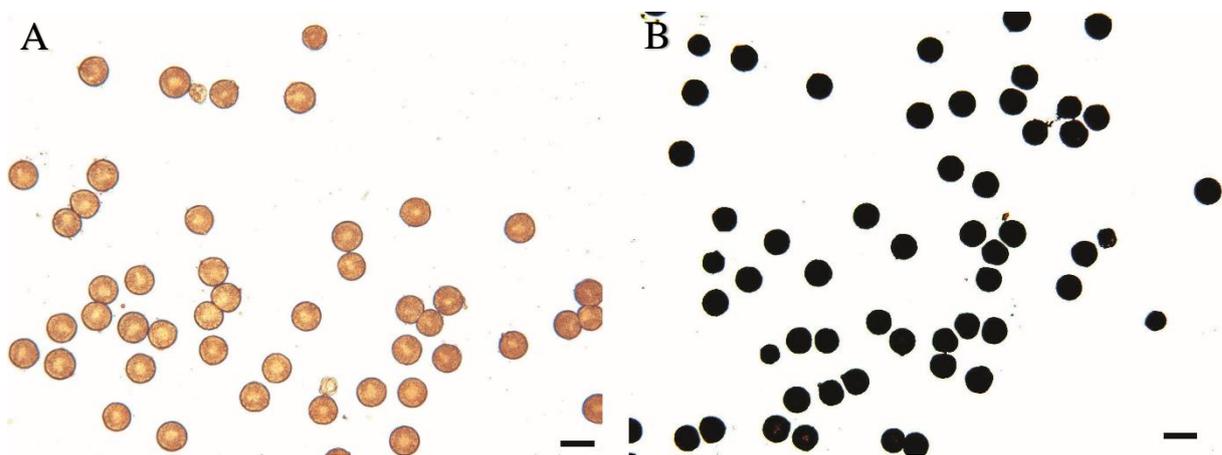


Figura 12. Natureza histoquímica dos grãos de pólen de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don. A) Grãos de pólen corados com Sudan IV não mostrando reação. B) Grãos de pólen corados com I_2KI com reação positiva. Escala = 80 μ m.

A partir do percentual de botões florais e flores na antese com tubos polínicos no estigma, estilo e ovário foi possível observar tendências quanto ao modo de reprodução preferencial nos genótipos analisados (Tabela 8).

Os genótipos UFRRJ VIN004, UFRRJ VIN009, UFRRJ VIN014, UFRRJ VIN029 e UFRRJ VIN037 tenderam a autofecundação natural, reforçada pela cleistogamia. Visto que,

em 70,00, 20,00, 20,00, 30,00 e 10,00% dos botões florais apresentaram tubos polínicos no estigma, respectivamente. Portanto, pode-se inferir que a cleistogamia ocorreu em 50% dos genótipos estudados. Nestes, apenas em UFRRJ VIN014, UFRRJ VIN029 e UFRRJ VIN037 verificou-se, em botões florais, a presença de tubos polínicos no estigma chegando até o estilo (Figura 13A, 13B e 13C). Foi constatado a ausência de tubos polínicos no ovário de botões florais de todos os genótipos (Figura 13D).

Os acessos UFRRJ VIN005, UFRRJ VIN050 e UFRRJ VIN055 foram os únicos em que a autofecundação natural ocorreu somente em flores na antese. Cabe ressaltar que nos genótipos UFRRJ VIN004 e UFRRJ VIN029 o percentual de autofecundação entre o botão floral e flor na antese se manteve. O primeiro, em flores na antese, apresentou tubos polínicos entendendo-se desde o estigma, estilo até o ovário (Figura 14A, 14B, 14C e 14D), sendo o único genótipo com tal comportamento em flores na antese. Embora tenha sido observado a presença de autofecundação natural em botões fechados e flores na antese (protegidas), estes apresentaram percentuais pequenos de autogamia na maioria dos genótipos (Tabela 8). Na verdade, os genótipos tenderam a taxas de polinização aberta maiores que as de autofecundação, exceto para UFRRJ VIN004, UFRRJ VIN005 e UFRRJ VIN055. Dessa forma, em 70% dos genótipos analisados as taxas gerais de polinização dependeram mais da polinização cruzada do que da autofecundação. Especialmente nos genótipos UFRRJ VIN007 e UFRRJ VIN008, uma vez que o percentual de botões florais e flores na antese com tubos polínicos no estigma foi de 0,00%. Sendo assim, tais genótipos exibem uma forte tendência a polinização cruzada.

Diante do exposto, pode-se inferir que a cleistogamia ocorreu em 50% dos acessos estudados, com destaque para o UFRRJ VIN004, onde 70,00% dos botões florais analisados apresentaram tubos polínicos no estigma. Porém, as taxas de polinização aberta, de modo geral, foram maiores que as de autofecundação. Sendo assim, existem genótipos com tendência a autofecundação bem como para a polinização cruzada, o que sugere diversidade quanto as estratégias reprodutivas nos genótipos analisados.

Tabela 8. Porcentagem do número de botões florais (BF) e flores na antese (FA), para verificação de *cleistogamia* e *autofecundação natural*, com grãos de pólen no estigma (GPE), tubos polínicos no estigma (TPE), tubos polínicos no estilo (TPS) e tubos polínicos no ovário (TPO) em dez genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don.

Genótipos	GPE		TPE		TPS		TPO	
	BF (%)	FA (%)						
UFRRJ VIN004	70,00	70,00	70,00	70,00	0,00	30,00	0,00	20,00
UFRRJ VIN005	0,00	60,00	0,00	60,00	0,00	40,00	0,00	0,00
UFRRJ VIN007	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
UFRRJ VIN008	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
UFRRJ VIN009	20,00	40,00	20,00	40,00	0,00	0,00	0,00	0,00
UFRRJ VIN014	20,00	30,00	20,00	30,00	20,00	30,00	0,00	0,00
UFRRJ VIN029	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00	0,00	0,00	0,00
UFRRJ VIN037	10,00	30,00	10,00	30,00	10,00	0,00	0,00	0,00
UFRRJ VIN050	0,00	40,00	0,00	40,00	0,00	0,00	0,00	0,00
UFRRJ VIN055	0,00	80,00	0,00	80,00	0,00	40,00	0,00	0,00

Nos botões florais submetidos à autopolinização artificial, observou-se tubos polínicos no estigma, estilo e ovário em todos os genótipos analisados (Tabela 9). Portanto, a polinização cruzada não foi reforçada por nenhum sistema autoincompatível. De acordo com Nejat et al. (2015), a vinca é autocompatível ao contrário da maioria das outras espécies da família.

Os genótipos UFRRJ VIN005, UFRRJ VIN009, UFRRJ VIN014, UFRRJ VIN029, UFRRJ VIN037, UFRRJ VIN050 e UFRRJ VIN055 tiveram todos os botões florais analisados com tubos polínicos no estigma (100%) (Tabela 9). Também foi observado que os acessos tiveram mais de 50% de seus botões florais com tubos polínicos no estilo, exceto UFRRJ VIN005, UFRRJ VIN007, UFRRJ VIN008 e UFRRJ VIN029. Quanto aos botões florais com tubos polínicos no ovário, apenas UFRRJ VIN050 exibiu o percentual de 100%.

O genótipo UFRRJ VIN050 foi o único que apresentou todos os botões florais analisados com tubos polínicos no estigma, estilo e ovário (Figura 15A, 15B, 15C e 15D).

Tabela 9. Porcentagem de botões florais, submetidos à autopolinização artificial, para verificação da *autoincompatibilidade*, com tubos polínicos no estigma (TPE), tubos polínicos no estilo (TBS) e tubos polínicos no ovário (TPO) em dez genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don.

Genótipos	TPE (%)	TPS (%)	TPO (%)
UFRRJ VIN004	80,00	60,00	20,00
UFRRJ VIN005	100,00	30,00	30,00
UFRRJ VIN007	70,00	20,00	20,00
UFRRJ VIN008	70,00	30,00	30,00
UFRRJ VIN009	100,00	70,00	30,00
UFRRJ VIN014	100,00	60,00	30,00
UFRRJ VIN029	100,00	50,00	50,00
UFRRJ VIN037	100,00	70,00	30,00
UFRRJ VIN050	100,00	100,00	100,00
UFRRJ VIN055	100,00	60,00	30,00

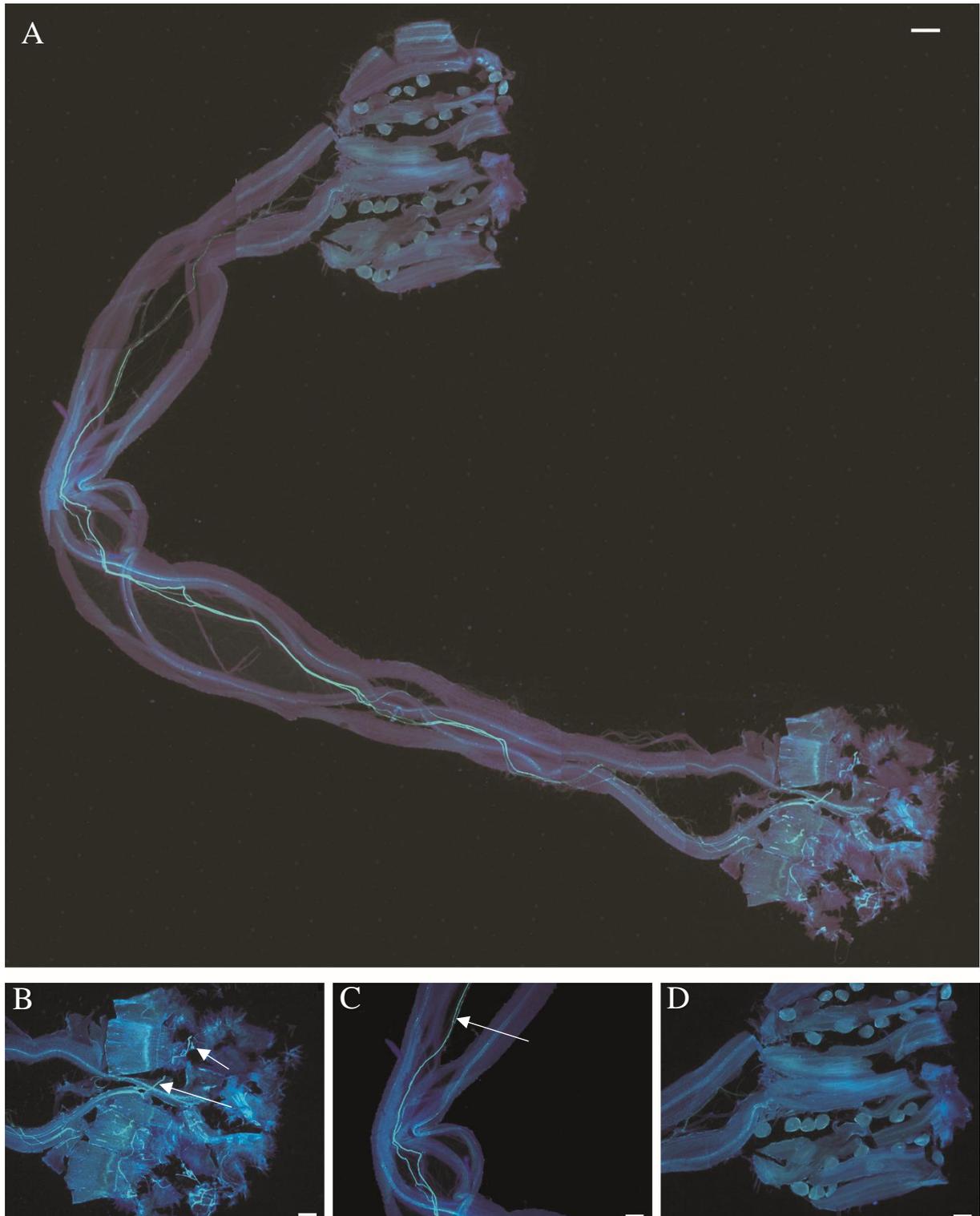


Figura 13. Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos *in vivo*. A) Presença de tubos polínicos no estigma e no estilo em pistilo de botão floral (flor fechada), no genótipo UFRRJ VIN014. B) Grãos de pólen (seta pequena) e tubos polínicos no estigma (setas grandes) em pistilo de botão floral. C) Tubos polínicos no estilo (seta grande) em pistilo de botão floral. D) Ausência de tubos polínicos no ovário em pistilo de botão floral. Escala = 200 μ m.

