

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

KHÉTRIN SILVA MACIEL

**QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES E DIVERSIDADE
GENÉTICA DE MARACUJAZEIROS CULTIVADOS EM DIFERENTES
ALTITUDES NO ESPÍRITO SANTO**

ALEGRE
2015

KHÉTRIN SILVA MACIEL

**QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES E DIVERSIDADE
GENÉTICA DE MARACUJAZEIROS CULTIVADOS EM DIFERENTES
ALTITUDES NO ESPÍRITO SANTO**

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

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Lopes.

Coorientadora: Prof. Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira.

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre.

ALEGRE
2015

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

Maciel, Khétrin Silva, 1989-
M152q Qualidade fisiológica de sementes e diversidade genética de
maracujazeiros cultivados em diferentes altitudes no Espírito Santo /
Khétrin Silva Maciel. – 2015.
101 f. : il.

Orientador: José Carlos Lopes.

Coorientadores: Rodrigo Sobreira Alexandre; Marcia Flores da
Silva Ferreira.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. *Passiflora*. 2. Germinação. 3. Altitude. 4. Marcadores
moleculares. 5. Diversidade genética. I. Lopes, José Carlos. II.
Alexandre, Rodrigo Sobreira. III. Ferreira, Marcia Flores da Silva.
IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
Agrárias. V. Título.

CDU: 63

KHÉTRIN SILVA MACIEL

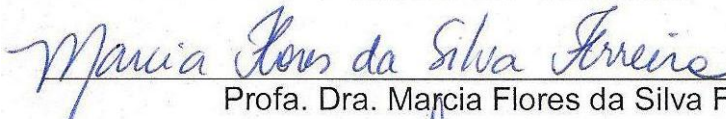
**QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES E DIVERSIDADE
GENÉTICA DE MARACUJAZEIROS CULTIVADOS EM DIFERENTES
ALTITUDES NO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal, linha de pesquisa em Biotecnologia e Ecofisiologia do Desenvolvimento de Plantas.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. José Carlos Lopes
CCA/UFES - Orientador



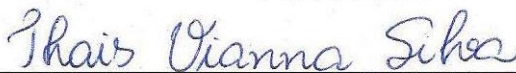
Profa. Dra. Marcia Flores da Silva Ferreira
CCA/UFES - Coorientadora



Prof. Dr. Rodrigo Sobreira Alexandre
CCA/UFES - Coorientador



Prof. Dr. Ruimário Inácio Coelho
CCA/UFES



Prof. Dr. Thaís Vianna Silva
Ifes - Campus de Alegre

Dedico esta dissertação à minha mãe Laudicéia Machado da Silva, meu pai Julio Cesar Maciel e meus irmãos Kenner Silva Maciel e Kátia Silva Maciel que desde cedo me ensinaram a importância da educação na formação de um ser humano, sempre prestaram suporte, apoio e incentivo às minhas decisões e souberam valorizar minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, por sua infinita misericórdia e me possibilitou a realização dessa conquista;

A Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES) e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal que possibilitaram a realização do mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa;

Aos meus pais Laudicéia e Julio Cesar, pelo amor, pelo carinho, pelo apoio, pela dedicação e pelo incentivo em todas as etapas da minha vida;

Aos meus irmãos Kenner e Kátia, pelo companheirismo, amor, carinho e apoio;

Ao meu namorado Sebastião Vinícius Batista Brinate, que me ajudou a manter sempre firme e forte, com o bom humor de sempre, participando de mais esta vitória, com você partilho o que tenho;

A meus tios, tias, primas, primos e minha avó (Ruth de Oliveira *in memoriam*), pela paciência, pela firmeza, pela amizade, pelo apoio e pelo incentivo;

Ao professor Dr. José Carlos Lopes pelo auxílio, pelos conhecimentos adquiridos, pela ajuda, pelos conselhos, pela amizade, pela confiança e pela troca de excelentes informações;

Aos coorientadores Rodrigo Sobreira Alexandre pelo apoio e pela troca de conhecimento e Marcia Flores da Silva Ferreira, pelo uso do Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal para as análises moleculares, obrigada pela orientação e troca de excelentes informações e pelo conhecimento;

Aos amigos que atuam e atuaram no Laboratório de Análise de Sementes, Carla, Carlos Eduardo (Carlinhos), Carlos Eduardo, Paula, Liana, Rafael e Allan e aos integrantes do Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal, pela ajuda, pelo incentivo, pela troca de informações e pelas grandes amizades que formei;

A todos os professores da Pós-Graduação em Produção Vegetal que me proporcionaram conhecimentos no decorrer desse mestrado;

Aos produtores rurais por disponibilizarem suas propriedades para coletas de frutos e folhas de maracujazeiros e coletas de solos;

A todos os amigos por serem fontes inesgotáveis de apoio, incentivo e diversão. A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

Obrigada a todos vocês!

BIOGRAFIA

Khétrin Silva Maciel, filha de Julio Cesar Maciel e Laudicéia Machado da Silva, nasceu em 31 de março de 1989, em Alegre, estado do Espírito Santo. Coursou o ensino fundamental, na Escola Estadual Aristeu Aguiar, em Alegre, ES. Coursou o ensino médio, na Escola Agrotécnica Federal de Alegre (EAFA), em Rive, distrito de Alegre, ES. Em fevereiro de 2008 ingressou no curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre, ES, graduando-se em fevereiro de 2013. Em março de 2013, iniciou o Curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), tendo defendido a dissertação em 19 de fevereiro de 2015.

RESUMO

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae e ao gênero *Passiflora* que é o mais importante economicamente. Altitudes entre 100 a 900 m são indicadas para o plantio do maracujazeiro e estudos sobre localizações geográficas distintas possibilitam expressões do genótipo, influenciadas pelas condições ambientais. O gradiente altitudinal influencia a distribuição da variação genética dentro e entre populações de plantas e a diversidade genética muda com a altitude. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade fisiológica de sementes e a diversidade genética de maracujazeiros cultivados em diferentes altitudes do Espírito Santo. Para avaliação da qualidade fisiológica das sementes, os frutos de *Passiflora* spp. maduros foram colhidos em pomares localizados em altitudes baixa (0-100 m), média (>100 até 600 m) e alta (>600 m) de diferentes municípios do Espírito Santo. Os tratamentos pré-germinativos nas sementes foram: T1- escarificação física, feita manualmente com lixa d'água nº 120; T2- tratamento com ácido giberélico (GA₃) na concentração de 500 mg L⁻¹ com embebição por 24 horas e T3- sementes sem escarificação realizados nas sementes em laboratório e em casa de vegetação. Foi avaliado o envelhecimento acelerado tradicional, envelhecimento acelerado com saturação salina e deterioração controlada em sementes de maracujá amarelo sem escarificação localizado em alta altitude e as condições que apresentaram menor deterioração das sementes para aplicação às demais espécies e altitudes com os respectivos tratamentos pré-germinativos que apresentaram maiores valores de germinação e vigor em laboratório e em casa de vegetação. Assim, para as sementes do maracujá amarelo utilizou-se o tratamento sem escarificação, para sementes de maracujá roxo, a escarificação física e para as sementes de maracujá doce, o tratamento com ácido giberélico. O teste de envelhecimento acelerado com saturação salina a 43 °C por 72 horas e deterioração controlada a 25% de umidade expostas por 24 horas diferencia as espécies nas diferentes altitudes. Sementes de maracujá amarelo e sementes localizadas em alta altitude apresentam qualidade fisiológica superior. Para a avaliação da diversidade genética foram utilizadas folhas jovens de cinco plantas matrizes de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, *P. edulis* Sims e *P. alata* Curtis cultivadas em três altitudes (baixa, média e alta) do Espírito Santo. Para SSR foi encontrado baixo número de alelos, alta heterozigosidade esperada e altos valores de PIC e para a análise ISSR detectou

um elevado número de bandas por *primer* e alto polimorfismo. Há maior similaridade genética entre *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. e *P. edulis*. *Passiflora alata* apresenta maior distância genética em relação às espécies. As populações de baixa altitude se diferenciam das demais independente da espécie e do marcador utilizado.

Palavras-chave: *Passiflora* spp. Germinação. Vigor. Altitude. Diversidade.

ABSTRACT

The passion fruit belongs to the Passifloraceae family and genus *Passiflora* that is the most important economically. Altitudes between 100-900 m are recommended for planting the passion and studies on different geographical locations allow expressions of genotype influenced by environmental conditions. The altitudinal gradient influences the distribution of genetic variation within and between populations of plants and genetic diversity changes with altitude. This study aimed to evaluate the physiological quality of seeds and genetic diversity of passion fruit grown at different altitudes of the Espírito Santo. To evaluate the physiological quality of seeds, *Passiflora* spp fruit mature were harvested from orchards located in low altitudes (0-100 m), medium (> 100 to 600 m) and high (> 600 m) of different municipalities of the Espírito Santo. The pre-germination treatments were: T1- physical scarification done manually with water sandpaper nº 120; T2- treatment with gibberellic acid (GA₃) at a concentration of 500 mg L⁻¹ with soaking for 24 hours and T3- seeds without scarification performed in seeds in the laboratory and greenhouse. We evaluated the traditional accelerated aging, accelerated aging with salt saturation and controlled deterioration in yellow passion fruit seeds without scarification located at high altitude and conditions showed less deterioration of seed for application to other species and altitudes with their pre-germination treatments had higher germination and vigor values in laboratory and greenhouse. Thus, to the seeds of passion fruit was used treatment without scarifying to purple passion fruit seeds, physical scraping and the fresh passion fruit seed treatment with gibberellic acid. The accelerated aging test with saline saturation at 43 °C for 72 hours and controlled deterioration to 25% humidity for 24 hours exposed different species at different altitudes. Passion fruit seeds and high altitude located seeds have higher physiological quality. For the assessment of genetic diversity young leaves were used five mother plants of *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*, *P. edulis* Sims and *P. alata* grown in three heights (low, medium and high) of the Espírito Santo. SSR was found low number of alleles, heterozygosity was high and high PIC values and the ISSR analysis revealed a large number of bands per primer and high polymorphism. There is greater genetic similarity between *P. edulis* f. *flavicarpa* and *P. edulis*. *Passiflora alata* has greater genetic distance for the species. The lowland populations differ from other independent of the species and the marker used.

Keywords: *Passiflora* spp. Germination. Vigor. Altitude. Diversity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Frequência relativa de germinação (%) de espécies de <i>Passiflora</i> spp. em diferentes altitudes e tratamentos	50
Figura 2 - Frequência relativa de emergência (%) de espécies de <i>Passiflora</i> spp. em diferentes altitudes e tratamentos	55
Figura 3 - Germinação (%), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (cm), comprimento da raiz (cm), massa fresca (mg) e massa seca (mg) de plântulas de <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Degener após o envelhecimento acelerado tradicional (EA) e envelhecimento acelerado com saturação salina (EASS) nas temperaturas de 41, 43 e 45 °C por 0, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição	58

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Dendrograma das espécies de <i>Passiflora</i> spp., obtido pelo método UPGMA	89
Figura 2 - Agrupamento dos indivíduos pertencentes às três espécies de <i>Passiflora</i> spp. nas três altitudes, obtida pelo método UPGMA	91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Local de coleta das plantas das espécies de <i>Passiflora</i> spp.	38
Tabela 2 - Germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e comprimento da parte aérea (CPA) de plântulas de espécies de <i>Passiflora</i> spp. cultivadas em diferentes altitudes e tratadas em laboratório.....	45
Tabela 3 - Massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de espécies de <i>Passiflora</i> spp. cultivadas em diferentes altitudes e tratadas em laboratório.	48
Tabela 4 - Emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), diâmetro do coleto (DC) e massa seca (MS) de plântulas de espécies de <i>Passiflora</i> spp. cultivadas em diferentes altitudes e tratadas em casa de vegetação.....	51
Tabela 5 - Teor de água (%) de sementes de <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Degener após o envelhecimento acelerado tradicional (EA) e o envelhecimento acelerado com saturação salina (EASS) nas temperaturas de 41, 43 e 45 °C por 0, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição	56
Tabela 6 - Teor de água (%) de espécies de <i>Passiflora</i> spp. antes e após o envelhecimento acelerado com saturação salina na temperatura de 43 °C por 72 horas de exposição	59
Tabela 7 - Germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de espécies de <i>Passiflora</i> spp. submetidas ao envelhecimento acelerado com saturação salina na temperatura de 43 °C por 72 horas	61
Tabela 8 - Médias de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), da raiz (CR), massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de <i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Degener submetidas a deterioração controlada na temperatura de 45 °C, com (17, 22 e 25%) de umidade nos tempos de 24 e 48 horas	62
Tabela 9 - Índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da raiz (CR) e massa fresca (MF) de plântulas de espécies de <i>Passiflora</i> spp. cultivadas em diferentes altitudes submetidas a deterioração controlada na temperatura de 45 °C,	

com 25% de umidade no tempo de 24 horas 63

Tabela 10 - Germinação (G), comprimento da parte aérea (CPA) e massa seca (MS) de plântulas de espécies de *Passiflora* spp. cultivadas em diferentes altitudes submetidas a deterioração controlada na temperatura de 45 °C, com 25% de umidade no tempo de 24 horas 64