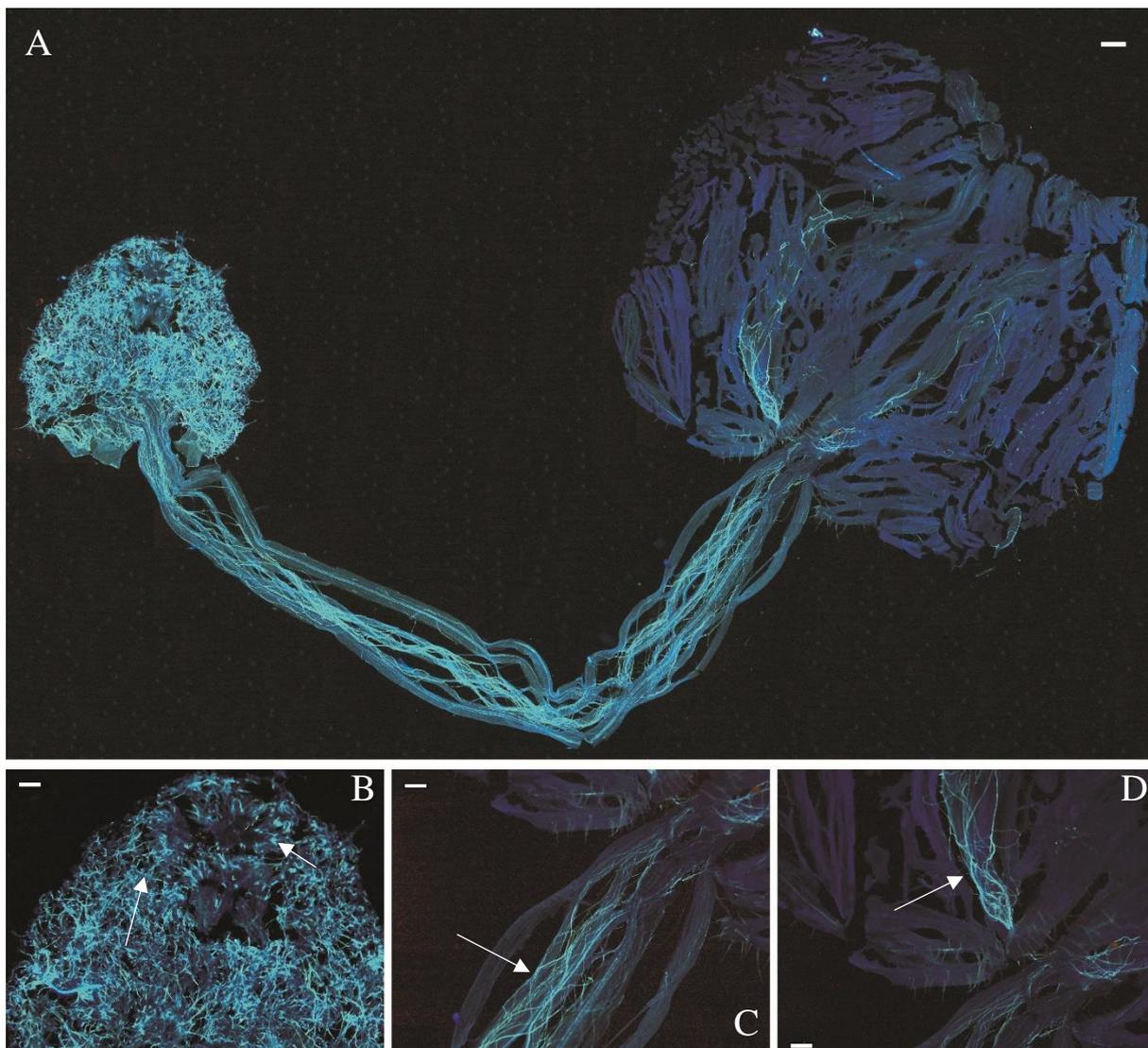


Figura 14. Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos *in vivo*. A) Presença de tubos polínicos no estigma, estilo e ovário em pistilo de flor na antese, protegida por sacola de papel, no genótipo UFRRJ VIN004. B) Grãos de pólen (seta pequena) e tubos polínicos no estigma (seta grande) em pistilo de flor na antese, protegida por sacola de papel. C) Tubos polínicos no estilo (seta grande) em pistilo de flor na antese, protegida por sacola de papel. D) Presença de tubos polínicos no ovário (seta grande) em pistilo de flor na antese, protegida por sacola de papel. Escala = 200 μ m.

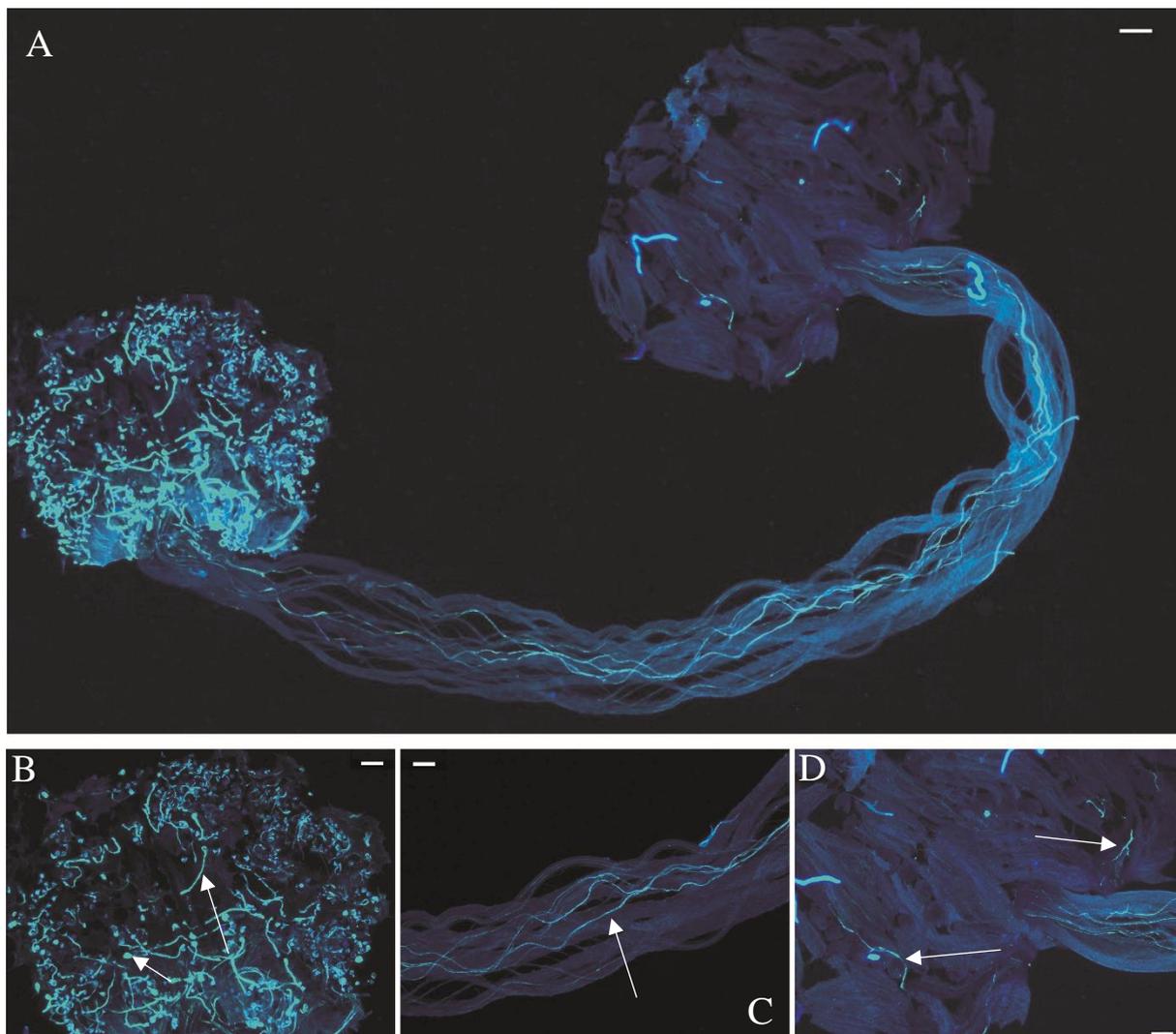


Figura 15. Emissão e desenvolvimento de tubos polínicos *in vivo*. A) Presença de tubos polínicos no estigma, estilo e ovário em pistilo de botão floral, submetido à autopolinização artificial, no genótipo UFRRJ VIN050. B) Grãos de pólen (seta pequena) e tubos polínicos no estigma (seta grande) em pistilo de botão floral, submetido à autopolinização artificial. C) Tubos polínicos no estilo (seta grande) em pistilo de botão floral, submetido à autopolinização artificial. D) Presença de tubos polínicos no ovário (setas grandes) em pistilo de botão floral, submetido à autopolinização artificial. Escala = 200 μ m.

Nas figuras 16A, 16B, 16C e 16D é possível observar a distinção entre grãos de pólen viáveis e inviáveis em solução tripla de Alexander. Os viáveis apresentaram coloração vermelho/púrpura, ao passo que os grãos de pólen inviáveis ficaram corados de verde/azul.

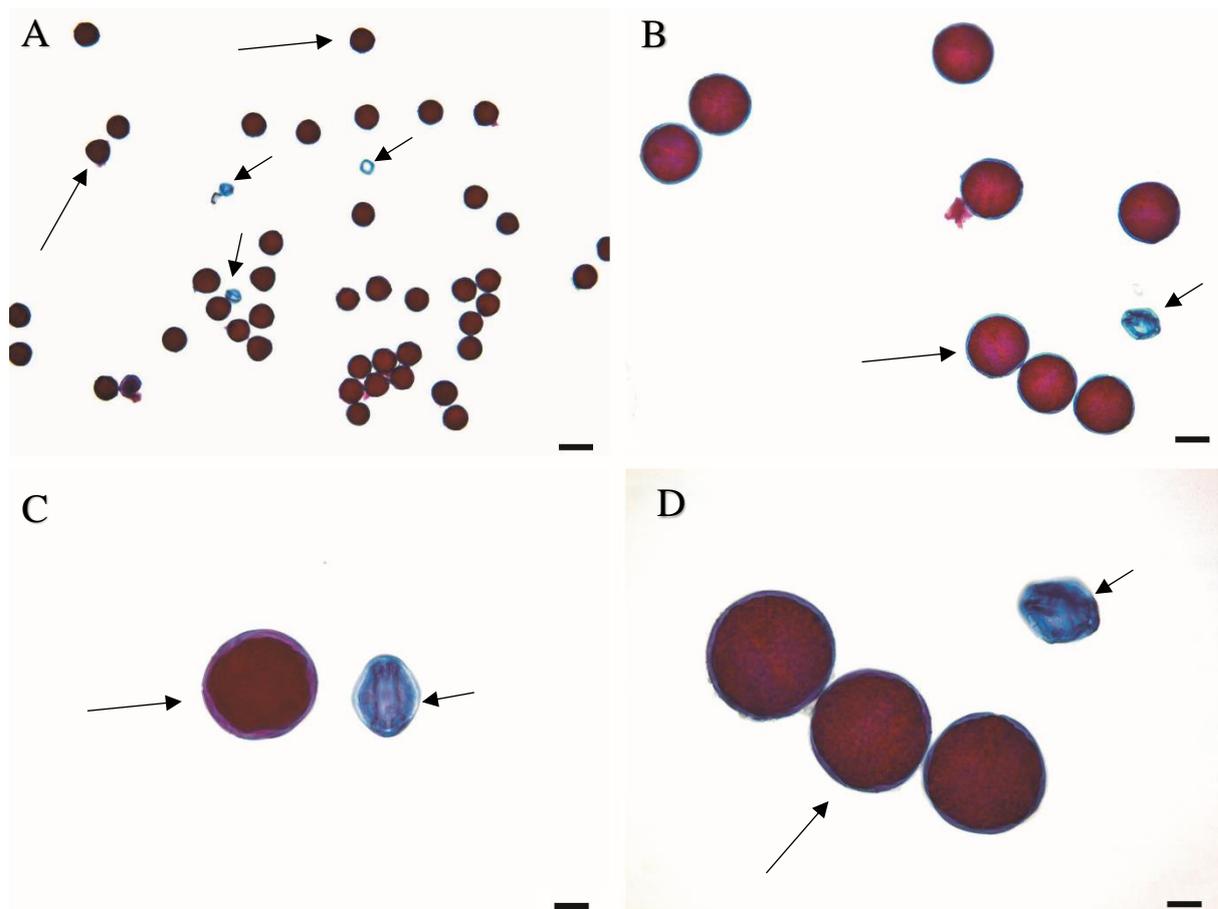


Figura 16. Grãos de pólen viáveis e inviáveis de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) após coloração com a solução tripla de Alexander (ALEXANDER, 1969). A) Grãos de pólen inviáveis (setas pequenas) em menor porcentagem em relação aos viáveis (setas grandes). Escala = 80 μ m. B) Grãos de pólen viáveis (seta grande) apresentaram coloração púrpura e paredes íntegras. O grão de pólen inviável (seta pequena) apresentou citoplasma retraído e não corado. Escala = 40 μ m. C) Grão de pólen viável (seta grande) mostrando o citoplasma totalmente corado e grão de pólen inviável mostrando o citoplasma plasmolizado (seta pequena). Escala = 20 μ m. D) Grãos de pólen viáveis (seta grande) e inviável (seta pequena). Escala = 20 μ m.

As porcentagens médias de grãos de pólen viáveis (%GPV) e o teste t-Student ao nível de 5% de probabilidade, em dez genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don são apresentados na Tabela 10.

A média geral da viabilidade polínica obtida para botões florais foi de 96,50%, denotando-se, portanto, elevado valor de grãos de pólen viáveis. Os genótipos UFRRJ VIN007, UFRRJ VIN029 e UFRRJ VIN055 apresentaram as maiores médias, a saber: 97,65; 97,70 e 98,55%, respectivamente. O teste t ($p > 0,05$) mostrou que não houve diferença significativa entre os genótipos anteriormente citados. Até mesmo UFRRJ VIN008, que exibiu a menor média (93,10%) denotou uma alta viabilidade. Segundo Souza et al. (2002), é considerado como alta viabilidade polínica valores acima de 70%; como média, valores de 31 a 69% e valores até 30% como baixa viabilidade. Portanto, todos os genótipos demonstraram alta viabilidade polínica em botões florais.

Outros autores também relataram elevados percentuais de viabilidade polínica. Nunes et al. (2012) obtiveram valores superiores a 89% em dez genótipos de *Lolium multiflorum* Lam

e Dalla Nora et al. (2014) ao estudarem a viabilidade polínica de sete cultivares de feijão encontraram altas porcentagens de viabilidade polínica (>99%).

Lima et al. (2016) explicam que os elevados valores de viabilidade polínica são consequências de regularidade na meiose. O curso normal da meiose nas células-mãe do pólen, incluindo a formação bivalente regular e a citocinese normal, sugere alta viabilidade polínica (PAGLIARINI, 2000). Por sua vez, o surgimento de grãos de pólen anormais, ou inviáveis, pode ser resultado de aberrações estruturais e numéricas, decorrentes de anormalidades durante a pré-meiose, meiose e pós-meiose (HORNER & PALMER, 1995).

Damasceno Junior et al. (2010) apontaram que apenas genótipos com médias altas de viabilidade polínica e de índice meiótico sejam incorporados em programas de melhoramento genético que envolvam cruzamentos.

Tabela 10. Porcentagem média de grãos de pólen viáveis (%GPV) de botões florais em dez genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don.

Genótipos	%GPV
UFRRJ VIN004	97,02%bc
UFRRJ VIN005	95,65%c
UFRRJ VIN007	97,65%ab
UFRRJ VIN008	93,10%d
UFRRJ VIN009	95,42%c
UFRRJ VIN014	97,30%b
UFRRJ VIN029	97,70%ab
UFRRJ VIN037	96,60%bc
UFRRJ VIN050	96,00%c
UFRRJ VIN055	98,55%a
Média geral = 96,50%	

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si, de acordo com o teste t-Student, $\alpha=0,05$ de significância.