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Local de coleta das plantas das espécies de *Passiflora* spp. 77

Tabela 2 - *Primers* SSR e ISSR utilizados na amplificação de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, *P. edulis* Sims e *P. alata* Curtis coletadas em diferentes altitudes.....80

Tabela 3 - Caracterização dos 13 SSR utilizados na caracterização molecular das espécies de *Passiflora* spp.....83

Tabela 4 - Número médio (Nm), total (Nt), efetivo (Ne), proporção de alelo em cada população (Pa) e número de alelos raros (Nr) para SSR.....84

Tabela 5 - Análise dos *primers* ISSR de três espécies de *Passiflora* spp.....85

Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) de três espécies de *Passiflora* spp. coletadas em três altitudes, a partir de dados de SSR e ISSR.....87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO MARACUJAZEIRO	16
2.2 QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MARACUJÁ	19
2.3 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MARACUJÁ	19
2.4 DIVERSIDADE GENÉTICA E GRADIENTE ALTITUDINAL	22
2.5 MARCADOR MICROSSATÉLITE	23
2.6 MARCADOR ISSR	24
3 REFERÊNCIAS	25
4 CAPÍTULO 1 - QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MARACUJÁ CULTIVADAS EM DIFERENTES ALTITUDES NO ESPÍRITO SANTO	34
4.1 INTRODUÇÃO	36
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.2.1 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO	42
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.4 CONCLUSÕES	66
4.5 REFERÊNCIAS	66
5 CAPÍTULO 2 - DIVERSIDADE GENÉTICA DE MARACUJAZEIROS CULTIVADOS EM DIFERENTES ALTITUDES NO ESPÍRITO SANTO	73
5.1 INTRODUÇÃO	75
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	77
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.4 CONCLUSÕES	93
5.5 REFERÊNCIAS	93
6. CONCLUSÕES GERAIS	98
APÊNDICES	99

1 INTRODUÇÃO

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae, e ao gênero *Passiflora*, que se destaca como o mais importante economicamente. O Brasil é considerado centro de origem de aproximadamente 139 espécies conhecidas, das quais 89 são endêmicas, o que o torna centro de diversidade genética do gênero (BERNACCI et al., 2013). A planta desenvolve-se bem nas regiões tropicais e subtropicais sendo, portanto, de clima quente e úmido (LIMA; BORGES, 2004).

O *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (maracujazeiro amarelo) é a espécie mais cultivada, responsável por 95% da área plantada no Brasil (MELETTI et al., 2011), que apresenta excelentes condições para o cultivo do maracujazeiro. O maracujazeiro roxo (*P. edulis* Sims) e o maracujazeiro doce (*P. alata* Curtis) são cultivados em pequenas áreas para o consumo em mercados restritos (SANTOS et al., 2011).

A importância em desenvolver trabalhos com frutos e sementes de diferentes localidades geográficas reside na possibilidade de estudar e identificar as diferenças fenotípicas determinadas pelas variações ambientais, pois o meio pode favorecer a expressão de determinadas características, que em outro local não se manifestariam. Mesmo a espécie sendo endêmica, suas sementes estão sujeitas às variações de temperatura, ao comprimento do dia, aos índices de pluviosidade e a outras variantes cujo meio pode ser adequado para expressar sua composição genética, que em outro local não expressaria (BOTEZELLI et al., 2000).

As regiões mais indicadas para o plantio do maracujazeiro são as de altitudes entre 100 a 900 m, com temperatura média entre 25 e 26 °C; precipitação pluviométrica ideal entre 1.200 a 1.400 mm bem distribuída ao longo do ano, umidade relativa do ar baixa e luminosidade alta. A planta necessita de 11 horas de luz/dia para entrar em floração para produção de frutos com ótimo aspecto, sabor e aroma (FRAIFE FILHO et al., 2010). Embora o maracujazeiro tenha boa adaptação aos diversos tipos de solos, é necessário que o mesmo seja profundo e tenha, principalmente, boa drenagem (ALEXANDRE et al., 2009; LOPES et al., 2013).

Apesar da grande expansão da cultura, muitos são os problemas enfrentados pelos fruticultores que cultivam o maracujazeiro, entre eles a propagação (MARTINS et al., 2006). A germinação é lenta e desuniforme, ocasionada por fatores de natureza

variada, como a utilização de sementes obtidas de plantas não selecionadas, presença de substâncias fitoreguladoras, sementes com tegumento impermeável e presença de fungos associados às sementes (LOPES et al., 2007; 2013).

Para promover a germinação das sementes de maracujás, os tratamentos de escarificação e reguladores vegetais são eficientes por permitirem a entrada de água na semente. Em alguns casos, a entrada de gases ou luz é necessária à germinação, pois a retirada do tegumento determina maior sensibilidade à luz, à temperatura e a remoção de inibidores ou promotores da germinação, influenciando o metabolismo das sementes (LOPES et al., 2006). Na escarificação ocorre rompimento da impermeabilidade do tegumento, com métodos que usam superfície abrasiva (escarificação física ou mecânica) e soluções químicas (escarificação química) (OLIVEIRA et al., 2008; FREITAS et al., 2009). O uso de reguladores de crescimento como o ácido giberélico favorece o desempenho das plântulas, acelera a velocidade de emergência de plântulas, importante na regulação da maturação, dormência e germinação das sementes (ARAGÃO et al., 2006).

O gênero *Passiflora* apresenta ampla variabilidade genética natural, é uma planta alógama, que está diretamente ligada à autoincompatibilidade do maracujazeiro (MELETTI et al., 2010).

Os marcadores moleculares são capazes de localizar diferenças significativas em nível de DNA e não são afetados por influências ambientais, não dependem do estágio de desenvolvimento da planta e são ideais para detectar o polimorfismo molecular entre e dentro das espécies (COSTA et al., 2012).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO MARACUJAZEIRO

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae, à ordem Violales, à classe Magnoliopsida e ao filo Magnoliophyta. Desde 1553 existem registros de plantas desta família e houve divergências quanto ao número de gêneros e espécies da família quando o primeiro registro literário de uma planta pertencente ao grupo foi escrito na Colômbia (JORGENSEN; MACDOUGAL, 2014). O número de espécies da família Passifloraceae varia entre 520 (WATSON; DALLWITZ, 2012) e 700

(FEUILLET, 2004) e o número de gêneros varia entre 18 (FEUILLET, 2004; WATSON; DALLWITZ, 2012) e 23 (BARROSO, 1978). Tais variações são resultados de incertezas taxonômicas, uso de sinônimos e descrições de novas espécies.

Aproximadamente 96% das espécies estão distribuídas na América Tropical, com registros de espécies na Índia, na China, no Sudeste Asiático, na Austrália, nas ilhas do Pacífico e nas regiões vizinhas. Colômbia e Brasil são centros de diversidade com aproximadamente 30% das espécies de *Passiflora* encontradas nesses países (cerca de 170 na Colômbia e 150 no Brasil), incluindo 89 que são endêmicas do Brasil (OCAMPO et al., 2010; BERNACCI et al., 2014).

O Brasil destaca-se no cenário internacional como o maior produtor mundial de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener), com 923.035 toneladas em uma área aproximada de 61.842 hectares. A região Nordeste lidera a produção brasileira, respondendo por mais da metade da produção nacional, seguida pelas regiões Sudeste, Norte, Centro-Oeste e Sul (IBGE, 2013).

O estado do Espírito Santo é o segundo maior produtor nacional de maracujá. Contribui expressivamente com a fruticultura, que se destaca como atividade agrícola de rentabilidade para cerca de 80% das propriedades rurais capixabas, que são a base familiar, entre outras ações que são desenvolvidas em 13 polos de fruticultura no estado, e a cultura do maracujá, que sofreu uma queda em 2010, teve uma elevada ascensão em 2013 (CANAL DO PRODUTOR, 2013).

Os principais municípios produtores do Espírito Santo são Jaguaré, Sooretama, Pinheiros, Linhares, São Mateus, Conceição da Barra, Santa Maria de Jetibá e Rio Bananal. Apresenta uma área plantada de 2,0 mil hectares e teve uma produção de 50 mil toneladas na safra de 2013 (CEASA, 2013).

No Brasil são produzidas comercialmente *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener e *P. alata*, enquanto, em outros países da América Latina são cultivadas outras espécies como *P. ligularis* Juss, *P. mollissima* Bailey, *P. edulis* Sims, *P. maliformis* e *P. quadrangularis* (MIRANDA et al., 2009). Apesar da imensa variedade, dos sabores e dos aromas, a maioria dos frutos comestíveis de maracujás é desconhecida fora do seu centro de origem, onde crescem, de forma selvagem, ou são pouco cultivados.

O maracujazeiro é uma planta de clima tropical e subtropical, com temperatura

média entre 25 e 26 °C; precipitação pluviométrica ideal entre 1.200 a 1.400 mm bem distribuída ao longo do ano. Os solos mais recomendados são os areno-argilosos, profundos, férteis, bem drenados, com topografia plana a ligeiramente ondulada, com pH entre 5,0 e 6,5. A altitude do cultivo deve estar entre 100 e 900 m, a umidade relativa do ar deve ser baixa e a luminosidade alta. A planta necessita de 11 horas de luz/dia para entrar em floração para produção de frutos com ótimo aspecto, sabor e aroma (FRAIFE FILHO et al., 2010).

O maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener) e o maracujá roxo (*Passiflora edulis* Sims) pertencem à mesma espécie de maracujazeiro, pois os descendentes híbridos entre as duas formas são férteis e normais. Estima-se que, juntos, o maracujá azedo ou maracujá amarelo e o maracujá roxo ocupem mais de 90% da área cultivada no mundo (FALEIRO et al., 2005). O maracujá amarelo apresenta casca de cor amarelada, é uma planta mais vigorosa, adapta melhor em dias quentes, apresenta maior produtividade, maior acidez total, maior rendimento em suco, frutos maiores e sementes com coloração pardo-escuras (PEREIRA et al., 2006).

O maracujá roxo possui sabor e aroma mais intensos, maior percentagem de açúcares, elevado teor de sólidos solúveis (°Brix) e sementes pretas, sendo mais indicado para locais de maior altitude e clima mais frios sendo cultivado na Austrália, na África e no Sudeste Asiático (PEREIRA et al., 2006).

O maracujá doce produz um fruto perfumado, com polpa de sabor doce, levemente acidulada, com aroma e paladar atraentes e agradáveis, sendo particularmente consumido como fruta fresca, ao contrário do maracujá amarelo ou azedo. Dessa forma, a polpa dos frutos de maracujá doce não é utilizada na indústria como matéria-prima para produção de suco, pois seu suco possui sabor enjoativo (PEREIRA et al., 2006; MELETTI et al., 2003).

Apesar do investimento inicial elevado, o pequeno produtor encontra na cultura do maracujazeiro a base da sustentação de sua família e de sua propriedade, podendo contar praticamente o ano inteiro com uma pequena produção. Foi assim que a cultura se desenvolveu e até hoje, a agricultura familiar tem sido responsável pela expansão dos pomares comerciais. Com isso, a cultura do maracujá tem desempenhado uma importante função social, gera uma oportunidade de emprego no campo para a população de baixa renda, a redução de êxodo rural, a

sustentabilidade ambiental e econômica das propriedades rurais (MELETTI, 2011; NOGUEIRA, 2013).

2.2 QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MARACUJÁ

A qualidade das sementes compreende um conjunto de características que determinam seu valor para a semeadura, de modo que o potencial de desempenho das sementes somente pode ser identificado, quando há interação dos atributos de natureza genética, física, fisiológica e sanitária que afetam a sua capacidade de germinar e desenvolver plântula normal rapidamente para o sucesso da cultura (MARCOS FILHO, 2005; SANTOS et al., 2007).