Os estigmas de flores na antese reagiram, na sua totalidade, positivamente à solução de acetato de alfa-naftil nos dez genótipos. Dessa maneira, os referidos estigmas apresentaram coloração preta em relação ao controle (Figuras 17A e 17B). Os estigmas de botões florais (flores fechadas) foram positivos, em sua plenitude, quando na presença da solução de acetato de alfa-naftil em relação ao controle, em todos os genótipos (Figuras 17C e 17D). Portanto, os resultados indicaram que todos estigmas foram receptivos em flores fechadas e flores na antese nos dez genótipos estudados.

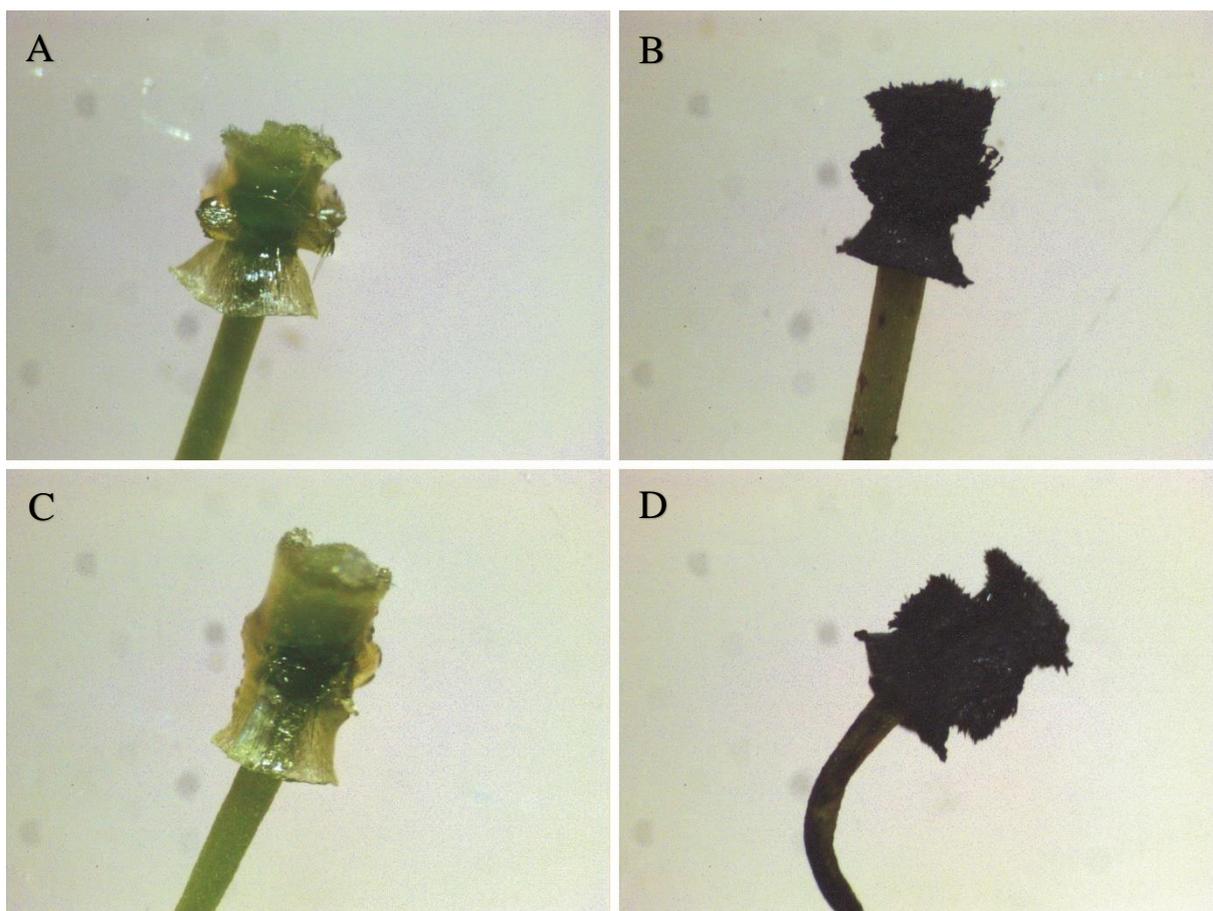


Figura 17. Receptividade dos estigmas de flores na antese e de botões florais (flores fechadas) corados com alfa-naftil em *Catharanthus roseus* [L.] G. Don. A) Estigma flor na antese que não foi submetido à solução de alfa-naftil (controle). B) Estigma receptivo de flor na antese. C) Estigma de botão floral (flor fechada) que não foi submetido à solução de alfa-naftil (controle). D) Estigma receptivo de botão floral (flor fechada). Amplificação = 15x.

A receptividade ótima do estigma é variável e pode ocorrer antes e/ou após a abertura floral (YI et al. 2006). Kulkarni et al. (2005) observaram em três variedades de vinca, que o estigma foi receptivo 1 dia antes da antese e até 2 dias após a antese. Contudo, Bhattacharya & Mandal (2003) relataram que o período de receptividade máximo ocorre no segundo dia após a antese. Sreevalli (2002) observou que a maior receptividade ocorreu entre 06:00 e 10:00 horas e entre 15:00 e 17:00 horas. Kulkarni & Baskaran (2013) afirmaram que a porção receptiva está na base do estigma. No entanto, observa-se com base na metodologia empregada, que toda a superfície estigmática, antes e depois da antese, estava receptiva (Figuras 16B e 16D). Dessa maneira, a cleistogamia pode ocorrer. Visto que, antes da abertura floral, os estigmas estavam receptivos e a viabilidade dos grãos de pólen estava elevada nos dez genótipos analisados.

A relação de *primers* de marcadores ISSR utilizados com o número de marcas registradas, número de marcas monomórficas, número de marcas polimórficas e porcentagem de polimorfismo dos fragmentos amplificados de DNA genômico de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don estão presentes na Tabela 11.

Dos 38 *primers* do tipo ISSR inicialmente testados, 15 mostraram-se adequados para acessar a diversidade genética nos genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, uma vez que exibiram fragmentos de boa intensidade e com bom perfil de amplificação. Sendo assim, foram amplificados 284 fragmentos ISSR. Desses, 256 (90,14%) foram polimórficos e 28 (9,86%) monomórficos, com uma média de 18,93 fragmentos por *primer* (Tabela 11). Esta elevada

média de fragmentos por *primer* e a baixa porcentagem de fragmentos monomórficos evidenciaram a grande variabilidade genética entre os 10 genótipos de vinca. Portanto, maiores serão as chances de se identificar genótipos promissores quanto aos princípios ativos vincristina e vimblastina com capacidade de inclusão em programas de melhoramento genético da vinca. Já que, o sucesso na seleção de genótipos é alcançado quando se dispõe de diversidade genética.

Tabela 11. Relação de *primers* de marcadores ISSR utilizados com número de marcas registradas, número de marcas monomórficas e polimórficas e porcentagem de polimorfismo dos fragmentos amplificados de DNA genômico de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don.

Sequência 5' – 3'	Nº de marcas	Nº de marcas monomórficas	Nº de marcas polimórficas	% polimorfismo
(GAA) ₆ AA	09	01	08	88,89%
(GTG) ₃ GC	21	0	21	100,00%
(GACA) ₄	39	0	39	100,00%
C(GA) ₇	08	02	06	75,00%
(AC) ₈ T	09	0	09	100,00%
(GATA) ₂ (GACA) ₂	29	0	29	100,00%
(GGAT) ₃ GA	15	05	10	66,67%
(GA) ₈ YT	14	05	09	64,28%
(AG) ₈ C	19	01	18	94,74%
(GAG) ₃ GC	25	01	24	96,00%
(CT) ₈ G	25	01	24	96,00%
(GA) ₆ CC	35	03	32	91,43%
(CT) ₈ AC	08	02	06	75,00%
(CT) ₈ TG	17	02	15	88,23%
(AC) ₈ YG	11	05	06	54,54%
Média	18,93	1,87	17,06	86,05%
Total	284	28	256	90,14

Segundo Colombo et al. (2000), bandas polimórficas no intervalo entre 50 a 100 é considerado suficiente para estimar relações genéticas entre e dentro de espécies vegetais. No presente estudo, conforme mencionado anteriormente, obtivemos 256 bandas polimórficas, portanto, pode-se inferir que as estimativas de diversidade genética entre os genótipos estudados denotam uma boa precisão. Lal et al. (2011) ao estudarem a diversidade genética, por meio de marcadores ISSR, entre nove cultivares de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don encontraram um total de 342 bandas, sendo 270 polimórficas e 72 monomórficas, indicando polimorfismo de 78,94%. Os mesmos autores também estimaram a diversidade genética via marcadores RAPD e SSR, e obtiveram 78,71 e 76,62% de bandas polimórficas, respectivamente. Contudo, Ibrahim et al. (2013) e Shaw et al. (2009) estimaram a diversidade genética entre cultivares de vinca e observaram polimorfismo total de 60 e de 55%, nesta ordem. Sendo assim, este polimorfismo não foi tão elevado comparado aos nossos resultados (90,14%).

O menor número de bandas foi encontrado nos *primers* C(GA)₇ e (CT)₈AC, ambos com oito bandas, e o maior, no *primer* (GACA)₄ com 39 bandas, todas elas polimórficas (Tabela 11, Figura 18). Além de (GACA)₄, os *primers* (GTG)₃GC, (AC)₈T e (GATA)₂(GACA)₂, também exibiram 100% de polimorfismo. Tal polimorfismo gerado reflete o bom desempenho dos *primers* ISSR na avaliação da diversidade genética.

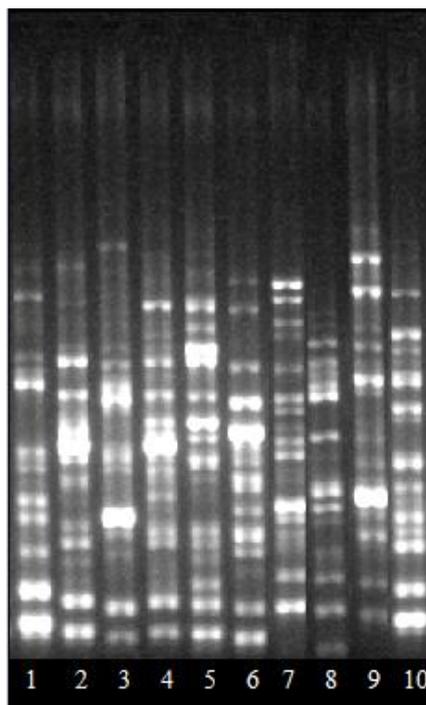


Figura 18. Padrão de amplificação pelo *primer* (GACA)₄ de ISSR em gel de agarose de dez genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don.

O resultado referente ao coeficiente de correlação cofenética entre as matrizes fenética e cofenética, foi igual a 0,92, significativo a 1% de probabilidade pelo teste de Mantel. A alta correlação indica que o dendrograma apresentou um bom ajuste entre as matrizes fenética e cofenética. De acordo com SOKAL e ROHLF (1962), valores de correlação cofenética superiores a 0,80 indicam um bom ajuste entre as matrizes originais de distância e a análise de agrupamento resultante.

Por meio do algoritmo de Kelley-Gardner-Sutcliffe (KELLEY et al. 1996) determinou-se, no dendrograma, o número de grupos ótimos. Com base no referido algoritmo, foi observado a formação de 3 grupos estatisticamente distintos (Figura 19). O grupo I formado por 01 dos 10 genótipos estudados (10%), grupo II por 02 genótipos (20%) e o grupo III, o maior grupo, por 07 genótipos (70%). No dendrograma pode-se observar que o grupo I (UFRRJ VIN029) foi o mais distante.

As dissimilaridades genéticas entre os 10 genótipos variaram de 0,568 a 0,774 e a distância genética média foi estimada em 0,722. A menor dissimilaridade ocorreu entre os genótipos UFRRJ VIN009 e UFRRJ VIN014, com distância de 0,568. Enquanto a máxima dissimilaridade (0,774) foi observada entre UFRRJ VIN029 com todos os demais genótipos. Lal et al. (2011) obtiveram distâncias genéticas que variaram de 0,352 - 0,743; 0,269 - 0,802 e 0,264 - 0,739, via marcadores ISSR, RAPD e SSR, respectivamente. Ao passo que, Shaw et al. (2009) relataram a menor dissimilaridade no valor de 0,030 e a maior igual a 0,600, através de marcadores RAPD.

Além da diversidade genética entre os grupos formados, também verificou-se a existência de diversidade intragrupos. Visto que, a distância genética média no grupo III foi de 0,684. O grupo II apresentou dissimilaridade de 0,695 entre os genótipos UFRRJ VIN050 e UFRRJ VIN055. Deste modo, tais resultados refletem a variabilidade genética entre os genótipos, tanto intra como intergrupos, o que indica uma ampla base genética.

Nesse sentido, fica evidenciado a considerável diversidade genética entre os 10 genótipos de vinca. Tal fato, é explicado por meio do nível de polimorfismo (90,14%), da

distância genética média e a existência de diversidade intragrupos. Apesar da boa distância média, o número de grupos *per se* indica o contrário. Porém, ainda há razoável distância dentro do grupo III, que concentrou o maior número de genótipos.