A capacidade da semente desempenhar suas funções vitais, caracteriza-se pela longevidade, pela germinação e pelo vigor. A redução na qualidade fisiológica é atribuída ao decréscimo na percentagem de germinação, ao aumento de plântulas anormais e à redução no vigor das plântulas (TOLEDO et al., 2009).

A qualidade fisiológica é avaliada normalmente pelo teste de germinação, que tem por objetivo determinar o potencial máximo de germinação do lote de sementes, cujo valor poderá ser usado para comparar a qualidade de diferentes lotes e estimar o valor de semeadura no campo, que em sua condução considera as condições ideais requeridas pela espécie, em que ela exera sua máxima capacidade germinativa. No entanto, sob condição de campo pode ocorrer grande variação, onde se destaca a utilização de testes de vigor para obtenção de resultados mais consistentes na condução da semeadura (LOPES; ALEXANDRE, 2010).

Os testes de qualidade fisiológica, como envelhecimento acelerado e deterioração controlada podem fornecer parâmetros de vigor e viabilidade das sementes. Estes testes estão relacionados com a degradação das membranas celulares e com a redução das atividades respiratórias e biossintéticas, sendo os eventos iniciais da sequência de deterioração das sementes (BINOTTI et al., 2008).

O teste de envelhecimento acelerado caracteriza-se pelo uso de condições artificiais de elevada umidade e temperatura para acelerar a deterioração das sementes e, assim, identificar o vigor e o potencial de armazenamento (DELOUCHE; BASKIN, 1973). É reconhecido como um dos mais difundidos para a avaliação da qualidade

fisiológica das sementes de várias espécies cultivadas, sendo capaz de proporcionar informações com alto grau de consistência (HAMPTON; TEKRONY, 1995). O teste é avaliado pela diferença de sensibilidade apresentada pelas sementes ao envelhecimento. Sementes mais vigorosas apresentam germinação elevada e maior capacidade de produzir plântulas normais após serem submetidas a tratamentos de envelhecimento acelerado, enquanto, aquelas de baixo vigor apresentam maior redução de sua viabilidade (MARCOS FILHO, 1994; VIEIRA; CARVALHO, 1994).

O teste de envelhecimento acelerado é estudado com vistas à padronização nas sementes, no qual foi originalmente desenvolvido para estimar a longevidade de sementes armazenadas devido aos processos de deterioração ocorridos neste teste serem semelhantes aos que ocorrem no envelhecimento natural das sementes, porém, a uma velocidade acelerada (MARCOS FILHO, 1999).

A diferença na absorção de água pelas sementes no teste de envelhecimento acelerado é variável em função da atmosfera úmida em que as sementes serão mantidas durante o teste, ocorrendo variações acentuadas no grau de umidade, quando mantidas em ambiente saturado com água pura, em relação àquele saturado com soluções salinas. Dependendo da solução utilizada, são obtidos níveis específicos de umidade relativa do ar, como: 87%, com o uso de cloreto de potássio; 76%, com o uso do cloreto de sódio e 55%, utilizando-se o brometo de sódio (JIANHUA; McDONALD, 1996), retardando, assim, a absorção de água pelas sementes. Este método, denominado teste de envelhecimento acelerado com uso de soluções saturadas de sal (SSAA - "Saturated Salt Accelerated Aging"), foi proposto inicialmente por Jianhua e McDonald (1996).

A deterioração controlada envolve o mesmo princípio do teste de envelhecimento acelerado. No entanto, a avaliação é efetuada em amostras com diferentes conteúdos de água, ao invés da utilização de sementes com teores de água iguais, resultando na obtenção de condições mais uniformes durante o teste e, consequentemente, com resultados mais confiáveis (LEEUEWEN et al., 2005).

O ajuste do teor de água faz com que as sementes atinjam, antecipadamente, o ponto de equilíbrio, sendo submetidas a um estresse mais rigoroso que no teste de envelhecimento acelerado, onde o teor de água aumenta descontroladamente, entre as mesmas, até atingirem o equilíbrio (KRZYZANOWSKI et al., 2001).

2.3 GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE MARACUJÁ

A propagação do maracujazeiro é feita, principalmente, por meio de sementes, podendo também ser feita por métodos assexuais. Problemas de germinação são muito comuns no gênero *Passiflora*, inclusive no maracujá amarelo, a espécie mais cultivada, cujas sementes ao serem removidas do fruto apresentam-se envoltas por um tecido mucilaginoso denominado arilo. A germinação é lenta e desuniforme, ocasionada por fatores de natureza variada, como a utilização de sementes obtidas de plantas não selecionadas, presença de substâncias fitorreguladoras, sementes com tegumento impermeável e presença de fungos associados às sementes (LOPES et al., 2007; 2013).

As Passifloráceas posicionam-se dentre as famílias cujas sementes apresentam dormência, devido aos mecanismos de controle de ingresso de água para o seu interior (MORLEY-BUNKER, 1994). A presença do arilo que envolve a semente, que é um tecido de constituição gelatinosa, rica em pectina influencia sistematicamente na germinação (ALEXANDRE et al., 2009), além da presença de substâncias inibidoras no arilo das sementes, que também contribui para uma menor taxa de germinação das sementes (MARTINS et al., 2010).

De acordo com Carvalho e Nakagawa (2012), a extração do arilo é específica para as sementes de certas espécies. Lopes et al. (2007) destacaram que para aumentar a germinação de sementes de maracujá, os tratamentos de escarificação podem ser eficientes por permitirem a entrada de água na semente. Em alguns casos, a entrada de gases ou luz é necessária à germinação, pois a retirada do tegumento determina maior sensibilidade à luz, à temperatura e a remoção de inibidores ou promotores da germinação, influenciando o metabolismo das sementes (LOPES et al., 2006). Na escarificação ocorre o rompimento do tegumento, e esta pode ser realizada com métodos que usam superfície abrasiva (escarificação física ou mecânica) e soluções químicas (escarificação química) (OLIVEIRA et al., 2008; FREITAS et al., 2009).

Segundo Alexandre et al., (2009), a remoção total do tegumento com o auxílio de uma minimorsa e a escarificação com lixa, resultou em maiores médias de germinação (67%) em sementes de maracujazeiros do que em relação às sementes com o tegumento intacto (40%). Lopes et al., (2007) destacaram que estes

resultados são explicados pela alta porcentagem de sementes duras encontradas em sementes de maracujá amarelo, mesmo escarificadas.

2.4 DIVERSIDADE GENÉTICA E GRADIENTE ALTITUDINAL

A diversidade genética é a multiplicidade de frequências alélicas em um grupo de indivíduos e junto com o ambiente, fornece a natureza do fenótipo (SANTANA et al., 2011), a sustentabilidade das espécies, é matéria-prima para a adaptação e evolução (VIEGAS et al., 2011).

Dentro das populações, a diversidade genética é determinada pela migração e deriva genética que podem aumentar ou diminuir os níveis de diversidade (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2012). Zhang et al., (2006), destacam que um alto nível de diferenciação pode ser atribuído além da deriva genética, ao sistema de reprodução das espécies, às flutuações demográficas ou ao isolamento genético.

O isolamento de populações em diferentes altitudes pode ocorrer por barreiras e restringir o fluxo gênico, conduzindo à diferenciação genética (ARNAUD-HAOND et al., 2006). Uma baixa diversidade genética nas populações significa a perda de alelos raros, perda de aptidão devido à fixação de alelos deletérios e depressão endogâmica, limitando a capacidade das espécies de responderem às adversidades ambientais, afetando a persistência da população (HAHN et al., 2012).

Populações de baixa altitude podem apresentar um período de floração mais prolongado em comparação com as populações de maior altitude, apresentando diferenças de fluxo gênico, taxas de migração e diversidade genética ao longo do gradiente altitudinal (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2012).

O isolamento reprodutivo pode ser aumentado com a altitude, com redução na conectividade genética entre as populações (HAHN et al., 2012), e pode ser afetado pela alteração de dispersão via pólen e/ou sementes (BYARS et al., 2009). Em altitudes mais elevadas, o fluxo gênico entre as populações pode ser reduzido devido à diferenciação entre as populações e a distância efetiva entre as mesmas (HAHN et al., 2012). Neste caso, é o estabelecimento de estratégias de manejo para a persistência das espécies nesses habitats (HAHN et al., 2012).

A diversidade pode mudar com a altitude, incluindo os níveis mais altos de

diversidade (altitude intermediária), em comparação com os níveis mais baixos (margens de altitude baixa e alta) (OHSAWA et al., 2007).

Espécies que habitam locais de elevadas altitudes podem apresentar menor ciclo de vida, pois as baixas temperaturas podem influenciar no crescimento e, conseqüentemente, nos níveis e na estruturação da diversidade genética (THIEL-EGENTER et al., 2009).

Em populações menores ocorre aumento das taxas de endocruzamento, com fixação de alelos deletérios e depressão endogâmica (HERRERA; BASAGA, 2008; OHSAWA; IDE, 2008).

Populações de altitude média têm maior diversidade genética que populações de baixas e altas altitudes (OHSAWA et al., 2007), no entanto, populações de altitude mais baixas têm menor diversidade genética que populações de altitudes mais altas (GÄMPERLE; SCHNELLER, 2002), e a variação genética intrapopulacional não é influenciada pela altitude (TRUONG et al., 2007).

2.5 MARCADOR MICROSSATÉLITE

A diversidade genética pode ser verificada pelo uso de diversos tipos de descritores, com destaque para os morfoagronômicos, citológicos, bioquímicos, fisiológicos ou moleculares (AMARAL JUNIOR et al., 2010).

Os marcadores moleculares são capazes de localizar diferenças significativas em nível de DNA e a caracterização pode ser realizada em uma maior velocidade, qualidade e em larga escala (VARSHNEY et al., 2005).

Os microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são marcadores que consistem de pequenas sequências com um a seis pares de bases repetidas em "tandem" e utilizam dois pares de *primers* específicos (20 a 30 bases) complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite. As principais vantagens do SSR são: a codominância, o multialelismo, a geração de alto nível de polimorfismo, a alta reprodutibilidade, o baixo custo de utilização, o grande poder de resolução, a rapidez e a simplicidade da técnica; e como desvantagens: o alto custo no desenvolvimento dos iniciadores e a análise de polimorfismos em géis de alta resolução. Os microssatélites são ideais para verificar as diferenças alélicas entre

genótipos e estimar a variabilidade genética (OLIVEIRA et al., 2006).

O alto nível de polimorfismos é devido ao alto número de repetições nas sequências simples, causando alterações por substituições, inserções ou deleções de nucleotídeos nas regiões que flanqueiam os microssatélites (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Os marcadores microssatélites são específicos para cada espécie, em que as regiões flanqueadoras são conservadas entre espécies ou gêneros próximos, na maioria das vezes, sendo possível utilizar iniciadores desenvolvidos para espécies correlacionadas, processo denominado de transferibilidade ou amplificação cruzada (BRAVO et al., 2006). Marcadores microssatélites já foram desenvolvidos para *P. edulis* (OLIVEIRA et al., 2006), *P. alata* (PÁDUA et al., 2005), *P. cincinnata* (CERQUEIRA-SILVA et al., 2012), *P. setacea* (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014) e *P. contracta* (CAZÉ et al., 2012). A transferibilidade é importante para minimizar os custos de implementação destes marcadores em espécies para as quais ainda não há iniciadores desenvolvidos.

2.6 MARCADOR ISSR

O ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) é um marcador baseado em microssatélites com capacidade de diferenciar indivíduos altamente aparentados (BORÉM; CAIXETA, 2009). Ocorre a amplificação de uma região do DNA entre microssatélites que estejam espaçados e inversamente orientados, por meio de um único *primer*, composto de uma curta sequência de microssatélite (tipicamente de 18-20 pares de bases) com um a quatro nucleotídeos degenerados ancorados na extremidade 5' ou 3'. Este *primer* consiste em mono, di, tri, tetra ou penta nucleotídeos repetidos *in tandem* (SHAHSAVAR et al., 2007). O marcador permite indicar a existência de variabilidade inter e intrapopulacional (BANDEIRA et al., 2010).

O ISSR é um marcador dominante, gerando informações de presença ou ausência, multiloco, não fazendo necessárias informações prévias de sequências de DNA da espécie-alvo, e produzem fragmentos com grande reprodutibilidade (SOUZA et al., 2008).

Marcadores ISSR são recomendados para análises de espécies relacionadas

evolutivamente. Apresenta vantagens como: resultados confiáveis, alta reprodutibilidade, grande quantidade de locos polimórficos, rapidez nos resultados e menores custos em relação aos outros marcadores (RODRIGUES, 2010). Apresentam um produto de amplificação de 200 a 2.000 pares de bases e necessitam de temperaturas elevadas para anelamento (COSTA et al., 2010).

Atualmente, os marcadores ISSR são os mais utilizados para várias espécies de plantas e podem contribuir para seleção de genótipos, estudos de diversidade genética, “fingerprinting” e seleção assistida (COSTA et al., 2010).

3 REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, R. S.; OTONI, W. C.; DIAS, J. M.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, J. C. Propagação vegetativa *ex vitro* do maracujazeiro: estaquia e enxertia. In: ALEXANDRE, R. S.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, J. C. **Propagação do maracujazeiro**. Vitória, ES: EDUFES, 2009. 210 p.
- AMARAL JÚNIOR, A. T.; VIANA, A. P.; GONÇALVES, L. S. A.; BARBOSA, C. D. Procedimentos Multivariados em Recursos genéticos vegetais. In: PEREIRA, T. N. S.(ed.). **Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas**. Viçosa, MG, p. 205- 254, 2010.
- ARAGÃO, C. A.; DEON, M. D.; QUEIRÓZ, M. A.; DANTAS, B. F. Germinação e vigor de sementes de melancia com diferentes ploidias submetidas a tratamentos pré-germinativos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 3, n. 28, p. 82-86, 2006.
- ARNAUD-HAOND, S.; TEXEIRA, S.; MASSA, S. I.; BILLOT, C.; SAENGER, P.; COUPLAND, G.; DUARTE, C. M.; SERRÃO, A. Blackwell Publishing Ltd Genetic structure at range edge: low diversity and high inbreeding in Southeast Asian mangrove (*Avicennia marina*) populations. **Molecular Ecology**, v. 15, p.3515–3525, 2006.
- BANDEIRA, A. J.; DEIMLING, L. I.; GEORG-KRAEMER, I. E. Variabilidade genética do jaborandi (*Pilocarpus pennatifolius* Lemaire; Rutaceae) em populações naturais da região noroeste do Rio Grande do Sul. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, 2010.
- BARROSO, G. M. **Passifloraceae**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos.

Volume 1. Editora da Universidade de São Paulo; São Paulo, Brasil. p. 194-197, 1978.

BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; GIOVANNI, R.; BORGES, R. A. X.; HERING, R. L. O.; SERRANO, T.; SANTOS FILHO, L. A. F. Passifloraceae. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Org.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 830-834, 2013.

BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; NUNES, T. S.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. **Lista de Espécies da Flora do BRASIL**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB182>>. Acesso em 6 nov. 2014.

BINOTTI, F. F. S.; HAGA, K. I.; CARDOSO, E. D.; ALVES, C. Z.; SÁ, M. E.; ARF, O. Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 247-254, 2008.

BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa-MG: UFV, 2009. 532p.

BOTEZELLI, L.; DAVIDE, A. C.; MALAVASI, M. M. Características dos frutos e sementes de quatro procedências de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). **Cerne**, v. 6, n. 1, p. 9-18, 2000.

BRAVO, J. P.; HOSHINO, A. A.; ANGELICI, C. M. L. C. D.; LOPES, C.R.; GIMENES, M. A. Transferability and use of microsatellite markers for the genetic analysis of the germplasm of some *Arachis* section species of the genus *Arachis*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 516-524, 2006.

BYARS, S. G.; PARSONS, Y.; HOFFMANN, A. Effect of altitude on the genetic structure of an Alpine grass, *Poa hiemata*. **Annals of Botany**, v. 103, p. 885-899, 2009.

CANAL DO PRODUTOR: Safra de maracujá terá mercado e preços garantidos. Seag/ES, 2013. Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br/comunicacao/noticias/safra-de-maracuja-tera-mercado-e-preco-garantidos>>. Acesso em 09 ago. 2013.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.

ed. FUNEP: Jaboticabal, 2012. 590p.

CAZÉ, A. L. R.; KRIEDT, R. A.; BEHEREGARAY, L. B.; BONATTO, S. L.; FREITAS, L. B. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Passiflora contracta*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 11343-11348, 2012.

CEASA. CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DO ESPÍRITO SANTO. Disponível em: <<http://www.ceasa.es.gov.br/?p=2163>>. Acesso em 6 nov 2013.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SANTOS, E. S. L.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; CARDOSO-SILVA, C. B.; PEREIRA, A. S.; OLIVEIRA, A. C.; CORRÊA, R. X. Genetic variation in a wild population of the “sleep” passion fruit (*Passiflora setacea*) based on molecular markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 1, p. 731–738, 2012.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SANTOS, E. S. L.; SOUZA, A. M.; MORI, G. M.; OLIVEIRA, E. J.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). **American journal of botany**, v. 99, n. 4, p.170-172, 2012.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SANTOS, E. S. L.; VIEIRA, J. G. P.; MORI, G. M.; JESUS, O. N.; CORREA, R. X.; SOUZA, A. P. New microsatellite markers for wild and commercial species of *Passiflora* (Passifloraceae) and cross-amplification. **Applications in Plant Sciences**, v. 2, p.1–5, 2014.

COSTA, J. L.; OLIVEIRA, E. J.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, G. A. F.; NEVES, C. G. **Marcadores moleculares como ferramenta para estruturação da diversidade genética em genótipos de maracujazeiro**. Jornada Científica - Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2010.

COSTA, J. L.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, G. A. F.; OLIVEIRA, E. J. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, p. 253-260, 2012.

DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, v. 1, n. 2, p. 427-452, 1973.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005, 677 p.

FEUILLET, C. **Passifloraceae (passion flower family)**. In: SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HELD, S. V. Eds. Flowering plants of the Neotropics Princeton. University Press: Oxford, MS, USA, p. 286–287, 2004.

FRAIFE FILHO, G. A.; LEITE, J. B. V.; RAMOS, J. V. **Maracujá**. 2010. Publicado no site da Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira/CEPLAC. Disponível: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/maracuja.htm>>. Acesso em 15 jan 2015.

FREITAS, V. L. O.; ALVES, T. H. S.; LOPES, R. M. F.; LEMOS FILHO, J. P. L. Biometria de frutos e sementes e germinação de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth. e *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (Fabaceae - Caesalpinoideae). **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 81, p. 27-35, 2009.

GÄMPERLE, E.; SCHNELLER, J. J. Phenotypic and isozyme variation in *Cystopteris fragilis* (Pteridophyta) along an altitudinal gradient in Switzerland. **Flora**, v. 197, p. 203–213, 2002.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; SEGARRA-MORAGUES, J. G.; WIDMER, A.; ESCUDERO, A.; IRIONDO, J. M. Unravelling genetics at the top: Mountain islands or isolated belts? **Annals of Botany**, v. 110, p. 1221–1232, 2012.

HAHN, T.; KETTLE, C. J.; GHAZOUL, J.; FREI, E. R.; MATTER, P.; PLUESS, A. R. Patterns of genetic variation across altitude in three plant species of semi-dry grasslands. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. 1-10, 2012.

HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. **Handbook of vigour test methods**. 3. ed. Zürich: ISTA, 1995. 117 p.

HERRERA, C. M.; BAZAGA, P. Adding a third dimension to the edge of a species' range: altitude and genetic structuring in mountainous landscapes. **Heredity**, v. 100, p. 275–285, 2008.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRARIA E ESTATÍSTICA. 2013. **Maracujá**: área plantada e quantidade produzida. Brasília-DF. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 abr 2014.

JIANHUA, Z.; McDONALD, M. B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, v. 25, n. 1, p. 123-131, 1996.

JORGENSEN, P. M.; MACDOUGAL, J. M. **Taxonomic history of *Passiflora***. 2014. Mo. Bot. Gard. Disponível

em:<http://www.mobot.org/mobot/research/passiflora/taxonomic_history.shtml>.

Acesso em 14 mar 2014.

KRZYZANOWSKI, F. C.; WEST, S. H.; FRANÇA NETO, J. B. Teste de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Informativo ABRATES**, v.11, n. 2, p.185, 2001.

LEEUEWEN, K. V.; SADER, R.; FESSEL, S. A.; BARBOSA, J. C. Deterioração controlada em sementes de soja armazenadas. **Científica**, Jaboticabal, v. 33, n. 1, p.75-82, 2005.

LIMA, A. A.; BORGES, A. L. Exigências Edafoclimáticas. In: LIMA, A. A; CUNHA, M. A. P. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. 1 ed. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 37-44, 2004.

LOPES, J. C.; ALEXANDRE, R. S. Germinação de sementes de espécies florestais. In: CHICHORRO, J. F.; GARCIA, G. O.; BAUER, M. O.; CALDEIRA, M. W. **Tópicos em Ciências Florestais**. 1 ed. Visconde do Rio Branco-MG: Suprema, v. 1, p. 21-56, 2010.

LOPES, J. C.; BONO, G. M.; ALEXANDRE, R. S.; MAIA, V. M. Germinação e vigor de plantas de maracujazeiro ‘amarelo’ em diferentes estádios de maturação do fruto, arilo e substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p.1340-1346, 2007.

LOPES, J. C.; DIAS, P. C.; MACEDO, C. M. Tratamentos para acelerar a germinação e reduzir a deterioração das sementes de *Ormosia nitida* Vog. **Revista Árvore**, v. 30, n. 2, p. 171-177, 2006.

LOPES, J. C.; TIRADENTES, A. T.; ALEXANDRE, R. S. Emergência e crescimento inicial de plântulas de maracujazeiro para obtenção de porta enxertos. **Magistra**, v. 25, n. 1, p. 55-62, 2013.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MARCOS FILHO, J. **Teste de envelhecimento acelerado**. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, p. 1-24, 1999.

MARCOS FILHO, J. **Teste de envelhecimento acelerado**. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Ed.). Testes de vigor em sementes. Jaboticabal: Funep, p.133-

150, 1994.

MARTINS, C. M.; VASCONCELLOS, M. A. S.; ROSSETTO, C. A. V.; CARVALHO, M. G. Prospecção fitoquímica do arilo de sementes de maracujá amarelo e influência em germinação de sementes. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p.1934-1940, 2010.

MARTINS, M. R.; REIS, M. C.; MENDES NETO, J. A.; GUSMÃO L. L.; GOMES, J. J. A. Influência de diferentes métodos de remoção do arilo na germinação de sementes de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.). **Revista da FZVA**, v. 13, n. 2, p.28-38. 2006.

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

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

MELETTI, L. M. M.; OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. **Maracujá. Série Frutas Nativas** (6). Jaboticabal, SP: Funep. 2010, 55 p.

MIRANDA, D.; FISCHER, G.; CARRANZA, C.; MAGNITSKIY, S.; CASIERRA, F.; PIEDRAHÍTA, W.; FLÓREZ, L. E. (Ed.) **Cultivo, poscosecha y comercialización de las passifloráceas en Colombia: maracuyá, granadilla, gulupa y curuba**. Bogotá, Colômbia: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, 2009. 360 p.

MORLEY-BUNKER, M. J. S. Seed coat dormancy in *Passiflora* species. **Anuario Jornal Royal New Zealand Institute Horticulture**, n. 8, p.72-74,1994.

NOGUEIRA, E. A.; MELLO, N. T. C.; RIGHETTO, P. R.; SANNAZZARO, A. M. **Produção integrada de frutas: a inserção do maracujá paulista**. 2013. Disponível em: <www.iea.sp.gov.br>. Acesso em: 6 ago 2014.

OCAMPO, J.; D'ECKENBRUGGE, J. C.; JARVIS, A. **Distribuição do gênero *Passiflora* L. diversidade na Colômbia e seu potencial como um indicador para a gestão da biodiversidade na zona de crescimento café diversidade**. 2010, p. 1158-1180.

OHSAWA, T.; IDE, Y. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. **Global Ecology and Biogeography**,

v. 17, p. 152–163, 2008.

OHSAWA, T.; TSUDA, Y.; SAITO, Y.; SAWADA, H.; IDE, Y. Altitudinal genetic diversity and differentiation of *Quercus crispula* in the Chichibu Mountains, central Japan. **International Journal Plant Science**, v. 168, p. 333-340, 2007.