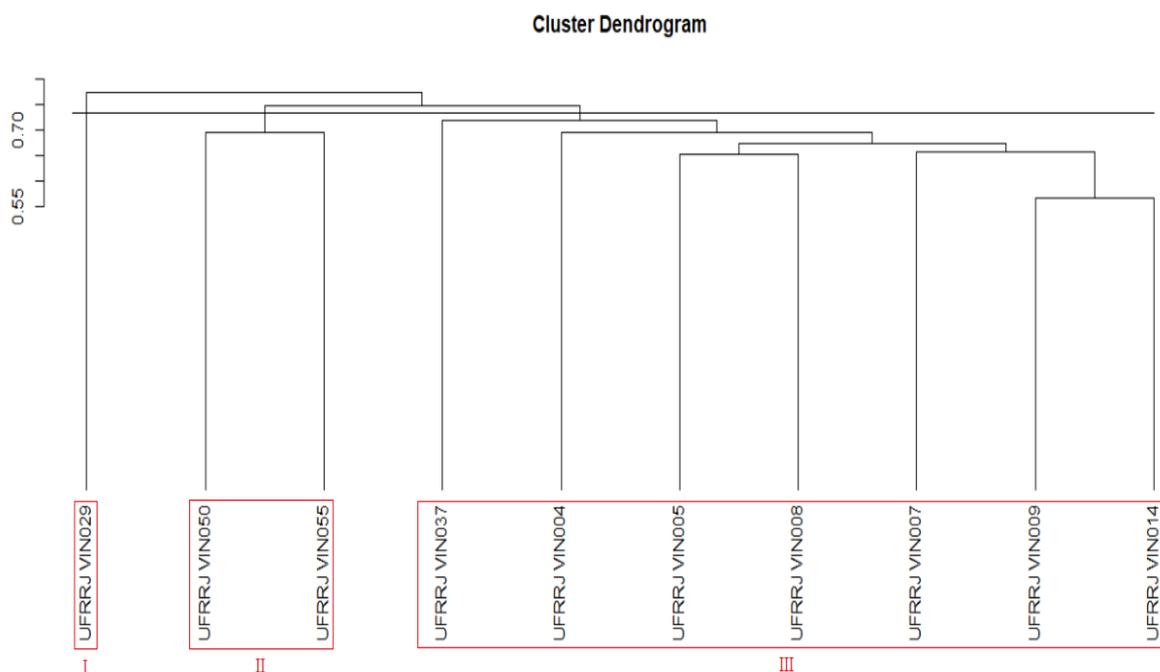


Figura 19. Dendrograma de dissimilaridade genética, obtido a partir da distância de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA, de dez genótipos de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don), pertencentes a Coleção de Germoplasma da UFRRJ.

Os resultados aqui obtidos indicam que os genótipos da espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don podem ter como modo de reprodução preferencial a autogamia e/ou alogamia. É certo que 80% dos genótipos analisados apresentaram modo de reprodução misto (autógamo facultativo/alógamo facultativo), conforme a classificação proposta por Cruden (1977) (Tabela 7). Assim sendo, em *Catharanthus roseus* [L.] G. Don, tanto a autogamia quanto a alogamia podem estar presentes em uma mesma planta. Diversas espécies apresentam modo de reprodução misto, como *Verbena stricta*, *Verbena hastata* e *Verbena urticifolia* (CRUDEN et al. 1990), *Tetracentron sinense* Oliv. (GAN et al. 2013), *Carica papaya* L., cultivar Tainung 01 (DAMASCENO JUNIOR et al. 2009), *Asplenium scolopendrium* (WUBS et al. 2010) e *Fumana hispidula* (CARRIÓ & GÜEMES, 2013). Espécies com modo de reprodução misto podem produzir frutos oriundos de autofecundação e/ou polinização cruzada em uma mesma planta (SCHOEN & BROWN, 1991). A explicação mais comum para a manutenção de sistemas mistos de reprodução é a hipótese de garantia reprodutiva exercida pela autofecundação, quando os polinizadores são escassos (CRUDEN & LYON, 1989; HOLSINGER, 1996).

A predominância do sistema de reprodução misto na maioria dos genótipos deste estudo é reforçada pela natureza histoquímica amilácea dos grãos de pólen analisados (Figura 12B). Uma vez que grãos de pólen amiláceos ocorrem em espécies autógamas e alógamas, cuja polinização pode ser realizada pelo vento, por lepidópteros ou por aves (Baker & Baker, 1979). A espécie *Catharanthus roseus* [L.] G. Don possui como agentes polinizadores as borboletas e mariposas (lepidópteros), adaptados a sua corola. Miyajima et al. (2004) relataram alguns lepidópteros que efetuaram a polinização da vinca, entre eles, *Papilio xuthus*, *Papilio protenor*, *Macroglossum stellatarum* e *Parnara guttata*. Estudos demonstraram que flores com tubos da

corola longos coevoluíram com polinizadores de probóscides longas (PAUW et al. 2009). Os lepidópteros são conhecidos por não fazerem qualquer uso nutricional de pólen. Quando os grãos de pólen são parte ou toda a recompensa recebida pelas abelhas, a seleção favoreceu grãos de pólen sem amido (rico em lipídio) e, quando a nutrição de insetos não está envolvida, favoreceu o pólen amiláceo (BAKER & BAKER, 1979).

Observou-se também, que, em menor frequência, há genótipos que foram autógamos ou alógamos. Neste caso, no mínimo, os resultados desta pesquisa apontaram para uma diversidade do modo de reprodução dos genótipos de vinca. Este foi o caso do genótipo UFRRJ VIN004 classificado como autógamo facultativo e do UFRRJ VIN007, classificado como alógamo facultativo. Porém, de acordo com Cruden (1977), não se pode descartar a ocorrência de alogamia em UFRRJ VIN004 e de autogamia em UFRRJ VIN007. No entanto, a frequência de alogamia e autogamia nos respectivos genótipos será reduzida.

Percebe-se na Tabela 8 que o genótipo UFRRJ VIN004, classificado como autógamo facultativo, apresentou um alto percentual de tubos polínicos no estigma de botões florais, em relação aos demais genótipos. Isso indica, neste genótipo, uma real possibilidade de cleistogamia. De acordo com Cruden (1977), as espécies autógamas facultativas tendem a se autofecundar antes ou durante a abertura das flores e os polinizadores têm acesso ao estigma receptivo após a autofecundação ter ocorrido. Já o UFRRJ VIN007, classificado como alógamo facultativo, mostrou-se altamente dependente da polinização aberta (alogamia). Na Tabela 8, observa-se para o UFRRJ VIN007 que, tanto em botões florais quanto em flores protegidas (flores na antese), não houve, sequer, a presença de grãos de pólen no estigma. Isto reforça a sua acentuada tendência a alogamia, que também é observada no genótipo UFRRJ VIN008.

A existência do modo de reprodução misto e dos genótipos UFRRJ VIN004 e UFRRJ VIN007 indicam diversidade quanto aos sistemas reprodutivos observados, embora tenha ocorrido predominância do sistema misto. Segundo Allard (1960), variedades dentro da mesma espécie podem apresentar grandes diferenças nas proporções de cruzamentos naturais, além disso a taxa de cruzamento pode ser influenciada pelo ambiente. Damasceno Junior et al. (2009), observaram sistemas reprodutivos distintos em duas cultivares de mamão. A cultivar Tainung 01 foi classificada com um sistema misto (autógama facultativa/alógama facultativa), ao passo que a cultivar Golden foi definida como autógama facultativa. Isso também foi observado em *Vaccinium vitis-idaea* (STEPHENS et al. 2012). Dessa forma, o modo de reprodução preferencial em algumas espécies não é absoluto e pode apresentar plasticidade.

Os resultados obtidos a partir de marcadores ISSR apontaram também para uma alta diversidade genética entre os genótipos analisados, ou seja, os genótipos utilizados na pesquisa são bem divergentes (Figura 19). Portanto, maiores podem ser as chances de identificar genótipos contendo os princípios ativos de interesse, vincristina e vimblastina. Além disso, a considerável diversidade genética também é interessante quando se pretende estudar a possibilidade de ocorrência de diferentes modos de reprodução em uma espécie. Em vista disso, os 10 genótipos foram suficientes para observar estratégias reprodutivas distintas.

Entre os genótipos analisados, 50% deles (UFRRJ VIN004, UFRRJ VIN009, UFRRJ VIN014, UFRRJ VIN029 e UFRRJ VIN037) apresentaram certo nível de cleistogamia (Tabela 8). Tal fato, reforça uma certa obrigatoriedade de ocorrência de autofecundação nestes genótipos, já que tubos polínicos foram detectados nos estigmas dos seus respectivos botões florais. Além disso, antes da abertura floral, os estigmas dos referidos genótipos estavam receptivos (Figura 17D) e as médias de viabilidade dos grãos de pólen mostraram-se elevadas (Tabela 10). Essas ocorrências indicam a possibilidade de cleistogamia.

As flores cleistogâmicas podem apresentar a vantagem da garantia reprodutiva, quando os polinizadores são raros ou ausentes e onde as condições ambientais são desfavoráveis (JAIN, 1976; CULLEY & KLOOSTER, 2007). Ademais, a depressão por endogamia possivelmente é baixa em espécies cleistogâmicas com altas taxas de autopolinização, pois os alelos deletérios

podem ser eliminados por gerações sucessivas de autofecundação (OAKLEY et al. 2007). No entanto, a cleistogamia pode levar a diminuição da variabilidade genética e aumento da deriva genética (CULLEY & KLOOSTER, 2007).

Essa mesma tendência de autofecundação também é notada nos genótipos UFRRJ VIN005, UFRRJ VIN050 e UFRRJ VIN055. Contudo, nestes três genótipos, provavelmente, a obrigatoriedade de autofecundação, ou taxa de autofecundação, é inferior à dos genótipos UFRRJ VIN004, UFRRJ VIN009, UFRRJ VIN014, UFRRJ VIN029 e UFRRJ VIN037. Isto decorre pelo fato da autogamia no UFRRJ VIN005, UFRRJ VIN050 e UFRRJ VIN055 não ser reforçada pela cleistogamia. Visto que, os tubos polínicos foram notados apenas nas flores em antese, e não nos botões florais (fechados). Apesar do reforço da autofecundação para o sucesso da polinização, nota-se na Tabela 8 que, na maioria dos genótipos acima citados, a autofecundação ocorreu em menos da metade dos botões florais e flores protegidas, exceto no UFRRJ VIN004, UFRRJ VIN005 e UFRRJ VIN055. Portanto, existiu uma predominância da alogamia na maioria dos genótipos analisados classificados como modo de reprodução misto. Esta tendência a alogamia pode explicar a alta diversidade genética obtida via marcadores ISSR. Em *Tetracentron sinense* Oliv., a alogamia também predominou no modo de reprodução misto e a autofecundação desempenhou um papel auxiliar na reprodução, quando as condições de polinização foram desfavoráveis, como mudança de condições ambientais, ou quando os polinizadores foram escassos (GAN et al. 2013).

De acordo com Charlesworth (2006), o sistema reprodutivo é um dos fatores mais importantes que influenciam a composição da estrutura genética das populações, bem como a evolução dos genomas. As populações alógamas transmitem apenas os seus alelos para as gerações seguintes, enquanto as autógamias, em estádios avançados de autogamia, transferem seus genótipos integralmente fixando-os em gerações através de autofecundações sucessivas. Os métodos de melhoramento aplicados a essas populações são, de maneira geral, diferentes, uma vez que o modo de reprodução preferencial de plantas autógamias e alógamas é distinto.

Outra diferença importante entre espécies autógamias e alógamas é o efeito da endogamia nas plantas de acasalamento ao acaso sobre a estrutura genética destas populações. Espécies alógamas tendem a apresentar efeitos da depressão por endogamia sobre os seus indivíduos. De modo geral, a depressão por endogamia tende a ser maior em espécies de polinização aberta ou com modo de reprodução misto do que naquelas com altas taxas de autofecundação (WINN et al. 2011).

As plantas alógamas em uma população em acasalamento ao acaso (panmixia) são altamente heterozigotas e tendem ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, desconsiderando-se eventos de seleção, deriva genética, migração e mutação, ou seja, sem fatores que afetam as frequências genotípicas e gênicas. Programas de melhoramento que utilizam em larga escala a produção de híbridos a partir de linhagens, lançam mão das autofecundações para se atingir um alto nível de homozigose. No entanto, a homozigose, em plantas alógamas, pode não ser o estado genético natural, sendo assim torna-se difícil a obtenção de linhagens endogâmicas (VENCOVSKY & BARRIGA, 1992).

Segundo Hallauer & Miranda Filho (1988), quando se trabalha com populações (alógamas) que apresentam depressão por endogamia, o alcance de um alto nível de homozigose em poucas gerações de autofecundações pode tornar-se uma desvantagem, uma vez que linhagens potencialmente úteis são eliminadas nas primeiras gerações como uma consequência da manifestação de genes letais e deletérios de grande efeito. Em suma, a ocorrência de endogamia em plantas alógamas pode resultar em aumento da frequência de homozigotos recessivos deletérios, que antes estavam encobertos nos *loci* em heterozigose. Tendo como efeito, na prática, a perda de vigor. Tal fato, pode ser verdadeiro nos genótipos de vinca com predominância da alogamia aqui analisados. Este é o caso dos genótipos UFRRJ VIN007 e UFRRJ VIN008. Nestes, tanto em botões florais quanto em flores na antese, não foi observado

a presença de grãos de pólen no estigma (Tabela 8), sugerindo um comportamento bastante alógamo.

Por outro lado, populações de plantas autóгамas exibem um aumento progressivo de homozigose genotípica com o avanço das autofecundações ao longo das gerações. Sendo assim, a frequência de *loci* heterozigotos deve ser progressivamente baixa, pois a cada geração de autofecundação a proporção esperada de indivíduos heterozigotos é reduzida pela metade, quando se considera apenas um loco. Isso resulta na formação de linhagens endogâmicas, um dos objetivos da maioria dos programas de melhoramento de plantas autóгамas. O genótipo UFRRJ VIN004, parece ser o mais indicado para tal, pois é aquele com certa obrigatoriedade de autofecundação, aliás, muito reforçada pela cleistogamia.

Segundo Allard (1960), a estrutura genética das populações alógamas permite melhor adaptação em face a mudanças de longo prazo no ambiente do que as autóгамas, que são geneticamente menos flexíveis. De acordo com este autor, as autóгамas se originam de plantas alógamas, uma vez que as autóгамas, em virtude da sua uniformidade acompanhada de homozigose, são capazes de grande adaptação imediata. Isso pode explicar o contexto das plantas cultivadas, muitas delas autóгамas, devido à grande importância que é dada à adaptação imediata nas condições de cultivo impostas.