OLIVEIRA, D. A.; NUNES, Y. R. F.; ROCHA, E. A.; BRAGA, R. F.; PIMENTA, M. A. S.; VELOSO, M. D. M. Potencial germinativo de sementes de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth. - Fabaceae: Mimosoideae) sob diferentes procedências, data de coleta e tratamentos de escarificação. **Revista Árvore**, v. 32, n. 6, p.1001-1009, 2008.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

PÁDUA, J. G.; OLIVEIRA, E. J.; ZUCCHI, M. I.; OLIVEIRA, G. C. X.; CAMARGO, L. E. A.; VIEIRA, M. L. C. Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 863-865, 2005.

PEREIRA, F. A.; CARNEIRO, M. R.; ANDRADE, L. M. (Ed.). **A cultura do maracujá**. Brasília, DF: Embrapa Informações Tecnológicas, 2006, 124 p.

RODRIGUES, J. F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccinea* Lindl. e *C. mantiqueirae* (Fowlie) van den Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. 2010. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo, Brasil. 81p.

SANTANA, I. B. B.; OLIVEIRA E. J.; FILHO, W. S. S.; RITZINGER, R.; AMORIM, E. P. COSTA, M. A. P. C.; MOREIRA, R. F. C. Variabilidade genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise de marcadores ISSR. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 868-876, 2011.

SANTOS, E. L.; PÓLA, J. N.; BARROS, A. S. R.; PRETE, C. E. C. Qualidade fisiológica e composição química das sementes de soja com variação na cor do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 20-26, 2007.

SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; SILVA, A. S.; CARVALHO, F. M.; COSTA, J. L.; PÁDUA, J. G. ISSR Markers as a Tool for the Assessment of Genetic Diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**, v. 49, p. 540-554, 2011.

SHAHSAVAR, A. R.; IZADPANAH, K.; TAFAZOLI, E.; SAYED TABATABAEI, B. E. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae*, v. 112, n. 1, p. 310-314, 2007.

SOUZA, G. A.; CARVALHO, M. R. O.; MARSTINS, R. N. C. G.; OLIVEIRA L. O. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p.843-849, 2008.

THIEL-EGENTER, C.; GUGERLI, F.; ÁLVAREZ, N.; BRODBECK, S.; CIESLAK, E.; COLLI, L.; ENGLISCH, T.; GAUDEUL, M.; GIELLY, L.; KORBECKA, G.; NEGRINI, R.; PAUN, O.; PELLECCIA, M.; RIOUX, D.; RONIKIER, M.; SCHÖNSWETTER, P.; SCHÜPFER, F.; TABERLET, P.; TRIBSCH, A.; VAN LOO, M.; WINKLER, M.; HOLDEREGGER, R.; INTRABIODIV, C.. Effects of species traits on the genetic diversity of high-mountain plants: a multispecies study across the Alps and the Carpathians. **Global Ecology Biogeographic**, v. 18, p. 78–87, 2009.

TOLEDO, M. Z.; FONSECA, N. R.; CÉSAR, M. L.; SORATTO, R. P.; CAVARIANI, C.; CRUSCIOL, C. A. C. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 2, p. 124-133, 2009.

TRUONG, C.; PALMÉ, A. E.; FELBER, F. Recent invasion of the mountain birch *Betula pubescens* ssp. *tortuosa* above the treeline due to climate change: genetic and ecological study in northern Sweden. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 20, p. 369–380, 2007.

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

VIEGAS, M. P.; LACERDA, C.; PETRAROLHA, S.; MOREIRA, J. P.; TONIOL, L.; AZEVEDO, V. C. R.; CAMPI, A. Y.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, M. L. T.; SEBBENN, A. M. Diversidade genética e tamanho efetivo de duas populações de *Myracrodruon Urundeuva* Fr. All., sob conservação ex situ. **Revista Árvore**, v. 35, n. 4, p. 769-779, 2011.

VIEIRA, R. D. D.; CARVALHO, N. M. **Teste de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164 p.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification retrieval.** 2012. Disponível em:<<http://www.citeulike.org/user/Flit/article/728499>>. Acesso em 6 nov 2014.

ZHANG, L.; LI, Q. J.; LI, H. T.; CHEN, J.; LI, D. Z. Genetic diversity and geographic differentiation in *Tacca chantrieri* (Taccaceae): an autonomous selfing plant with showy floral display. **Annals of Botany**, v. 98, p. 449-457, 2006.

4 CAPÍTULO 1 - QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE MARACUJÁ CULTIVADAS EM DIFERENTES ALTITUDES NO ESPÍRITO SANTO

RESUMO - O maracujazeiro é uma planta de clima tropical e subtropical, com altitudes indicadas entre 100 e 900 m. As condições ambientais podem influenciar as expressões do genótipo. Objetivou-se avaliar a qualidade fisiológica de sementes de espécies de *Passiflora* spp. cultivadas em três diferentes altitudes no Espírito Santo. Para avaliação, frutos de *Passiflora* spp. maduros foram colhidos em pomares localizados em altitudes baixa (0-100 m), média (>100 até 600 m) e alta (>600 m) de diferentes municípios do Espírito Santo. Os tratamentos pré-germinativos nas sementes foram: T1- escarificação física, feita manualmente com lixa d'água nº 120; T2- tratamento com ácido giberélico (GA₃) na concentração de 500 mg L⁻¹ com embebição por 24 horas e T3- sementes sem escarificação realizados nas sementes em laboratório e em casa de vegetação. Foi avaliado o envelhecimento acelerado tradicional, envelhecimento acelerado com saturação salina e deterioração controlada em sementes de maracujá amarelo sem escarificação localizado em alta altitude e as condições que apresentaram menor deterioração das sementes para aplicação às demais espécies e altitudes com os respectivos tratamentos pré-germinativos que apresentaram maiores valores de germinação e vigor em laboratório e em casa de vegetação. Assim, para as sementes do maracujá amarelo utilizou-se o tratamento sem escarificação, para sementes de maracujá roxo, a escarificação física e para as sementes de maracujá doce, o tratamento com ácido giberélico. O teste de envelhecimento acelerado com saturação salina a 43 °C por 72 horas e deterioração controlada a 25% de umidade expostas por 24 horas diferencia as espécies nas diferentes altitudes. Sementes de maracujá amarelo e sementes localizadas em alta altitude apresentam qualidade fisiológica superior.

Palavras-chave: *Passiflora* spp. Germinação. Vigor.

ABSTRACT - Passion fruit is a tropical and subtropical plant, with altitudes indicated between 100 and 900 m. The environmental conditions can influence the expression of the genotype. This study aimed to evaluate the physiological quality of seeds of species of *Passiflora* spp. grown in three different altitudes in the Espírito Santo. For evaluation, the *Passiflora* spp. fruit mature were harvested from orchards located in low altitudes (0-100 m), medium (> 100 to 600 m) and high (> 600 m) of different municipalities of the Espírito Santo. The pre-germination treatments were: T1 - physical scarification done manually with water sandpaper nº 120; T2 - treatment with gibberellic acid (GA₃) at a concentration of 500 mg L⁻¹ with soaking for 24 hours and T3 - seeds without scarification performed in laboratory and in the greenhouse. We evaluated the traditional accelerated aging, accelerated aging with salt saturation and controlled deterioration in yellow passion fruit seeds without scarification located at high altitude and conditions showed less deterioration of seed for application to other species and altitudes with their pre-germination treatments had higher germination and vigor values in laboratory and greenhouse. Thus, to the seeds of yellow passion fruit was used treatment without scarifying, to purple passion fruit seeds, physical scraping and the fresh passion fruit seed treatment with gibberellic acid. The accelerated aging test with saline saturation at 43 °C for 72 hours and controlled deterioration to 25% humidity for 24 hours exposed different species at different altitudes. Passion fruit seeds and high altitude located seeds have higher physiological quality.

Keywords: *Passiflora* spp. Germination. Vigor.

4.1 INTRODUÇÃO

O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae e ao gênero *Passiflora*, que se destaca como o mais importante economicamente. O Brasil é considerado centro de origem de aproximadamente 139 espécies conhecidas, nativas do país, das quais 89 são endêmicas, sendo considerado o maior centro de diversidade genética do gênero (BERNACCI et al., 2013).

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de maracujá amarelo, com 923.035 toneladas, em uma área cultivada de 61.842 hectares. A Região Nordeste tem liderado a produção brasileira nos últimos anos, sendo responsável por mais da metade da produção nacional (671.421 t/ha). A Bahia destaca-se como o maior estado produtor (410.078 t/ha) seguido pelos estados: Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Ceará, Sergipe, Pará, Minas Gerais, Goiás e Alagoas (IBGE, 2013).

O *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (maracujá amarelo) é a espécie mais cultivada, responsável por 95% da área plantada no Brasil (MELETTI et al., 2011), que apresenta excelentes condições para o cultivo do maracujazeiro. O maracujazeiro roxo (*P. edulis* Sims) e o maracujazeiro doce (*P. alata* Curtis) são cultivados em pequenas áreas para o consumo em mercados restritos (SANTOS et al., 2011). A planta desenvolve-se bem nas regiões tropicais e subtropicais sendo, portanto, de clima quente e úmido com altitudes entre 100 a 900 m e temperatura média entre 25 e 26 °C (FRAIFE FILHO et al., 2010).

No Espírito Santo, o maracujazeiro é cultivado, principalmente em Jaguaré, Sooretama, Pinheiros, Linhares, São Mateus, Conceição da Barra, Santa Maria de Jetibá e Rio Bananal (CEASA, 2013).

Frutos e sementes de diferentes localidades geográficas permitem estudar e identificar as diferenças fenotípicas determinadas pelas variações ambientais, pois o meio pode ser adequado para expressão de determinadas características, que em outro local não se manifestariam (BOTEZELLI et al., 2000).

A propagação do maracujazeiro é feita principalmente por meio de sementes, embora também possa ser por métodos assexuais. Problemas de germinação são muito comuns no gênero *Passiflora*, inclusive no maracujá amarelo, a espécie mais cultivada, cujas sementes ao serem removidas do fruto apresentam-se envoltas por um tecido mucilaginoso denominado arilo (LOPES et al., 2007).

A germinação é lenta e desuniforme, ocasionada por fatores de natureza variada, como a utilização de sementes obtidas de plantas não selecionadas, presença de substâncias fitorreguladoras, sementes com tegumento impermeável e presença de fungos associados às sementes (LOPES et al., 2007).

De acordo com Martins et al. (2010), o extrato de arilo apresenta esteroides e triterpenoides que inibem a germinação das sementes de maracujá amarelo e os efeitos de escarificação e de reguladores vegetais superam a dormência das sementes, destacando-se o GA₃, que é uma substância bioativa promotora da germinação de sementes de várias espécies de plantas (YAMAGUCHI; KAMIYA, 2002).

A qualidade fisiológica está relacionada à capacidade da semente desempenhar suas funções vitais, caracterizando-se pela longevidade, pela germinação e pelo vigor. A redução na qualidade fisiológica está associada com decréscimo na porcentagem de germinação, aumento de plântulas anormais e redução no vigor das plântulas (TOLEDO et al., 2009).

Os testes de qualidade fisiológica, como envelhecimento acelerado e deterioração controlada podem fornecer parâmetros de vigor e viabilidade das sementes. Estes testes estão relacionados com a degradação das membranas celulares e a redução das atividades respiratórias e biossintéticas, sendo os eventos iniciais da sequência de deterioração das sementes (BINOTTI et al., 2008).

Na germinação e no estabelecimento de plântulas, as sementes respondem a combinações específicas de luz, temperatura e umidade por se apresentarem mais favoráveis ao seu estabelecimento (BASKIN; BASKIN, 2005), no entanto, o teste de germinação, conduzido sob condições adequadas (oxigênio, temperatura e disponibilidade hídrica), nem sempre reflete o desempenho das plântulas em campo. Assim, os testes de vigor podem fornecer índices mais sensíveis sobre o potencial fisiológico, complementando as informações do teste de germinação (BAALBAKI et al., 2009).

Objetivou-se com este estudo avaliar a qualidade fisiológica de sementes de espécies de *Passiflora* spp. cultivadas em três diferentes altitudes no Espírito Santo.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Análise de Sementes (LAS) e em casa de vegetação no campus do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), em Alegre-ES. Foram utilizadas sementes de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener), roxo (*Passiflora edulis* Sims) e doce (*Passiflora alata* Curtis), colhidas em pomares situados em três diferentes altitudes (entre 0 e 100 - baixa; >100 até 600 - média e >600 m - alta) no Espírito Santo (Tabela 1).