Mesmo com a predominância da alogamia, alguns genótipos apresentaram tendência a uma obrigatoriedade de autofecundação devido a presença de cleistogamia, mesmo que em frequências pequenas. Sendo assim, tanto o desenvolvimento de híbridos quanto de linhagens endogâmicas nos genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don pode ser viável. Já que, há uma tendência de que o sistema misto prevaleça na espécie. Ademais, todos os genótipos de vinca analisados são autocompatíveis, uma vez que a polinização cruzada não foi reforçada por nenhum sistema autoincompatível (Tabela 9). Isso sugere que tais genótipos podem aceitar a autofecundação. No entanto, deve-se saber se a autofecundação natural ou artificial conduz a depressão por endogamia, especialmente nos genótipos com certo predomínio da alogamia. Isto não deve ser verdadeiro para os genótipos com certa obrigatoriedade de ocorrência de autofecundação em virtude da cleistogamia, como por exemplo no genótipo UFRRJ VIN004.

Em suma, pode-se inferir que os genótipos estudados de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don apresentaram modo de reprodução misto, reforçado pela natureza histoquímica amilácea dos grãos de pólen. Tais genótipos, de maneira geral, tenderam a alogamia. Todavia, alguns destes apresentaram tendência a uma obrigatoriedade de autofecundação devido a presença de cleistogamia, mesmo que em frequências pequenas. Na verdade, estes genótipos tenderam a taxas de polinização aberta maiores que as de autofecundação e, dessa forma, suas taxas gerais de polinização dependerão mais da alogamia do que da autogamia. Sendo assim, esta tendência a alogamia, constatada em 70% dos genótipos analisados, pode explicar a alta diversidade genética obtida via marcadores ISSR. Estudos relacionados a heteroestilia e de polinização são ainda necessários para elucidação das causas que levam a uma tendência maior ou menor de autogamia em sistemas mistos de reprodução.

9. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que 50% dos genótipos estudados foram cleistógamos. Contudo, as prováveis taxas de polinização aberta serão maiores que as de autofecundação. Tal fato, pode explicar a elevada diversidade genotípica observada. O modo de reprodução preferencial misto predomina entre os genótipos analisados, no entanto também existe tendência para a autogamia em UFRRJ VIN004, reforçada pela cleistogamia, e alogamia nos genótipos UFRRJ VIN007 e UFRRJ VIN008. Diante disso, percebe-se grande diversidade de estratégias reprodutivas em vinca, já que tanto a autofecundação quanto a alogamia podem estar presentes. Dessa forma,

em programas de melhoramento é possível o desenvolvimento de híbridos e linhagens endogâmicas nos genótipos de *Catharanthus roseus* [L.] G. Don aqui analisados.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELGADIR, H. A.; JOHNSON, S. D.; VAN STADEN, J. Pollen viability, pollen germination and pollen tube growth in the biofuel seed crop *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). **South African Journal of Botany**, v. 79, p. 132–139, 2012.
- AGARWAL, M.; SHRIVASTAVA, N.; PADH, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 1, p. 617-631, 2008.
- AHMED, A. A. M.; EL-HASSEN, G. M. Effect of water regime and cultivar on herbage yield and alkaloid content of *Catharanthus roseus*. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 23, n. 3, p. 350-6, 2001.
- ALEXANDER M. P. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. **Stain Technology**, v. 44, p. 117-122, 1969.
- ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. London: J. Wiley, p. 485, 1960.
- ALLORGE, L.; PHILLIPSON, P. B.; RAZAKAMALALA, R. *Catharanthus makayensis* L. Allorge, Phillipson & Razakamal. (Apocynaceae), a new species from Madagascar. **Candollea**, v. 70, n. 1, p. 61-66, 2015.
- ALVES, M. P. **Ocorrência de fungos fitopatogênicos em *Catharanthus roseus* (vinca) em Viçosa - MG: novos relatos**. 2016. 21 p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Universidade Federal de Viçosa - MG, 2016.
- ASKIN, A.; HEPAKSOY, S.; OZCAGIRAN, R. Investigations on the effects of gibberellic acid and boric acid on the germination of some sweet cherry pollens. **Ege Universite Ziraat Fakultesi Dergise**, v. 27, p. 105-116, 1990.
- BAKER, H. G.; BAKER, I. Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. **American Journal of Botany**, v. 66, p. 591–600, 1979.
- BANDEIRA, J. M.; THUROW, L. B.; PETERS, J. A.; RASEIRA, M. C. B.; BIANCHI, V. J. Caracterização fisiológica da compatibilidade reprodutiva de ameixeira japonesa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 860-867, 2011.
- BARRETT, S. C. H. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. In: Barret, S.C.H. (ed.). *Evolution and function of heterostyly*. **Springer-Verlag**, p. 1-29, 1992.
- BARRETT, S. C. H. The evolution of mating strategies in flowering plants. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 9, p. 335 – 341, 1998.
- BARRETT, S. C. H.; SHORE, J. S. New Insights on Heterostyly: Comparative Biology, Ecology and Genetics. In: Franklin-Tong, V.E. (ed.) *Self-incompatibility in flowering plants- evolution, diversity, and mechanisms*. **Springer-Verlag**, Berlin, Germany, p. 3-32, 2008.

BARIK, K.; SAO, S. Pharmaceutical Alkaloids from *Catharanthus roseus*, Detection and Mapping of Associated QTL. **International Journal of Green and Herbal Chemistry**, v. 4, n. 3, 2015.

BATES, D.; EASTMAN, A. Microtubule destabilising agents: far more than just antimetabolic anticancer drugs. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v, 83, n. 2, p. 255–268, 2017.

BAWA, K. S. Evolution of dioecy in flowering plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 11, p. 15-39, 1980.

BEAUMONT, M. A.; IBRAHIM, K. M.; BOURSOT, P.; BRUFORD, M. W. Measuring genetic distance. In: KARP A. et al. (ed.). **Molecular tools for screening biodiversity**. Chapman and Hall, London, p. 315-325, 1998.

BERED, F.; BARBOSA-NETO, J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 513-520, 1997.

BEUSELINCK, P.R.; STEINER, J.J. A proposed framework for identifying, quantifying and utilizing plant germoplasm resources. **Field Crop Research**, v.29, p. 261-272, 1992.

BIOVERSITY INTERNATIONAL. **Guidelines for the development of crop descriptor lists. Bioversity Technical Bulletin Series**. Bioversity International, Rome, Italy. p. 72, 2007.

BOKE, N. H. Development of perianth in *Vinca rosea* L. **American Journal of Botany**, v 35, p. 413–423, 1948.

BHATTACHARYA, A.; MANDAL, S. Stigma form and surface in relation to pollen-stigma interactions in *Butea monosperma* (Lamk.) Taub. and *Catharanthus roseus* (Linn.) G. Don. **Phytomorphology: An International Journal of Plant Morphology**, v. 53, n. 2, p. 179-185, 2003.

BHUTKAR, M. A.; BHISE, S. B. Comparative studies on antioxidant properties of *Catharanthus rosea* and *Catharanthus alba*. **International Journal of Pharm Tech Research**, v. 3, p. 1551–1556, 2011.

BORGES, L. A.; SOBRINHO, M. S.; LOPES, A. V. Phenology, pollination, and breeding system of the threatened tree *Caesalpinia echinata* Lam. (Fabaceae), and are view of studies on the reproductive biology in the genus. **Flora**, v. 204, p. 111–130, 2009.

BREVIS, P. A.; NESMITH, D. S.; WETZSTEIN, H. Y.; HAUSMAN, D. B. Production and Viability of Pollen and Pollen–Ovule Ratios in Four Rabbiteye Blueberry Cultivars. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 131, n. 2, p. 181–184, 2006.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, p. 177-86, 1999.

BROWN, A. H. D. Genetic characterization of plant mating systems. In: BROWN, A. H. D.; CLEGG, M. T.; KAHLER, A. L.; WEIR, B. S. (Ed.). **Plant populations genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Associates, p. 145-162, 1990.

- CARRIÓ, E.; GÜEMES, J. The role of a mixed mating system in the reproduction of a Mediterranean subshrub (*Fumana hispidula*, Cistaceae). **Journal of Plant Research**, v. 126, p. 33–40, 2013.
- CARVALHO, D. F.; SILVA, L. D. B.; FOLEGATTI, M. V.; COSTA, J. R.; CRUZ, F. A. Avaliação da evapotranspiração de referência na região de Seropédica-RJ, utilizando lisímetro de pesagem. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, v. 14, n. 2, p. 108-116, 2006.
- CASTRO, H.G.; SANTOS, G.R.; MOMENTÉ, V.G.; SILVA, D.J.H.; RIBEIRO JÚNIOR, J.I. Estudo da divergência genética por características morfológicas entre acessos de mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.) coletados no Estado do Tocantins em diferentes épocas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p. 24-29, 2011.
- CHARLESWORTH, D. Evolution of Plant Breeding Systems. **Current Biology**, v. 16, p. 726-735, 2006.
- CHAUDHARY, S.; SHARMA, V.; PRASAD, M. Characterization and genetic linkage mapping of the horticulturally importante mutation leafless inflorescence (LLI) in periwinkle *Catharanthus roseus*. **Scientia Horticulturae**, v. 129, n. 1, p. 142–153, 2011.
- CHAUDHARY, S.; PANDEY, R.; SHARMA, V.; TRIPATHI, B. N.; KUMAR, S. Detection and mapping of QTLs affecting contents of pharmaceutical alkaloids in leaf and root of *Catharanthus roseus*. **Agricultural Research**, v. 2, p. 9–23, 2013.
- CHOUTEAU, M.; BARABÉ, D.; GIBERNAU, M. Pollen-ovule ratios in some Neotropical Araceae and their putative significance. **Plant Systematics and Evolution**, v. 257, p. 147-157, 2006.
- COOK, S. A.; stanley, R. G. Tetrazolium chloride as indicator of pine pollen germinability. **Silvae Genetica**. v. 9, n. 5, p. 134-136, 1960.
- COLLINS, F.S.; BROOKS, L.D.; CHARKRAVARTI, A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. **Genome Research**, v. 8; p. 1229–1231, 1998.
- COLOMBO, C.; SECOND, G.; CHARRIER, A. Diversity within American cassava germplasm based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 189-199, 2000.
- CORREDOR-PRADO, J. P.; DE CONTI, D.; SEZERINO, A.; GUERRA, M. P.; ORTH, A. I. Biologia reprodutiva e ausência de frutificação de *Aloe saponaria* (Aiton) Haw. (Xanthorrhoeaceae) fora do local de origem. **Revista brasileira de plantas mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 713-721, 2015.
- COSTA, E. M. R. **Divergência genética entre linhagens africanas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) WALP.) Através de caracterização morfoagronômica e molecular**. 2010. 96 p. Dissertação (Melhoramento Genético de Plantas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010.

CRISPIM, J. G.; RÊGO, E. R.; RÊGO, M. M.; NASCIMENTO, N. F. F.; Barroso, P. A. Stigma receptivity and anther dehiscence in ornamental pepper. **Horticultura Brasileira**, v. 35, p. 609-612, 2017.

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

CRUDEN, R. W.; MILLER-WARD, S. Pollen-ovule ratio, pollen size, and the ratio of stigmatic area to the pollen-bearing area of the pollinator: an hypothesis. **Evolution**, v.35, p. 964-974, 1981.

CRUDEN, R. W.; LYON, D. L. Facultative xenogamy: examination of a mixed mating system. In **The Evolutionary Ecology of Plants**, ed. JH Bock, YB Linhart, p. 171– 207. Boulder, CO: Westview, 1989.

CRUDEN, R. W.; BAKER, K. K.; CULLINAN, T. E.; DISBROW, K. A.; DOUGLAS, K. L.; ERB, J. D.; KIRSTEN, K. J.; MALIK, M. L.; TURNER, E. A. The mating systems and pollination biology of three species of *Verbena* (Verbenaceae). **Journal of the Iowa Academy of Science**, v. 97, p. 178-183, 1990.

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

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

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: Editora UFV, p. 514, 2012.

CULLEY, T. M.; KLOOSTER, M. R. The cleistogamous breeding system: a review of its frequency, evolution, and ecology in angiosperms. **Botanical Review**, v. 73, n. 1, p. 1–30, 2007.

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

DAFNI, A.; MAUÉS, M. M. A rapid and simple procedure to determine stigmareceptivity. **Sexual Plant Reproduction**, v. 11, p. 177–180, 1998.

DAFNI, A.; FIRMAGE, D. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. **Plant Systematics and Evolution**, v. 222, p. 113-132, 2000.

DALLA NORA, G.; TEDESCO, S. B.; PASTORI, T.; FRESCURA, V. Dal-Souto.; RIBEIRO, N. D.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D.; LOPES, S. J.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Meiotic behavior and pollinic viability in bean cultivars. **Biocell**, v. 38, n. 1-3, p. 33-38, 2014.

DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; SILVA F. F.; VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G. Comportamento floral de Híbridos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) avaliados no verão e primavera. **Ceres**, v. 55, p. 310-316, 2008.

DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; DA SILVA, F. F.; SOUZA, M. M.; NICOLI, R. G. Preferential reproduction mode of hermaphrodite papaya plant (*Carica papaya* L.; *Caricaceae*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 182-189, 2009.

DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; FREITAS-NETO, M.; PEREIRA, M. G. Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. **Caryologia**, v. 63, n. 1, p. 229-236, 2010.

DANNER, M. A.; CITADIN, I.; SASSO, S. A. Z.; SACHET, M. R.; MALAGI, G. Modo de reprodução e viabilidade de pólen de três espécies de jabuticabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, p. 345-342, 2011.

DAS, S.; SHARANGI, A. B. Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus* L.): Diverse medicinal and therapeutic benefits to humankind. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 5, p. 1695-1701, 2017.

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

DWIVEDI S.; SINGH, M.; SINGH, A. P.; SHARMA, S.; UNİYAL, G. C.; KUMAR, S. Genetic variability, heritability and genetic advance for alkaloid yield attributing traits in 26 genotypes of periwinkle *Catharanthus roseus*. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 21, p. 320–324, 1999.

EDLUND, A. F.; SAWANSON, R.; PREUSS, D. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. **The Plant Cell**, v. 16, p. 84-97, 2004.

EL-SAYED, M.; VERPOORTE, R. Influence of Growth Retardants on Serpentine Accumulation in *Catharanthus roseus* Cell Suspension Cultures. **American Journal of Plant Physiology**, v. 2, p. 373-377, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (Embrapa). Banco de Dados - Fungos Relatados em Plantas no Brasil. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/micbanco01a.asp>. Acesso em: 08/03/2018.