Tabela 1 - Local de coleta das plantas das espécies de *Passiflora* spp.

Espécies	Localidades	Latitudes	Longitudes	Altitudes (m)	Nº de plantas
Maracujá amarelo	Santa Maria de Jetibá	19° 59' 37,68" S	40° 40' 25,68" O	674	5
	Alegre	20° 46' 13,06" S	41° 30' 27,96" O	365	5
	Marataízes	21° 09' 32,58" S	40° 55' 07,56" O	6	5
Maracujá roxo	Santa Maria de Jetibá	19° 59' 40,32" S	40° 40' 21,66" O	674	5
	Jerônimo Monteiro	20° 47' 43,86" S	41° 30' 33,96" O	210	5
	Marataízes	21° 09' 32,28" S	40° 55' 07,62" O	6	5
Maracujá doce	Santa Maria de Jetibá	20° 02' 34,20" S	40° 43' 34,08" O	655	5
	Alegre	20° 47' 44,94" S	41° 30' 35,52" O	350	5
	Jerônimo Monteiro	20° 46' 13,06" S	41° 25' 33,06" O	100	5

As sementes de frutos maduros e recém-colhidos foram extraídas com auxílio de uma colher esterilizada, removendo-se a polpa com a técnica da cal extinta, sobre uma peneira. Em seguida, as sementes contendo a mucilagem foram lavadas e mantidas sobre papel tipo germitest à sombra para secagem até a umidade atingir níveis oscilando entre 10 a 12%.

O primeiro experimento foi conduzido no Laboratório de Análise de Sementes (LAS) em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes, em esquema fatorial 3 x 3 x 3 [três espécies de maracujá: amarelo, roxo e doce; três diferentes altitudes: 0 a 100; >100 a 600 e >600 m; e três tratamentos pré-germinativos: T1- escarificação física, feita manualmente com lixa d'água nº 120;

T2- tratamento com ácido giberélico (GA₃) na concentração de 500 mg L⁻¹ com embebição por 24 horas e T3- sementes sem escarificação].

Os testes para avaliação da qualidade fisiológica das sementes foram:

Teor de água da semente - foi determinado em estufa a 105 ± 3 °C, durante 24 horas, segundo as instruções das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), utilizando-se duas repetições para cada tratamento, com aproximadamente 2,0 g de sementes cada. Os resultados foram expressos em porcentagem média para cada tratamento;

Germinação - foi conduzido com quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, semeadas em rolos de papel tipo germitest, umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco, que foram mantidos em câmara de germinação tipo BOD, regulada à temperatura alternada de 20-30 °C, na condição de escuro. As avaliações foram feitas após sete e 28 dias da semeadura, computando-se a porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009), e os resultados foram expressos em porcentagem de germinação;

Índice de velocidade de germinação - foi determinado concomitante com o teste de germinação, sendo computado diariamente o número de sementes que apresentaram protrusão da raiz primária igual ou superior a 2 mm, segundo a metodologia descrita por Maguire (1962), sendo a contagem feita até o 28º dia;

Tempo médio de germinação - foi calculado utilizando-se a fórmula proposta por Labouriau (1983):

$$TMG = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

Em que:

TMG = tempo médio de germinação;

k = último tempo de germinação das sementes;

n_i = número de sementes germinadas no tempo t_i (não o número acumulado, mas aquele referido para a i-ésima observação);

t_i = tempo entre o início do experimento e a i-ésima observação (em dias).

Frequência relativa de germinação - foi calculada a partir dos dados de

germinação diária, em função do tempo de incubação, de acordo com Labouriau e Valadares (1976):

$$Fr = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

Em que:

Fr = frequência relativa de germinação;

k = último tempo de germinação das sementes;

n_i = número de sementes germinadas no tempo t_i (não o número acumulado, mas aquele referido para a i -ésima observação).

Comprimento da parte aérea - foi avaliado após 28 dias da semeadura, com o auxílio de régua milimetrada, mediante a medição do comprimento entre o colo e o ápice da última folha de cada planta da amostra e o resultado expresso em cm planta⁻¹;

Comprimento da raiz - foi obtido pela medida tomada entre o colo da planta e a ponta da maior raiz e os resultados expressos em cm planta⁻¹;

Massas fresca e seca totais das plântulas - foram determinadas após 28 dias da semeadura, em balança analítica (0,0001 g). Após a obtenção da massa fresca, as plântulas foram acondicionadas em sacolas de papel tipo Kraft, mantidas em estufa de convecção a 72 °C por 72 horas. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em dessecador com sílica e a seguir pesadas, e os resultados expressos em mg plantula⁻¹.

O segundo experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 3 x 3 [três espécies de maracujá: amarelo, roxo e doce; três diferentes altitudes: 0 a 100; >100 a 600 e >600 m; e três tratamentos pré-germinativos: T1- escarificação física, feita manualmente com lixa d'água nº 120; T2- tratamento com ácido giberélico (GA₃) na concentração de 500 mg L⁻¹ com embebição por 24 horas e T3- sementes sem escarificação].

Foi utilizado substrato comercial, que foi colocado em tubetes de 53 cm³, em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 25 sementes. A semeadura foi feita com uma semente por tubete e as regas feitas diariamente, de acordo com as necessidades da cultura. As avaliações dos experimentos foram

feitas diariamente computando-se a emergência das plântulas, o índice de velocidade de emergência, frequência relativa e tempo médio de emergência, altura, diâmetro do coleto, o comprimento da parte aérea e da raiz, as massas fresca e seca totais das plântulas, conforme descrições feitas anteriormente.

Envelhecimento acelerado tradicional, envelhecimento acelerado com saturação salina e deterioração controlada - estes estudos foram realizados em sementes de maracujá amarelo sem escarificação, procedentes de frutos colhidos no pomar situado em alta altitude, que apresentou maiores valores de germinação e vigor, avaliados no primeiro e segundo experimentos.

Envelhecimento acelerado tradicional - foi conduzido em caixas plásticas tipo gerbox (11,0 x 11,0 x 3,5 cm), com uma tela em alumínio no seu interior, onde as sementes, após a pesagem (aproximadamente 3,0 g), foram distribuídas de maneira a formarem camadas simples e uniformes sobre a superfície da tela. No interior de cada caixa foram adicionados 40 mL de água destilada.

Envelhecimento acelerado com saturação salina - foi conduzido similarmente ao método tradicional, à exceção de serem adicionados nas caixas gerbox 40 mL de solução saturada de NaCl (40 g de NaCl em 100 mL de água destilada) seguindo-se a metodologia descrita por Jianhua e McDonald (1996).

As caixas tampadas foram mantidas em câmara de envelhecimento (envelhecimento acelerado tradicional) e câmara de germinação do tipo BOD (envelhecimento acelerado com saturação salina) reguladas nas temperaturas de 41, 43 e 45 °C, por cinco períodos de exposição: 0, 24, 48, 72 e 96 horas. Após cada período de envelhecimento, quatro repetições de 25 sementes por tratamento foram colocadas para germinar, conforme metodologia descrita para o teste de germinação. As avaliações foram feitas após sete e 28 dias da semeadura, computando-se a porcentagem de plântulas normais (BRASIL, 2009). Foi determinado o teor de água das sementes antes e após cada período de envelhecimento visando à avaliação e o controle da uniformidade das condições do teste, de acordo com Marcos Filho (1999).

Posteriormente, selecionou-se a condição de envelhecimento acelerado com saturação salina que apresentou envelhecimento das sementes com menor grau de deterioração, para ser aplicado nas duas espécies situadas nas diferentes altitudes.

Deterioração controlada - para a condução deste teste, o teor de água das sementes foi ajustado para 17, 22 e 25%, utilizando-se uma câmara úmida confeccionada com caixas do tipo gerbox contendo 40 mL de água destilada e uma tela em alumínio no seu interior, onde as sementes foram distribuídas uniformemente. As caixas foram mantidas em câmaras tipo BOD a 30 °C, e o teor de água das sementes monitorado mediante sucessivas pesagens (HAMPTON; TEKRONY, 1995). Em seguida cada amostra foi colocada em recipientes aluminizados, hermeticamente fechados, mantidos por 16 horas em refrigerador (5 - 8 °C). As cápsulas de alumínio foram transferidas para banho-maria a 45 °C, por 24 e 48 horas (POWELL; MATTHEWS, 1984).

Posteriormente, os recipientes foram imersos, rapidamente em água fria para reduzir e uniformizar a temperatura. Em seguida foi realizada a semeadura, utilizando-se quatro subamostras de 25 sementes por tratamento. Com os resultados obtidos, foi selecionado o teor de água e o tempo de exposição que apresentou menor grau de deterioração, para tratamento das sementes das outras espécies de maracujá, nas três altitudes.

Com os resultados obtidos no primeiro e segundo experimentos, escolheu-se o tratamento que apresentou maiores valores de germinação e vigor das sementes das espécies nas suas respectivas altitudes para serem submetidas ao envelhecimento acelerado com saturação a 43 °C com 72 horas de exposição e à deterioração controlada em sementes com teor de água a 25% e 24 horas de exposição. Assim, para as sementes de maracujá amarelo utilizou-se o tratamento sem escarificação, para sementes de maracujá roxo, a escarificação física, e para as sementes do maracujá doce, o ácido giberélico.

4.2.1 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

-PRIMEIRO E SEGUNDO EXPERIMENTO

Os dois experimentos foram conduzidos seguindo um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes, em esquema fatorial (3 x 3 x 3) que constituíram de três espécies de maracujá, três altitudes e três tratamentos pré-germinativos. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de resíduos e à análise de variância, e quando o valor de F foi significativo em nível de 5%, realizou-

se a comparação de médias pelo teste de Tukey.

-ENVELHECIMENTO ACELERADO TRADICIONAL E ENVELHECIMENTO ACELERADO COM SATURAÇÃO SALINA

O teste de envelhecimento acelerado tradicional e o teste de envelhecimento acelerado com saturação salina foram conduzidos em parcelas subdivididas, em um delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo as temperaturas consideradas as parcelas e os tempos de permanência nas câmaras de envelhecimento as subparcelas, sendo três temperaturas e cinco tempos de permanência nas câmaras, para cada metodologia de envelhecimento. Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes para os testes de germinação pós-envelhecimento.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de resíduos e à análise de variância. Para o efeito do tempo de envelhecimento os dados foram submetidos à análise de regressão e, para o ajuste das equações ($\hat{Y} =$) quadráticas foi utilizado como critério a significância dos betas ($p \leq 0,05$).

O envelhecimento acelerado com saturação salina para as espécies em cada altitude foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes, em esquema fatorial 3 x 3 (três espécies de maracujá e três altitudes). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de resíduos e à análise de variância, e quando o valor de F foi significativo em nível de 5%, realizou-se a comparação de médias pelo teste de Tukey.

Para os dados do teor de água das sementes, estes foram submetidos ao teste de normalidade de resíduos e à análise de variância, e quando o valor de F foi significativo em nível de 5%, realizou-se a comparação de médias pelo teste de Scott-Knot.

-DETERIORAÇÃO CONTROLADA

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes, em esquema fatorial 3 x 2 (três umidades e dois tempos de exposição). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de resíduos e à análise de variância, e quando o valor de F foi significativo em nível de 5%, realizou-se a comparação de médias pelo teste de Tukey.

A deterioração controlada para as espécies situadas nas respectivas altitudes foi

conduzida em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes, em esquema fatorial 3 x 3 (três espécies de maracujá e três altitudes). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de resíduos e à análise de variância, e quando o valor de F foi significativo em nível de 5%, realizou-se a comparação de médias pelo teste de Tukey.

Para todas as análises foi utilizado o programa estatístico R (R CORE TEAM, 2014), empregando-se o pacote ExpDes (FERREIRA et al., 2011).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2 estão apresentados os resultados de germinação, o índice de velocidade de germinação e o comprimento da parte aérea de plântulas de *Passiflora* spp. cultivadas em diferentes altitudes e que receberam diferentes tratamentos. Verifica-se que houve interação significativa entre altitudes x tratamentos x espécies para germinação, índice de velocidade de germinação e comprimento da parte aérea.

As sementes de maracujá amarelo procedentes de alta altitude, escarificada e sem escarificação apresentaram maiores valores para a germinação (98 e 97%, respectivamente) e índice de velocidade de germinação (3,80 e 3,65, respectivamente), em relação ao tratamento com ácido giberélico. No entanto, as sementes escarificadas de frutos de alta e média altitude não diferiram estatisticamente para a germinação. É possível caracterizar várias expressões do genótipo da espécie, possibilitadas pelas adaptações dos indivíduos às condições ambientais locais com estudos de germinação de sementes de frutos de procedências distintas (GONÇALVES et al., 2009). Com relação ao desenvolvimento da parte aérea, plântulas oriundas de sementes de maracujá amarelo sem escarificação em alta altitude apresentaram maiores valores de comprimento da parte aérea (6,88 cm) em relação às altitudes e aos tratamentos (Tabela 2).

Sementes de maracujá roxo procedentes de alta e média altitude não diferiram nos tratamentos para a germinação. Sementes de maracujá roxo de média altitude, escarificadas, tratadas com ácido giberélico e sem escarificação apresentaram maiores valores para o índice de velocidade de germinação (2,98; 2,54 e 3,23, respectivamente), em relação às sementes de alta e baixa altitudes.

Tabela 2 - Germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG) e comprimento da parte aérea (CPA) de plântulas de espécies de *Passiflora* spp. cultivadas em diferentes altitudes e tratadas em laboratório.

			G (%)			IVG			CPA (cm)		
			E	GA ₃	SE	E	GA ₃	SE	E	GA ₃	SE
MA	A	98 aAα*	79 aBα	97 aAα	3,80 aAα	1,51 bBα	3,65 aAα	5,34 aBα	5,58 aBα	6,88 aAα	
	M	95 aAα	87aABα	83 bBα	3,12 bAα	1,98 aBβ	2,11 bBβ	5,53 aAα	5,83 aAα	4,47 bBα	
	B	65 bABα	59 bBα	71 cAα	1,74 cAα	1,53 bAα	1,79 bAα	5,72 aAα	5,80 aAα	4,64 bBα	
MR	A	85 aAβ	88 aAα	84 aAβ	1,55 bAβ	1,73 bAα	1,51 bAβ	4,20 aAβ	3,98 aAβ	3,40 bAβ	
	M	87 aAα	79 aAα	87 aAα	2,98 aAα	2,54 aBα	3,23 aAα	4,71 aAαβ	4,83 aAβ	5,20 aAα	
	B	67 bAα	62bABα	54 bBβ	1,57 bAα	1,52 bAα	1,27 bAβ	4,41 aAβ	4,76 aAβ	4,37 abAα	
MD	A	24 aAγ	12 bBβ	20 aABγ	0,40 aAγ	0,29 bAβ	0,35 aAγ	6,13 aAα	6,28 aAα	3,00 aBβ	
	M	13 bBβ	36 aAβ	10 abBβ	0,25 aBβ	0,65 aAγ	0,28 aBγ	4,25 bAβ	3,00 bBγ	2,25 aBβ	
	B	33 aAβ	12 bBβ	5 bBγ	0,58 aAβ	0,21 bBβ	0,08 aBγ	3,99 bAβ	3,00 bAγ	3,00 aAβ	

*Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna (altitudes), maiúscula na linha (tratamentos) e letras gregas minúsculas na coluna (espécies entre cada altitude) não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Legenda: MA = maracujá amarelo; MR = maracujá roxo; MD = maracujá doce; A = altitude alta; M = altitude média; B = altitude baixa; E = escarificação física; GA₃ = ácido giberélico; SE = sem escarificação.

Sementes de maracujá roxo de média altitude, sem escarificação apresentaram maiores valores de comprimento da parte aérea (5,20 cm) em relação às demais altitudes (Tabela 2).

As sementes de maracujá doce oriundas de média altitude, tratadas com ácido giberélico apresentaram maiores valores de germinação (36%) e índice de velocidade de germinação (0,65) em relação às demais altitudes. Ferrari et al. (2009) também verificaram que houve incremento no processo germinativo de sementes de maracujá doce quando utilizaram giberelinas, contrastando com os resultados obtidos por Zucareli et al. (2003), que ao utilizarem os fitorreguladores GA₃ N-fenilmetil-9-Tetra-hidro-2H piranil 9H-6 amino purina e ethephon em sementes de maracujá doce, de forma isolados ou misturados, nas concentrações de 75 e 150 mg L⁻¹ não favoreceram o processo germinativo. Plântulas oriundas de sementes de maracujá doce de alta altitude, escarificadas e tratadas com ácido giberélico apresentaram maiores valores para o comprimento da parte aérea (6,13 e 6,28 cm, respectivamente). O maior crescimento do caule parece estar mais associado à ação das giberelinas (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O GA₃ é um ativador enzimático que promove a germinação das sementes e influencia o metabolismo proteico, podendo dobrar a taxa de síntese de proteínas. Sementes com baixa concentração relativa de giberelina, quando tratadas com GA₃ na concentração adequada apresentam maior taxa e uniformidade de germinação, devido à sua atuação no alongamento celular, induzindo a raiz primária a romper os tecidos que restringem o seu crescimento (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em alta altitude, sementes de maracujá amarelo escarificadas e sem escarificação apresentaram maiores valores de germinação (98 e 97%) e índice de velocidade de germinação (3,80 e 3,65), respectivamente, em comparação com as sementes de maracujá roxo e doce. Para o comprimento da parte aérea, sementes de maracujá amarelo procedentes de alta altitude sem escarificação apresentaram maiores valores (6,88 cm) em relação ao maracujá roxo e doce (Tabela 2).

Em média altitude sementes de maracujá roxo tratadas com ácido giberélico (2,54) e sem escarificação (3,23) apresentaram maiores valores para o índice de velocidade de germinação. Na mesma altitude, sementes de maracujá amarelo escarificadas (5,53 cm) e tratadas com ácido giberélico (5,83 cm) apresentaram maiores valores para o comprimento da parte aérea (Tabela 2).

O ácido giberélico destaca-se entre os mais estudados na germinação de sementes do gênero *Passiflora* spp. conforme mostrado em trabalhos desenvolvidos por Wagner Júnior et al. (2007) em sementes de maracujá doce, Lima et al. (2009) em sementes de maracujá amarelo e Santos et al. (2013) em sementes de maracujá amarelo. As giberelinas podem ser exigidas na germinação de sementes para as etapas de ativação do crescimento vegetativo do embrião, principalmente por promover o alongamento das raízes primárias (HOPKINS; HUNER, 2004).

Em baixa altitude, as sementes de maracujá amarelo sem escarificação apresentaram maiores valores de germinação (71%) e índice de velocidade de germinação (1,79). Na mesma altitude, sementes de maracujá amarelo escarificadas e tratadas com ácido giberélico (5,72 e 5,80 cm, respectivamente) apresentaram maiores valores de comprimento da parte aérea em relação ao maracujá roxo e doce (Tabela 2).

Sementes de maracujá amarelo situadas em alta altitude apresentaram maiores valores de germinação e vigor em relação às sementes de maracujá roxo e doce.

Sementes de maracujá amarelo e roxo, independente do tratamento pré-germinativo, e sementes de maracujá doce escarificadas e tratadas com ácido giberélico apresentaram maiores valores de germinação e vigor.

A procedência ou o local em que as sementes são coletadas e as plantas matrizes produzidas é um dos fatores que podem influenciar na qualidade fisiológica das sementes (SILVA; DANTAS, 2013).

Dessa forma, verificou-se que os testes de avaliação de qualidade fisiológica de sementes foram eficientes para diferenciar as procedências de sementes de maracujá em níveis de vigor conforme verificado por Lazarotto et al., (2013) em sementes de cedro.

Os resultados de massa fresca e seca das plântulas de *Passiflora* spp. estão apresentados na tabela 3. Observou-se que houve interação significativa entre altitudes x tratamentos x espécies para as massas fresca e seca de plântulas.

Tabela 3 - Massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de espécies de *Passiflora* spp. cultivadas em diferentes altitudes e tratadas em laboratório.

		MF (mg)			MS (mg)		
		E	GA ₃	SE	E	GA ₃	SE
MA	A	73,61 bCα*	87,69 aBα	102,92 aAα	6,30 bBβ	7,80 aAα	6,92 abBα
	M	77,18 abBα	88,62 aAα	71,10 bBα	6,43 bABβ	7,18 aAα	6,36 bBα
	B	84,28 aAα	87,18 aAα	73,13 bBα	7,81 aAβ	7,13 aAα	7,55 aAα
MR	A	73,73 aAα	71,28 bAβ	65,30 aAβ	7,53 aAα	7,07 aAα	7,47 aAα
	M	74,75 aAα	78,07 abAβ	69,60 aAα	5,96 bAβ	5,95 bAβ	5,43 cAβ
	B	81,21 aABα	86,86 aAα	72,92 aBα	7,13 aAβ	7,31 aAα	6,66 bAβ
MD	A	59,50 aAβ	55,00 aAγ	51,75 aAγ	7,95 aAα	7,61 aAα	5,50 bBβ
	M	62,50 aAβ	57,00 aABγ	52,50 aBβ	8,25 aAα	6,50 bBαβ	5,25 bCβ
	B	63,39 aAβ	60,59 aAβ	54,15 aAβ	7,95 aAα	7,61 aAα	7,65 aAα

*Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna (altitude), maiúscula na linha (tratamento), letras gregas minúsculas na coluna (espécie) não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Legenda: MA = maracujá amarelo; MR = maracujá roxo; MD = maracujá doce; A = altitude alta; M = altitude média; B = altitude baixa; E = escarificação física; GA₃ = ácido giberélico; SE = sem escarificação.

As plântulas obtidas de sementes de maracujá amarelo sem escarificação em alta altitude apresentaram maiores valores de massa fresca (102,92 mg) em relação às altitudes e aos tratamentos, cujos valores foram 71,10 mg (média) e 73,13 mg (baixa) e 73,61 mg (sementes escarificadas), 87,69 mg (sementes tratadas com ácido giberélico), respectivamente. Em alta altitude, plântulas de sementes de maracujá amarelo tratadas com ácido giberélico e sem escarificação (87,69 e 102,92 mg, respectivamente) apresentaram maiores acúmulos de massa fresca em relação às plântulas de maracujá roxo e doce. Em plântulas oriundas de sementes de maracujá amarelo de média altitude, tratadas com ácido giberélico apresentaram maiores valores de massa fresca (88,62 mg) (Tabela 3).

Com relação à massa seca, as sementes de maracujá amarelo de alta altitude, tratadas com ácido giberélico apresentaram maiores valores de massa seca (7,80 mg) em relação aos demais tratamentos, que foram 6,30 mg (sementes escarificadas) e 6,92 mg (sementes sem escarificação). No entanto, não houve diferença entre as altitudes. Para as sementes de maracujá roxo sem escarificação situadas em alta altitude apresentaram maiores valores (7,47 mg) em relação às altitudes, não diferindo entre os tratamentos em alta altitude. As sementes de

maracujá doce escarificadas situadas em média altitude apresentaram maiores valores entre os tratamentos (8,25 mg), no entanto, não houve diferença entre as altitudes. Em média e baixa altitudes plântulas de maracujá doce escarificadas (8,25 e 7,95 mg, respectivamente) apresentaram maiores valores de massa seca em relação ao maracujá roxo e doce (Tabela 3).

Na figura 1 estão apresentados os gráficos de frequência relativa de germinação (%) das espécies de *Passiflora* spp. nas diferentes altitudes e nos tratamentos.

Verifica-se que houve distribuição desuniforme ao longo do tempo, representadas por curvas assimétricas, nas altitudes e nos tratamentos (Figura 1). Essa assimetria na frequência demonstra uma heterogeneidade fisiológica das sementes.

A distribuição apresentou comportamento polimodal, com mais de um pico, demonstrando baixa sincronização da protrusão da raiz primária para as espécies.

Sementes de maracujá doce sem escarificação provenientes de baixa altitude apresentaram maior frequência relativa de germinação e sementes de maracujá amarelo escarificadas situadas em alta altitude apresentaram maior tempo médio de germinação (25 dias).

A irregularidade observada com a distribuição da germinação no tempo nas três espécies de maracujazeiros com sementes intactas e escarificadas também foi verificada por Tiradentes (2011).