ETCHEVERRY, A.V.; ALEMÁN, M. M.; FIGUEROA-FLEMING, T.; LÓPEZ-SPAHR, D.; GÓMEZ, C.A.; YÁÑEZ, C.; FIGUEROA-CASTRO, D. M.; ORTEGA-BAES, P. Pollen:Ovule ratio and its relationship with other floral traits in Papilionoideae (Leguminosae): an evaluation with argentine species. **Plant Biology**, v. 14, p. 171-178, 2012.

FAIFE-CABRERA, M.; FERRERO, V.; NAVARRO, L. Relationship between herkogamy, incompatibility and reciprocity with pollen–ovule ratios in *Melochia* (Malvaceae). **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, p. 1-10, 2016.

FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Tradução de M.A. SILVA; J.C. SILVA. Viçosa: UFV, p. 279, 1987.

FANG, X.; TURNER, N. C.; YAN, G.; LI, F.; SIDDIQUE, K. H. M. Flower numbers, pod production, pollen viability, and pistil function are reduced and flower and pod abortion increased in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought. **Journal of experimental botany**, v, 61, p. 335-345, 2009.

FAROOQUI, A. A.; SREERAMU, B. S. **Cultivation of Medicinal and Aromatic Crops**. University Press, Hyderabad, India, p. 308–312, 2001.

FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E.; MCCRAY, E. B. (2015). **Fungal Databases, Systematic Botany and Mycology Laboratory**, ARS, USDA. Disponível em: <http://nt.arsgrin.gov/fungalatabases/>. Acesso em: 20/12/2017.

FERREIRA, F. M. **Diversidade em populações simuladas com base em locus multialélicos**. 2007. 177 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, MG, 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, p. 220, 1998.

FERREIRA, Manuela Martins. **Crescimento, alocação de biomassa e abordagem fitoquímica de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don em função da adubação orgânica e época de colheita**. 2003. 63 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2003.

FERREIRA, M. A. J. da F.; QUEIRÓZ, M. A.; VENCOVSKY, R.; BRAZ, L. T.; VIEIRA, M. L. C. **Implicações da Expressão Sexual e do sistema reprodutivo de melancia em programa de pré-melhoramento**. Brasília: CENARGEN - Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 65. p. 24, 2004.

FETSCHER, A. E. Resolution of male-female conflict in an hermaphroditic flower. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 268, n. 1466, p. 525–529, 2001.

FLORA OF CHINA EDITORIAL COMMITTEE. Flora of China. **Missouri Botanical Garden and Harvard University Herbaria**, St. Louis, Missouri and Cambridge, Massachusetts, USA, 2015.

FRANKEL, R. & GALUN, E. **Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding**. New York, Springer-verlag, p. 70-3, 1977.

FRANZON, R. C.; CORRÊA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. *In vitro* pollen germination of feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, p. 229-233, 2005.

FREITAS, L. B.; BERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Porto Alegre: UFRGS, p. 463, 2003.

FRISCHKNECHT, P. M; BATTIG, M; BAUMANN, T. W. Effect of drought and wounding stress on indole alkaloid formation in *Catharanthus roseus*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 3, p. 707-710, 1987.

FRYXELL, P. A. Mode of reproduction of higher plants. **The Botanical Review**, v. 23, n. 3, p. 135-233, 1957.

GALETTA, G. J. Pollen and Seed Management. In: MOORE, J.N.; JANIK, J. (Ed.). **Methods in fruit Breeding**. Indiana: Purdue University Press, p. 23-47, 1983.

GALLONI, M.; PODDA, L.; VIVARELLI, D.; CRISTOFOLINI, G. Pollen presentation, pollen-ovule ratios, and other reproductive traits in Mediterranean Legumes (Fam. Fabaceae - Subfam. Faboideae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 266, p. 147-164, 2007.

GAN, X.; CAO, L.; ZHANG, X.; LI, H. Floral biology, breeding system and pollination ecology of an endangered tree *Tetracentron sinense* Oliv. (Trochodendraceae). **Botanical Studies**, p. 54-50, 2013.

GAO, C.; YUAN, D.; YANG, Y.; WANG, B.; LIU, D.; ZOU, F. Pollen Tube Growth and Double Fertilization in *Camellia oleifera*. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 140, n. 1, p. 12-18, 2015.

GARCÍA, C. C. Pollen starch reserves in tomato relatives: Ecophysiological implications. **Grana**, v. 46, p. 13-19, 2007.

GARCIA, M. T. A.; MIGUEZ, M. B.; GOTTSBERGUER, G. Pollen: ovule ratio and its relationship with other reproductive traits in some *Passiflora* species (Passifloraceae). **Anales Del Jardín Botánico de Madrid**, v. 71, p. 1-8, 2014.

GUPTA, R. Periwinkle-produces anticancer drug. **Indian Farming**, v. 7, p. 11-13, 1977.

GUPTA, P.K.; ROY, J.K.; PRASAD, M. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. **Current Science**, v. 80, n. 4, p. 4524-535, 2001.

GUPTA, S.; PANDEY-RAI S.; SRIVASTAVA, S.; NAITHANI, S. C.; PRASAD, M.; KUMAR, S. Construction of genetic linkage map of the medicinal and ornamental plant *Catharanthus roseus*. **Journal of Genetics**, v. 86, p. 259-268, 2007.

GHOLAMHOSSEINPOUR, Z.; HEMATI, K.; DORODIAN, H.; BASHIR-SADR, Z. Effect of nitrogen fertilizer on yield and amount of alkaloids in periwinkle and determination of vinblastine and vincristine by HPLC and TLC. **Plant Sciences Research**, v. 3, p. 4-9, 2011.

HALLAUER, A. R.; MIRANDA FILHO, J. B. de. **Quantitative genetics in maize breeding**. 2nd ed. Ames: Iowa State University Press, p. 468, 1988.

HARLAN, J. R. **Crops and Man**. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, p. 295, 1975.

HASSAN, R. A.; HABIB, A. A.; EL-DIN, E. Effect of nitrogen and potassium fertilization on growth, yield and alkaloidal content of periwinkle (*Catharanthus roseus* G. Don). **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, Egypt, v. 3, p. 24-26, 2009.

- HAWKES, J. G. **The diversity of crop plants**. Harvard University Press, Cambridge, Mass, p.184, 1983.
- HEGDE, D. M. Effect of level and time of nitrogen application on growth and productivity of periwinkle, *Catharanthus roseus*. **Herba Hungarica**, v. 25, p. 107–114, 1986.
- HERRERA, S.; LORA, J.; HORMAZA, J.I.; HERRERO, M.; RODRIGO, J. Optimizing Production in the New Generation of Apricot Cultivars: Self-incompatibility, S-RNase Allele Identification, and Incompatibility Group Assignment. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-12, 2018.
- HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Stain Technology**, v. 45, p. 115-120, 1970.
- HESLOP-HARRISON, Y.; SHIVANNA, K. R. The receptive surface of the Angiosperm stigma. **Annals of Botany**, v. 41, p. 1233–1258, 1977.
- HESLOP-HARRISON, J.; SHIVANNA, K. R. The evaluation of pollen quality, and a further appraisal of fluorochromatic (FCR) test procedure. **Theoretical and applied Genetics**, v. 67, n. 4, p. 367-375, 1984.
- HESLOP-HARRISON, J. S. The angiosperm stigma. In: Cresti, M., Tiezzi, A. (Eds.), **Sexual Plant Reproduction**. Springer-Verlag, Berlin, p. 59–68, 1992.
- HOEKSTRA, F. A.; BRUINSMA, J. Respiration and vitality of binucleate and trinucleate pollen. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 34, p. 221-225, 1975.
- HOKCHED, O.; RAMÍREZ, N. Breeding systems in species of Melastomataceae in Gran Sabana (Bolívar State, Venezuela). **Acta Botánica Venezolánica**, 31: 387-408, 2008.
- HOLSINGER, K. E. Pollination biology and the evolution of mating systems in flowering plants. **Evolutionary biology**, n. 29, p. 107–149, 1996.
- HORNER, H. T.; PALMER, R. G. Mechanisms of genetic male sterility. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 6, p. 1527-1535, 1995.
- HUANG, Z.; ZHU, J.; MU, X.; LIN, J. Pollen dispersion, pollen viability and pistil receptivity in *Leymus chinensis*. **Annals of Botany**, v. 93, p. 295-301, 2004.
- HU, J.; VICK, B.A. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Molecular Biology Reporter**, n. 21, p. 289-294, 2003.
- IBRAHIM, M.M.; ABOU EL-NASR, T.H.S.; ABDEL-SAMEA, N. S.; ABOUD, K.A. Efficiency of RAPD and ISSR Markers in Assessment of Genetic Diversity in Some *Catharanthus roseus* L. Cultivars Grown in Egypt. **World Applied Sciences Journal**, v. 26, n. 11, p. 1407-1415, 2013.

IDREES, M.; NAEEM, M.; KHAN, M. M. A. The superiority of cv 'rosea' over cv 'alba' of periwinkle (*Catharanthus roseus* L.) in alkaloid production and other physiological attributes. **Turkish Journal of Biology**, v. 34, p. 81-88, 2010.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesAutomaticas>. Acesso em: 25/03/2019.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles**. v. 44, p. 223–270, 1908.

JAIN, S. K. The evolution of inbreeding in plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 7, p. 469-495, 1976.

JANA, B. K.; VARGHESE, B. Effect of mineral nutrition on growth and alkaloid content of *Catharanthus roseus*. **Indian Agriculture**, v. 40, p. 93–99, 1996.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw-Hill Book, 1940.

JUNAID, A.; KHAN, S. H.; SIDDIQUI, Z. H.; FATIMA, Z.; MAQSOOD, M.; BHAT, MA.; NASIM, A. S.; ILAH, A.; AHMAD, I. Z.; KHAN, A. S.; MUJIB, A.; SHARMA, M. P. *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. An important drug: it's applications and production. **Pharmacie Globale: Int J Compr Pharm**, v. 1, p. 1–16, 2010.

JURGENS, A.; WITT, T.; GOTTSBERGER, G. Pollen grain numbers, ovule numbers and pollen-ovule ratios in Caryophylloideae: correlation with breeding system, pollination, life form, style number and sexual system. **Sexual Plant Reproduction**, v. 14 p. 279-289, 2002.

KALINGANIRE, A.; Harwood, C. E.; Slee, M. U.; Simons, A. J. Floral structure, stigma receptivity and pollen viability in relation to protandry and self-incompatibility in silky oak (*Grevillea robusta* A. Cunn.). **Annals of Botany**, v. 86, n. 1, p. 133-148, 2000.

KARAKAYA, D. Effects of inflorescence on pollen viability and morphology of Strawberry (*Fragaria vesca* L.). **Journal of Science and Technology**, v. 1, p. 43-47, 2011.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. **Techniques for pollinations biologists**. Niwot, Colorado: University press of Colorado. p. 579, 1993.

KELLEY, L. A.; GARDNER, S. P.; SUTCLIFFE, M. J. An automated approach for clustering an ensemble of NMR derived protein structures into conformationally-related subfamilies. **Protein Engineering**, v. 9, p. 1063-1065, 1996.

KNUTH, P. **Handbook of Flower Pollination**, vol. III, Oxford: Clarendon Press, 1909.

KÖLLIKER, R. Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for white clover (*Trifolium repens* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, n. 2-3, p. 416-24, 2001.

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

KULKARNI, R. N.; BASKARAN, K. From Herkogamy to Cleistogamy – development of cleistogamy in periwinkle. **Journal of Heredity**, v. 104, p. 140–148, 2013.

KULKARNI, R. N.; BASKARAN, K.; JHANG, T. Breeding medicinal plant, periwinkle [*Catharanthus roseus* (L) G. Don]: a review. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 14, n. 4, p. 283-302, 2016.

KULKARNI, R. N. Evidence for phenotypic assortative mating for flower colour in periwinkle. **Plant Breeding**, v. 118, n. 6, p. 561–564, 1999.

KULKARNI, R. N.; SREEVALLI, Y.; BASKARAN, K. Allelic genes at two loci govern different mechanisms of intraflower self-pollination in self-pollinating strains of periwinkle. **Journal of Heredity**, v. 96, n. 1, p. 71–77, 2004.

KULKARNI, R. N.; SREEVALLI, Y.; BASKARAN, K.; KUMAR S. The mechanism and inheritance of intraflower self-pollination in self-pollinating strains of periwinkle. **Plant Breeding**, v. 120, n. 3, p. 247–250, 2001.

KULKARNI, R. N, SREEVALLI, Y, BASKARAN, K. Allelic genes at two loci govern different mechanisms of intraflower self-pollination in self-pollinating strains of periwinkle. **Journal of Heredity**, v. 95, p. 71–77, 2005a.

LACERDA, D. R. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, v.3, n.2, p.87-92, 2002.

LAL, S.; MISTRY, K. N.; SHAH, S. D.; THAKER, R.; VAIDYA, P. B. Genetic diversity assessment in nine cultivars of *Catharanthus roseus* from Central Gujarat (India) through RAPD, ISSR and SSR markers. **Journal of research in Biology**, v. 8, p. 667-675, 2011.

LATA, B. Cultivation, mineral nutrition and seed production of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don in the temperate climate zone. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 2-3, p. 403-411, 2007.

LEVY, A.; MILO J.; ASHRI, A.; PALEVITCH, D. Heterosis and correlation analysis of the vegetative components and ajmalicine content in the roots of the medicinal plant – *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Euphytica**, v. 32, p. 557–564, 1983.

LEWIS, D.; JONES D. A. **The genetics of heterostyly**. In: Barrett SCH (ed) Evolution and Function of Heterostyly. Springer-Verlag: New York, p. 129–150, 1992.

LIMA, D. C.; G. T.; DOS REIS, G. B.; TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C.; ABREU, A. F.B. A Implications of mitotic and meiotic irregularities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 2, 2016.

LLOYD, D. G.; WEBB, C. J. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy of pollen and stigmas in angiosperms. **New Zealand Journal of Botany**, v. 24, p. 135–162, 1986.

LÓPEZ, J.; RODRIGUEZ-RIANÑO, T.; ORTEGA-OLIVENCIA, A.; DEVESA, J. A.; RUIZ, T. Pollination mechanisms and pollen-ovule ratios in some *Genisteeae* (*Fabaceae*) from Southwestern Europe. **Plant Systematics and Evolution**, v. 216, p. 23-47, 1999.

LÖRZ, H.; WENZEL, G. **Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement**. Springer, New York, NY, USA, 2005.

MACIEL, S. C.; SILVA, F. S.; REIS, M.S.; JADÃO, A.S.; ROSA, D. D.; GIAMPAN, J. S.; KITAJIMA, E. W.; REZENDE, J. A. M.; CAMARGO, L. E. A. Characterization of a new potyvirus causing mosaic and flower variegation in *Catharanthus roseus* in Brazil. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 6, p. 687-690, 2011.

MAGNOTTA, M.; MURATA, J.; CHEN, J.; DE LUCA, V. Identification of a low vindoline accumulating cultivar of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don by alkaloid and enzymatic profiling. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1758–1764, 2006.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v. 27, n. 2, p. 209-202, 1967.

MAITI, S.; CHANDRA, R.; GEETHA, K. A.; MANDAL. Production technology of some important medicinal and aromatic crops developed under the all India coordinated research project. **Indian Journal Arecanut Spices Medicinal Plants**, v. 2, n. 3, p. 88–98, 2000.

MARCELLÁN, O. N.; CAMADRO, E. L. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. **Scientia Horticulturae**, v. 67, p. 101-104, 1996.

MARTINS, K.C., PEREIRA, T.N.S., SOUZA, S.A.M., RODRIGUES, R., AMARAL JUNIOR, A. T. Crossability and evaluation of incompatibility barriers in crosses between *Capsicum* species. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 15, p. 139-145, 2015.

MICHALSKI, S. G.; DURKA, W. Pollination mode and life form strongly affect the relation between mating system and pollen to ovule ratios. **New Phytologist**, v. 183, p. 470–479, 2009.

MILACH, S. C. K. **Marcadores Moleculares em plantas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 17-28, 1998.

MILATOVIĆ, D.; NIKOLIĆ, D.; Radović, A.; Krška, B. Fluorescence microscopy as a tool for determining self-incompatibility in apricot cultivars. **Acta Horticulturae**, p. 7-13, 2018.

MILO, J.; LEVY, A.; AKAVIA, N.; ASHRI, A.; PALEVITCH, D. Inheritance of corolla colour and anthocyanin pigments in periwinkle *Catharanthus roseus* (L) G. Don. **Zeitschrift für Pflanzenzüchtung**, v. 95, p. 352–360, 1985.

MIONE, T.; ANDERSON G. J. Pollen-Ovule Ratios and Breeding System Evolution in Solanum Section Basarthrum (Solanaceae). **American Journal of Botany**, v. 79, n. 3, p. 279-287, 1992.

MIRANDA, P. A., CLEMENT, C. R. Germination and storage of pejibaye (*Bactris gasipaes*) Palmae pollen. **Revista de Biologia Tropical**, v. 38, p. 29-33, 1990.

- MISHRA, P.; UNIYAL, G. C.; SHARMA, S.; KUMAR S. Pattern of diversity for morphological and alkaloid yield related traits among the periwinkle *Catharanthus roseus* accessions collected from in and around Indian subcontinent **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 48, n. 3, p. 273-286, 2001.
- MIYAJIMA, D. Pollination and seed set in vinca [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 771-775, 2004.
- MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais**. 8a ed., São Paulo, p.141, 1994.
- MOHAMMADI, S. A.; PRASANNA, B. M. Analysis of genetic diversity in crop plants: salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, v. 43, p. 1235-1248, 2003.
- MULLIS, K.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods of Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.
- MUNHOZ, M.; PINTO DA LUZ, C. F., FILHO, P. E. M.; BARTH, O. M.; REINERT, F. Viabilidade polínica de *Carica papaya* L.: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 2, p. 209-214, 2008.
- NAEEM, M.; AFTAB, T.; KHA, M. A. **Catharanthus roseus: Current Research and Future Prospects**. 1st ed, Label, Springer, p. 412, 2017.
- NARKIEWICZ, M.; SADOWSKA, A. Possibility of cultivation of rosy periwinkle (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) for seed production under conditions of Poland. **Biuletyn IHAR**, v. 177, p. 179–184, 1991.
- NEJAT, N.; VALDIANI, A.; CAHILL, D.; TAN Yee-How; MAZIAH, M.; ABIRI R. Ornamental Exterior versus Therapeutic Interior of Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*): The Two Faces of a Versatile Herb. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1-19, 2015.
- NMPB. **Agro-techniques of Selected Medicinal Plants (vol 1)**. National Medicinal Plants Board, Department of AYUSH, Ministry of Health and Family Welfare, Government of India, p. 111, 2014.
- NUNES, J. C. O.; DANTAS, A. C. M.; PEDROTTI, E. L.; ORTH, A. I.; GUERRA, M. P. Germinação de pólen *in vitro* e receptividade do estigma em macieira cvs. Fuji e Golden Delicious. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 1, p. 35 - 39, 2001.
- NUNES, R. de C.; BUSTAMANTE, F. de O.; TECHIO, V. H.; MITTELMANN A. Morphology and pollen viability of *Lolium multiflorum* Lam. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 2, p. 180-188, 2012.
- OAKLEY, C. G.; MORIUCHI, K. S.; WINN, A. A. The maintenance of outcrossing in predominantly selfing species: ideas and evidence from cleistogamous species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 38, p. 437–457, 2007.
- OLIVEIRA, M. S. P.; MAUÉS, M. M.; KALUME, M. A. de A. Viabilidade de pólen *in vivo* e *in vitro* em genótipos de açazeiro. **Acta Botânica Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 27-33, 2001.

OMS - Organização Mundial de Saúde. OMS: câncer mata 8,8 milhões de pessoas anualmente no mundo. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/>> Acesso em: 20/07/2018.

ORAGUZIE, NC, et al, Association Mapping in Plants. New York, USA: **Springer**, v. IX, p. 277, 2007.

PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 997–1002, 2000.

PAGLIARINI, M. S.; POZZOBON, M. T. **Meiose em vegetais: um foque para caracterização de germoplasma**. In: CURSO DE CITOGENÉTICA APLICADO A RECURSOS VEGETAIS, 2., 2004, Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 37-39, 2005 (Documento, 154).

PAREEK, S. K.; MAHESHWARI, M. L.; GUPTA, R. Cultivation of periwinkle in North India. **Indian Journal of Horticulture**, v. 30, n. 3, p. 9–12, 1985.

PATERSON, A. H.; TANKSLEY, S. D.; SORRELLS, M. E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, v. 46, p. 39-90, 1991b.

PAUW, A.; STOFBERG, J.; WATERMAN, R. J. Flies and flowers in Darwin's race. **Evolution**, v. 63, p. 268–279, 2009.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry, theoretical and applied**. 2 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. 594p, 1953.

PHILBRICK, T.; VOMELA, M.; NOVELO, A. R. Preanthesis cleistogamy in the genus *Podostemum* (Podostemaceae). **Rhodora**, v. 108, n. 935, p. 195-202, 2006.

PLAIZIER, A. C. A revision of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae). **Mededelingen Landbouwhogeschool**, v. 81, n. 9, p. 1–12, 1981.

PRIMO, L. M.; MACHADO, I. C. A new case of late-acting self-incompatibility in *Capparis* L. (Brassicaceae): *C. jacobinae* Moric. ex Eichler, an endemic andromonoecious species of the Caatinga, Pernambuco State, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 3, p. 764-768, 2009.

PROTA. **Plant Resources of Tropical Africa. African Ornamentals. Proposals and Examples**. Wageningen, The Netherlands: PROTA Foundation; 2015.

RAJESWARA RAO, B. R.; SINGH, M. Effect of NPK fertilizers and spacing on periwinkle (*Catharanthus roseus*) under irrigated and rained conditions. **Herba Hungarica**, v. 29, p. 1–2, 1990.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 4. ed. Lavras: UFLA, p. 463, 2008.

RAMOS, D. P.; CASTRO, A. F.; CAMARGO, M. N. Levantamento detalhado de solos da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Série Agronomia, Brasília, v. 8, n. 1, p. 1-27, 1973.

R DEVELOPMENT CORE TEAM (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011. Disponível em: <http://www.r-project.org/>.

REDDY, M.P. et al. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.

REIS, A.; HENRIQUE, I. M. *Phytophthora nicotianae* e *Rhizoctonia solani*: dois novos patógenos da vinca no Brasil. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças. **Embrapa Hortaliças. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 30, p. 19, 2007.

RODRIGUEZ-RIANO, T.; DAFNI, A. A new procedure to assess pollen viability. **Sexual Plant Reproduction**, v. 12, p. 241-244, 2000.

ROEPKE, J.; WU, M.; SALIM, V.; THAMM, A. M. K.; MURATA, J.; PLOSS, K.; BOLAND, W.; DE LUCA, V. Vinca drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 15287–15292, 2010.

ROSS, I. A. **Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses**. Totowa, New Jersey, p. 623, 1999.

RUDD, S. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences. **Trends Plant Science**, v. 8, n. 7, p. 321-329, 2003.

SAADEDIN, S. M. K. Genetic diversity and alkaloids profile evaluation of *Catharanthus roseus* L. based on RAPD molecular markers and RP- HPLC analysis. **Pakistan Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 541-551, 2018.

SADOWSKA, A.; OBIDOWSKA, G.; SZACHO-GUCHOWICZ, M. Effect of NPK fertilization upon production of crude material and alkaloid content of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don). **Biuletyn IHAR**, v. 170, p. 55–63, 1989.

SALOMÃO, A. N. **Manual de curadores de germoplasma – Vegetal: Glossário**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, p. 326, 2010.

SANTANA, J. G. S.; NASCIMENTO, A. L. S.; COSTA, T. S.; ALMEIDA, T. M. B.; RABBANI, A. R. C.; SILVA, A. V. C. Estimation of genetic diversity in a natural population of Cambuí tree (*Myrciaria tenella* O. Berg) using ISSR markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 4, p. 1-11, 2016.

SENBAGALAKSHMI, P.; RAO, M.V.; SENTHIL KUMAR, T. In Vitro Studies, Biosynthesis of Secondary Metabolites and Pharmacological Utility of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don.: A Review. In: Naeem M., Aftab T., Khan M. (eds) *Catharanthus roseus*. **Springer**, p. 153-199, 2017.

SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; DALL'AGNOL M. Auto-incompatibilidade em plantas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 1083-1090, 2002.

SCHOEN, D. J.; BROWN, A. H. D. Whole and partflower self-pollination in *Glycine clandestine* and *G. argyrea* and the evolution of autogamy. **Evolution**, n. 45, p. 1651–1664, 1991.

SEABRA, P. V.; ALEXANDRE, M. A. V.; RIVAS, E. B.; DUARTE, L. M. L. (1999). Occurrence of a Potyvirus in *Catharanthus roseus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, p. 116, 1999.

SEVESTRE-RIGOUZZO, M.; NEF-CAMPA, C.; GHESQUIERE, A.; CHRESTIN, H. Genetic diversity and alkaloid production in *Catharanthus roseus*, *C. trichophyllus* and their hybrids. **Euphytica**, v. 66, p. 151–159, 1993.

SHAW, R. K.; ACHARYA, L.; MUKHERJEE, A. K. Assessment of genetic diversity in a highly valuable medicinal plant *Catharanthus roseus* using molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, p. 52-59, 2009.

SHARMA, V.; CHAUDHARY, S.; SRIVASTAVA, S.; PANDEY, R.; KUMAR, S. Characterization of variation and quantitative trait loci related to terpenoid indole alkaloid yield in a recombinant inbred line mapping population of *Catharanthus roseus*. **Journal of Genetics**, v. 91, p. 49–69, 2012.

SHIVANNA, K. R. Pollen–pistil interaction and fertilization. In: **Pollen biology and biotechnology**. Enfield, NH: Science Publisher Inc., 117, 2003.

SHOKEEN, B.; CHOUDHARY, S.; SETHY, N. K.; BHATIA, S. Development of SSR and gene-targeted markers for construction of a framework linkage map of *Catharanthus roseus*. **Annals of Botany**, v. 108, p. 321–336, 2011.

SILVA, R. M. de; GERHARD BANDEL, M. I. F. F.; MARTINS, P. S. Biologia Reprodutiva de Etnovarietades de Mandioca. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 1, p. 101-107, 2001.

SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. **A statistical method for evaluating systematic relationships**. **Science Bulletin**. v. 38, p. 1409–1438, 1958.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. James. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, n. 2, p. 33-40, 1962.

SOUZA, D. C. L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n.3, 2015.

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

SREEVALLI, Y. **Inheritance of some morphological, floral, reproductive and economically important traits in the medicinal plant, periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]**. Ph.D. Thesis, Department of Botany, Bangalore, India, 2002.

SREEVALLI, Y.; BASKARAN, K.; KULKARNI, R. N.; KUMAR, S. Further evidence for the absence of automatic and intraflower self-pollination in periwinkle. **Current Science**, v. 79, n. 12, p. 1648–1649, 2000.

SREEVALLI, Y.; KULKARNI, R. N.; BASKARAN, K.; R. CHANDRASHEKARA, S. Increasing the content of leaf and root alkaloids of high alkaloid content mutants of periwinkle through nitrogen fertilization. **Industrial Crops and Products**, v. 19, n. 2, p. 191–195, 2004.

SREEVALLI, Y.; KULKARNI, R. N.; BASKARAN, K. Inheritance of flower color in periwinkle: orange-red corolla and white eye. **Journal of Heredity**, v. 93, n. 1, p. 55-58, 2002.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. Pollen: biology, biochemistry and management. New York: **Springer - Verlag**, p. 172, 1974.

STEPHENS, D. T.; LEVESQUE, D. E.; DAVIS, A. R. Pollen-ovule ratios in seven species of *Vaccinium* (Ericaceae) and stamen structure in *Vaccinium myrtilloides* and *Vaccinium vitis-idaea*. **Botany**, v. 90, p. 599–614, 2012.

TANGMITCHAROEN, S.; OWENS, J. N. Pollen Viability and Pollen-tube Growth Following Controlled Pollination and their Relation to Low Fruit Production in Teak (*Tectona grandis* Linn, f.). **Annals of Botany**, v. 80, p. 401-410, 1997.

TANKSLEY, S. D.; YOUNG, N. D.; PATERSON, A. H., et al. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biotechnology**, v. 7, p. 257-264, 1989.

TAYLOR, L. P.; HEPLER, P. K. Pollen germination and tube growth. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 460-491, 1997.

TEBET, M. S.; Dematte MESP, BASTOS, J. K.; SARTI, S. J.; Churata Masca MGC. Growth of *Catharanthus roseus* and foliar concentration of vicristine alkaloid as affected by nitrogen fertilization, illumination and plant age). **Científica**, v. 24, n. 2, p. 407–418, 1996.

THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R. K.; GRANER, A.; 106(3):411-422., E. E. D. F. T. D. A. C. O. G.-D. S.-M. I. B. H. V. L. T. A. G. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, p. 411-422, 2003.

TOLAMBIYA, P.; MATHUR, S. A Study on Potential Phytopharmaceuticals Assets in *Catharanthus roseus* L. (Alba). **International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2016.

TIWARI, J. K.; POONAM, P.; SAURABH, S.; DEVI, S.; ALI, N.; BHARDWAJ, V.; SINGH, B. P. Molecular characterization of potato somatic hybrids by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. **Potato Journal**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 2015.

TYLER, V.E. Medicinal plant research: 1953-1987. **Planta Medica**, v. 54, n. 2, p. 95-100, 1988.

UNNATI, S.; RIPAL, S.; SANJEEV, A.; NIVATI, A. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicine**, v. 11, n. 1, p. 16-23, 2013.

VAISSIÈRE, B. E. **Honeybees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), as pollinators of upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae), for hybrid seed production.** 1991; Thesis (PhD) – College Station, Texas, 1991.

VAISSIÈRE, B. E.; FREITAS, B. M.; GEMMILL-HERREN, B. **Protocol to detect and assess pollination deficits in crops: a handbook for its use.** Projeto FAO/IFAD, p. 72, 2011.

VAN DER HEIJDEN, JACOBS D. I.; SNOEIJER W.; Hallard D.; VERPOORTE R. The Catharanthus Alkaloids: Pharmacognosy and Biotechnology **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 607-628, 2004.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento.** Sociedade Brasileira de genética, Ribeirão Preto, p. 496, 1992.

VERMA, A.; LAAKSO, I.; SEPPANEN-LAAKSO, T.; HUHTIKANGAS, A.; RIEKKOLA, M. A simplified procedure for indole alkaloid extraction from *Catharanthus roseus* combined with a semi-synthetic production process for vinblastine. **Molecules**, v. 12, p. 1307-1315, 2007.

VIEIRA, L. J.; SANTANA, J. R. F.; ALVES, A. A. C.; LEDO, C. A. S.; SOUZA, F. V. D. Use of aniline blue stain to observing pollen tubes development in different *Manihot* Mill. species. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 15, p. 1805-1809, 2015.

WANG, Z.; WEBER, J.L.; ZHONG, G.; TANKSLEY, S.D. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 88, p. 1-6, 1994.

WANG, L.; ZHANG, Y.; HE, H. P.; ZHANG, Q.; LI, S. F.; HAO, X. J. Three new terpenoid indole alkaloids from *Catharanthus roseus*. **Planta Medica**, v. 77, n. 7, p. 754-758, 2011.

WANG, Y.; ZHANG, D.; RENNER, S. S.; CHEN, Z. Self-pollination by sliding pollen in *Caulokaempferia coenobialis* (Zingiberaceae). **International Journal of Plant Sciences**, v. 166, p. 753-759, 2005.

WANG, Y. Q.; ZHANG, D. X.; CHEN, Z. Y. Pollen histochemistry and pollen:ovule ratios in Zingiberaceae. **Annals of Botany**, v. 94, p. 583-591, 2004.

WEBB, C. J.; LLOYD, D. G. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. **New Zealand Journal of Botany**, v. 24, p. 163-178, 1986.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics makers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WINN, A. A.; ELLE, E.; KALISZ, S.; CHEPTOU, P. O.; ECKERT, C. G.; GOODWILLIE, C.; JOHNSTON, M. O.; MOELLER, D. A.; REE, R. H.; SARGENT, R. D.; VALLEJO-MARÍN, M. Analysis of inbreeding depression in mixed-mating plants provides evidence for selective interference and stable mixed mating. **Evolution**, v. 65, p. 3339-3359, 2011.

WOREDE, F.; SREEWONGCHAI, T.; PHUMICHAI, C.; SRIPICHITT, P. Multivariate Analysis of Genetic Diversity among some Rice Genotypes Using Morpho-agronomic Traits. **Journal of Plant Sciences**, v. 9, p. 14-24, 2014.

WUBS et al. Mixed mating system in the fern *Asplenium scolopendrium*: implications for colonization potential. **Annals of Botany**, v. 106, p. 583–590, 2010.

YI, W.; LAW, E.; MCCOY, D.; WETZSTEIN, H. Y. Stigma development and receptivity in Almond (*Prunus dulcis*). **Annals of Botany**, v. 97, p. 57–63, 2006.

YU, F.; DE LUCA V. ATP-binding cassette transporter controls leaf surface secretion of anticancer drug components in *Catharanthus roseus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 5830–5835, 2013.

YU, J. K.; LA ROTA, M.; KANTETY, R.V.; SORRELLS, M.E. EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 271, p. 742-751, 2004.

ZEVEN, A. C.; ZHUKOVSKY, P. M. **Dictionary of cultivated plants and their centres of diversity**. PUDOC, Wageningen. p. 219, 1975.

ZHENG, Yang-Yang.; LIN, Xian-Ju.; LIANG, Hui-Min.; WANG, Fang-Fei.; CHEN, Li-Yu. The Long Journey of Pollen Tube in the Pistil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3529, p. 1-15, 2018.

ZHU, T.; SALMERON, J. High-definition genome profiling for genetic marker discovery. **Trends Plant Science**, v. 12, p. 196–202, 2007.

ZHUKOVSKY, P.M. Genetic and botanical irregularities in the evolution of cultivated plants. **Genetika Mosc.** 1. p. 41-49 (in Russian, English summary), 1965.

11. ANEXO

Anexo A. Dados de passaporte da coleção de germoplasma de vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ.....	74
Anexo B. Coleção de germoplasma de vinca (<i>Catharanthus roseus</i> [L.] G. Don) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ.....	81

Anexo A. Dados de passaporte da coleção de germoplasma de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ.

Número de Acesso	Gênero	Espécie	Subtaxa	Nome de acesso	Data de Aquisição	Localização precisa da coleta
112002	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN001		Cabo Frio-RJ
112003	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN002		Volta Redonda-RJ
112004	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN003		Seropédica-RJ
112005	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN004	30/09/2017	Petrópolis-RJ
112006	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN005	30/09/2017	Petrópolis-RJ
112007	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN006		Cabo Frio-RJ
112008	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN007	30/09/2017	Petrópolis-RJ
112009	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN008	30/09/2017	Petrópolis-RJ
112010	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN009	30/09/2017	Petrópolis-RJ
112011	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN010		Seropédica-RJ
112012	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN011		Cabo Frio-RJ
112013	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN012		Seropédica-RJ
112014	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN013		Seropédica-RJ
112015	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN014	30/09/2017	Petrópolis-RJ
112016	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN015		Seropédica-RJ
112017	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN016		Seropédica-RJ
112018	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN017	30/09/2017	Petrópolis-RJ

Continua.

Número de Acesso	Latitude do local de coleta	Longitude do local de coleta	Altitude do local de coleta	Data de Coleta	Estado biológico do acesso	Fonte de coleta	Tipo de armazenamento de germoplasma
112002	22°50'12,4"S	42°00'38,8"W	26,17 m	06/11/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112003	22°30'10,8"S	44°05'20,6"W	376,43 m	24/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112004	22°46'09"S	43°41'38"W	22 m	19/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112005	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34 m		Muda	Floricultura	A campo
112006	22°23'34,1"S	43°07'51,9"W	683,21 m		Muda	Floricultura	A campo
112007	22°50'12,4"S	42°00'38,8"W	26,17 m	06/11/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112008	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34 m		Muda	Floricultura	A campo
112009	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34 m		Muda	Floricultura	A campo
112010	22°23'34,1"S	43°07'51,9"W	683,21 m		Muda	Floricultura	A campo
112011	22°45'35"S	43°41'48"W	38,81 m	14/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112012	22°50'12,4"S	42°00'38,8"W	26,17 m	06/11/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112013	22°45'35"S	43°41'48"W	38,81 m	18/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112014	22°45'35"S	43°41'48"W	38,81 m	18/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112015	22°23'44,7"S	43°08'10,7"W	679,39 m		Muda	Floricultura	A campo
112016	22°45'35"S	43°41'48"W	38,81 m	18/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112017	22°45'35"S	43°41'48"W	38,81 m	18/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112018	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34 m		Muda	Floricultura	A campo

Continua.

Número de Acesso	Gênero	Espécie	Subtaxa	Nome de acesso	Data de Aquisição	Localização precisa da coleta
112019	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN018	09/11/2017	Seropédica-RJ
112020	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN019		Valença-RJ
112021	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN020	10/11/2017	Seropédica-RJ
112022	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN021		Cabo Frio-RJ
112023	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN022	06/11/2017	Holambra-SP
112024	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN023	09/11/2017	Seropédica-RJ
112025	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN024	30/09/2017	Petrópolis-RJ
112026	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN025	30/09/2017	Petrópolis-RJ
112027	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN026	09/11/2017	Seropédica-RJ
112028	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN027	06/11/2017	Holambra-SP
112029	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN028		Cabo Frio-RJ
112030	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN029	30/09/2017	Petrópolis-RJ
112041	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN030		Seropédica-RJ
112042	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN031		Seropédica-RJ
112043	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN032		Seropédica-RJ
112044	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN033		Cabo Frio-RJ
112045	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN034		Cabo Frio-RJ

Continua.

Número de Acesso	Latitude do local de coleta	Longitude do local de coleta	Altitude do local de coleta	Data de Coleta	Estado biológico do acesso	Fonte de coleta	Tipo de armazenamento de germoplasma
112019	22°45'35"S	43°41'38"W	38,81 m		Muda	Floricultura	A campo
112020	22°20'23,8"S	43°41'05,3"W	379,51 m	06/11/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112021	22°46'09"S	43°41'38"W	38,81 m		Muda	Floricultura	A campo
112022	22°50'12,4"S	42°00'38,8"W	26,17 m	06/11/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112023	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo
112024	22°46'09"S	43°41'38"W	38,81 m		Muda	Floricultura	A campo
112025	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34 m		Muda	Floricultura	A campo
112026	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34 m		Muda	Floricultura	A campo
112027	22°46'09"S	43°41'38"W	38,81 m		Muda	Floricultura	A campo
112028	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo
112029	22°50'12,4"S	42°00'38,8"W	26,17 m	06/11/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112030	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34 m		Muda	Floricultura	A campo
112041	22°46'09"S	43°41'38"W	38,81 m	19/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112042	22°46'09"S	43°41'38"W	38,81 m	19/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112043	22°46'09"S	43°41'38"W	38,81 m	19/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112044	22°50'12,4"S	42°00'38,8"W	26,17 m	06/11/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112045	22°50'12,4"S	42°00'38,8"W	26,17 m	06/11/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo

Continua.

Número de Acesso	Gênero	Espécie	Subtaxa	Nome de acesso	Data de Aquisição	Localização precisa da coleta
112046	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN035		Cabo Frio-RJ
112048	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN036		Seropédica-RJ
112049	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN037		Seropédica-RJ
112050	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN038	06/11/2017	Holambra-SP
112051	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN039		Seropédica-RJ
112052	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Silvestre	UFRRJ VIN040		Valença-RJ
112053	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN041	12/11/2017	Holambra-SP
112054	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN042	12/11/2017	Holambra-SP
112055	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN043	12/11/2017	Holambra-SP
112056	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN044	12/11/2017	Holambra-SP
112059	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN045	12/11/2017	Holambra-SP
112081	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN046	12/11/2017	Holambra-SP
112082	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN047	12/11/2017	Holambra-SP
112083	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN048	12/11/2017	Holambra-SP
112084	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN049	12/11/2017	Holambra-SP
112086	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN050	09/11/2017	Seropédica-RJ
112087	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN051	12/11/2017	Holambra-SP

Continua.

Número de Acesso	Latitude do local de coleta	Longitude do local de coleta	Altitude do local de coleta	Data de Coleta	Estado biológico do acesso	Fonte de coleta	Tipo de armazenamento de germoplasma
112046	22°50'12,4"S	42°00'38,8"W	26,17 m	06/11/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112048	22°46'09"S	43°41'38"W	38,81 m	19/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112049	22°46'09"S	43°41'38"W	22,00 m	19/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112050	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo
112051	22°46'09"S	43°41'38"W	38,81 m	19/09/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112052	22°20'23,8"S	43°41'05,3"W	379,51 m	06/11/2017	Muda	Jardins Públicos	A campo
112053	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo
112054	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo
112055	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo
112056	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo
112059	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo
112081	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo
112082	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo
112083	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo
112084	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo
112086	22°45'35"S	43°41'48"W	38,81 m		Muda	Floricultura	A campo
112087	22°38'38,8"S	47°03'13,8"W	617,06 m		Muda	Floricultura	A campo

Continua.

Número de Acesso	Gênero	Espécie	Subtaxa	Nome de acesso	Data de Aquisição	Localização precisa da coleta
111791	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN052	30/09/2017	Petrópolis-RJ
111792	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN053	30/09/2017	Petrópolis-RJ
111793	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN054	30/09/2017	Petrópolis-RJ
111794	<i>Catharanthus</i>	<i>Catharanthus roseus</i>	Variedade	UFRRJ VIN055	30/09/2017	Petrópolis-RJ

Continua.

Número de Acesso	Latitude do local de coleta	Longitude do local de coleta	Altitude do local de coleta	Data de Coleta	Estado biológico do acesso	Fonte de coleta	Tipo de armazenamento de germoplasma
111791	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34 m		Muda	Floricultura	A campo
111792	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34 m		Muda	Floricultura	A campo
111793	22°23'18,5"S	43°07'54,8"W	689,34 m		Muda	Floricultura	A campo
111794	22°22'04,1"S	43°07'29,7"W	639,97 m		Muda	Floricultura	A campo

Anexo B. Coleção de germoplasma de vinca (*Catharanthus roseus* [L.] G. Don) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ.