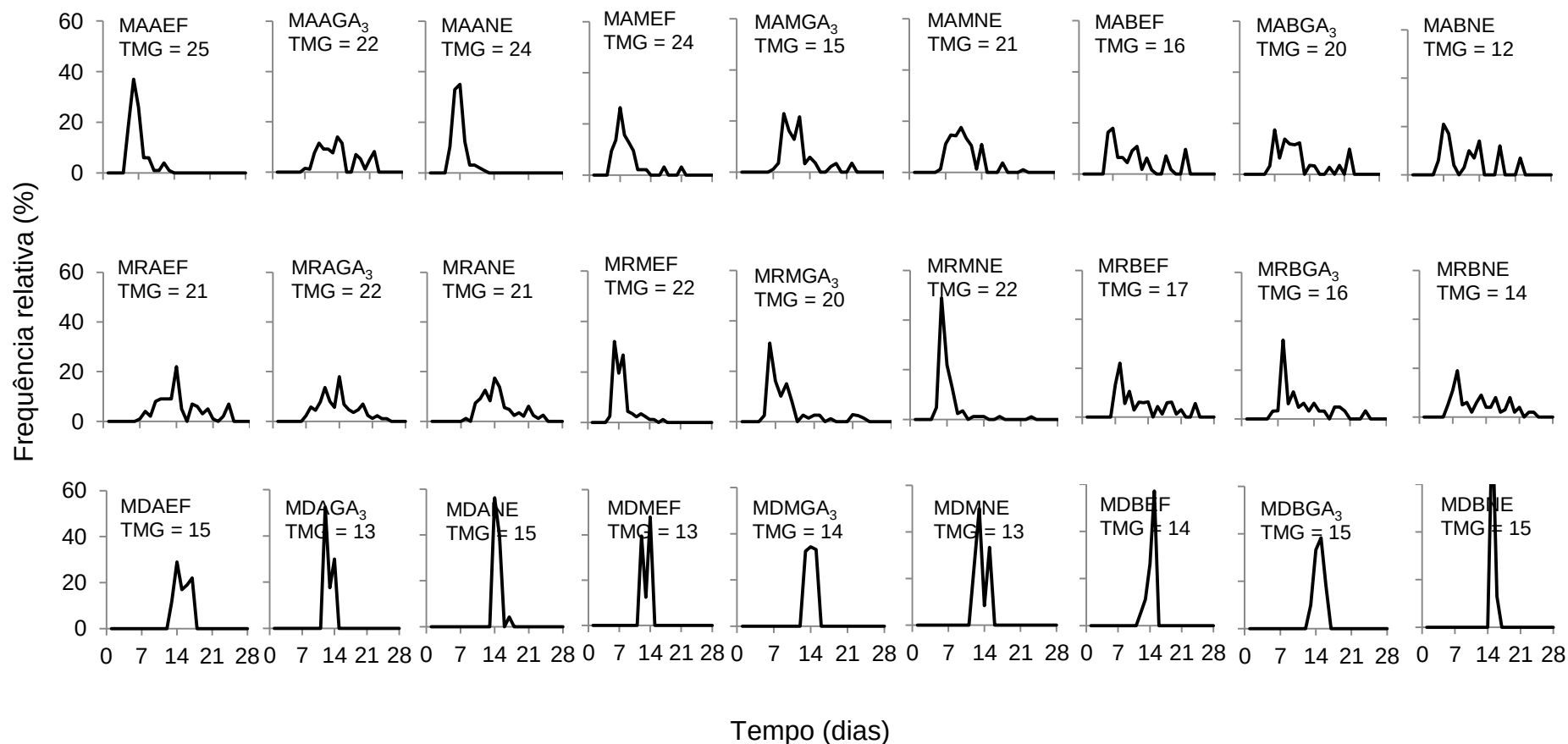


Figura 1 - Frequência relativa de germinação (%) de espécies de *Passiflora* spp. em diferentes altitudes e tratamentos.

Legenda: MA = maracujá amarelo; MR = maracujá roxo; MD = maracujá doce; A = altitude alta; M = altitude média; B = altitude baixa; E = escarificação física; GA₃ = ácido giberélico; SE = sem escarificação; TMG = tempo médio de germinação (dias).

Na tabela 4 estão os resultados obtidos de emergência, índice de velocidade de emergência, diâmetro do coleto e massa seca em casa de vegetação. Observa-se que houve interação significativa entre altitudes x tratamentos x espécies para emergência, índice de velocidade de emergência, diâmetro do coleto e massa seca.

Tabela 4 - Emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), diâmetro do coleto (DC) e massa seca (MS) de plântulas de espécies de *Passiflora* spp. cultivadas em diferentes altitudes e tratadas casa de vegetação.

		E (%)			IVE		
		E	GA ₃	SE	E	GA ₃	SE
MA	A	78 bBβ*	98 aAα	93 aAα	1,52 aBα	1,95 aAα	1,80 aAα
	M	67 cBβ	90 aAα	91 aAα	1,24 bBβ	1,81 aAα	1,66 aAα
	B	89 aAα	91 aAα	90 aAα	1,63 aAα	1,76 aAα	1,69 aAα
MR	A	89 aABα	80 bBβ	93 aAα	1,66 aAα	1,48 bAβ	1,67 aAα
	M	93 aAα	93 aAα	92 aAα	1,65 aAα	1,83 aAα	1,73 aAα
	B	74 bAβ	81 bAα	63 bBβ	1,41 bAα	1,46 bAβ	1,15 bBβ
MD	A	22 aAγ	30 aAγ	31 bAβ	0,24 aAβ	0,39 abAγ	0,34 abAβ
	M	20 aAγ	13 bAβ	20 cAβ	0,20 aAγ	0,21 bAβ	0,20 bAβ
	B	12 aBγ	36 aAβ	44 aAγ	0,21 aBβ	0,43 aAγ	0,54 aAγ
		DC (mm)			MS (mg)		
		E	GA ₃	SE	E	GA ₃	SE
MA	A	1,33 aAα	1,17 bAα	1,21 bAα	44,03aAαβ	39,80 aAβ	34,75 bAβ
	M	1,39 aAα	1,33 aABα	1,23 bBα	51,80 aAβ	48,67 aAα	36,24 bAβ
	B	1,27 aABα	1,23 abBα	1,40 aAα	56,24 aAα	47,11 aAα	52,75 aAβ
MR	A	1,17 aAα	1,23 abAα	1,29 aAα	39,80 aAβ	36,71 aAβ	35,40 aAβ
	M	1,26 aAαβ	1,13 bAβ	1,18 aAα	33,97 aAγ	46,67 aAα	41,85 aAβ
	B	1,28 aAα	1,30 aAα	1,24 aAβ	27,53 aAβ	41,04 aAα	33,39 aAγ
MD	A	1,30 aAα	1,16 aAα	1,26 aAα	58,77 bAα	63,57 aAα	67,99 bAα
	M	1,22 aAβ	1,16 aAβ	1,26 aAα	74,75 aAα	54,91 aBα	61,65 bABα
	B	1,17 aAα	1,16 aAα	1,23 aAβ	50,03 bBα	38,51 bBα	86,09 aAα

*Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna (altitudes), maiúscula na linha (tratamentos), letras gregas minúsculas na coluna (espécies) não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Legenda: MA = maracujá amarelo; MR = maracujá roxo; MD = maracujá doce; A = altitude alta; M = altitude média; B = altitude baixa; E = escarificação física; GA₃ = ácido giberélico; SE = sem escarificação.

As sementes de maracujá amarelo situadas em alta altitude tratadas com ácido giberélico e sem escarificação apresentaram maiores valores de emergência (98 e 93%, respectivamente) e índice de velocidade de emergência (1,95 e 1,80,

respectivamente). A pré-embebição das sementes de maracujá amarelo em GA_3 estimula a germinação de sementes e promove efeitos benéficos no vigor das plântulas (SANTOS et al., 2013). Lima et al. (2009) também observaram efeitos benéficos do GA_3 na germinação em sementes de maracujá amarelo. Sementes de maracujá amarelo sem escarificação situadas em baixa altitude apresentaram maiores valores de diâmetro do coleto (1,40 mm) e massa seca (52,75 mg) em relação às altitudes (Tabela 4).

Sementes de maracujá roxo procedentes de alta e média altitudes, escarificadas e sem escarificação apresentaram maiores valores de emergência. As mesmas tratadas com ácido giberélico procedentes de média altitude apresentaram maiores valores de índice de velocidade de emergência (1,83) (Tabela 4). A maior velocidade de emergência e o maior crescimento apresentado possivelmente estão associados à ação do ácido giberélico, que apresenta efeito marcante no processo de germinação de sementes (MAYER; POLJAKOFF-MAYBER, 1989), ativando enzimas hidrolíticas que atuam no desdobramento das substâncias de reserva (BEWLEY; BLACK, 1994), principalmente porque a aplicação de giberelinas também estimula a produção de numerosas hidrolases, como a α -amilase em células da camada de aleurona (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim, a ação da giberelina pode promover a germinação da semente estimulando o crescimento do embrião pela indução da produção de hidrolases, que irão participar da quebra e do enfraquecimento das estruturas que envolvem o embrião (HOOLEY, 1994).

Sementes de maracujá doce sem escarificação procedentes de baixa altitude apresentaram maiores valores de emergência (44%) em relação às altitudes. As mesmas, tratadas com ácido giberélico (0,43) e sem escarificação (0,54) situadas em baixa altitude apresentaram maiores valores de índice de velocidade de emergência e maiores valores de massa seca foram encontrados em sementes de maracujá doce sem escarificação situadas em baixa altitude (86,09 mg) (Tabela 4).

Em alta altitude, sementes de maracujá amarelo tratadas com ácido giberélico apresentaram maiores valores de emergência (98%) e índice de velocidade de emergência (1,95) em comparação com as sementes de maracujá roxo e doce. Sementes de maracujá roxo escarificadas apresentaram maiores valores de emergência (89%) e na mesma altitude, sementes de maracujá doce tratadas com ácido giberélico (63,57 mg) e sem escarificação (67,99 mg) apresentaram maiores

valores para massa seca em relação às outras espécies (Tabela 4).

Em média altitude, sementes de maracujá amarelo escarificadas (1,39 mm) e tratadas com ácido giberélico (1,33 mm) apresentaram maiores valores de diâmetro do coleto e na mesma altitude, sementes de maracujá roxo escarificadas apresentaram maiores valores de emergência e índice de velocidade de emergência (93% e 1,65, respectivamente). Sementes de maracujá doce escarificadas (74,75 mg) e sem escarificação (61,65 mg) apresentaram maiores valores de massa seca em média altitude em relação ao maracujá amarelo e roxo (Tabela 4).

Em baixa altitude, sementes de maracujá amarelo escarificadas e sem escarificação (89 e 90%, respectivamente) apresentaram maiores valores de emergência e maiores valores para o índice de velocidade de emergência foram observados para as mesmas sementes tratadas com ácido giberélico (1,76) e sem escarificação (1,69) e maiores valores de diâmetro do coleto (1,40 mm) na mesma altitude em relação ao maracujá roxo e doce (Tabela 4).

Sementes de diferentes procedências manifestam a variabilidade genética da espécie e as relações entre essa variabilidade com o ambiente (FERREIRA; ARAÚJO, 1981). Araújo Neto et al. (2013) verificaram que a germinação e o vigor de sementes de pinha (*Annona squamosa* L.) também são influenciadas significativamente pelas procedências.

Sementes de maracujá amarelo apresentaram maiores valores de emergência e vigor em casa de vegetação em relação às outras espécies. O vigor é determinado pela velocidade de emergência de plântulas em condições de campo, e/ou casa de vegetação, e quanto mais vigorosa a semente, mais rápida será a emergência (OLIVEIRA et al., 2009).

Na figura 2 estão apresentadas as frequências relativas de emergência (%) das três espécies de *Passiflora* spp. avaliadas em diferentes altitudes e tratamentos. Houve uma distribuição desuniforme ao longo do tempo, representada por curvas assimétricas, nas altitudes e nos tratamentos. A distribuição apresentou comportamento polimodal, com mais de um pico, demonstrando baixa sincronização da protrusão da raiz primária para as espécies.

As sementes de maracujá roxo tratadas com ácido giberélico situadas em média altitude, apresentaram maior frequência relativa de emergência. Essa assimetria na

frequência demonstra uma heterogeneidade fisiológica das sementes (Figura 2).

A origem da semente é um fator importante na germinação e diferentes populações de plantas podem manifestar variabilidade genética, resultando em diferentes comportamentos germinativos (RODRIGUES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008). O comportamento germinativo e as diferenças adaptativas da espécie nos “habitats” onde as populações ocorrem, contribuem para o sucesso ecológico e evolutivo da espécie (COELHO et al., 2013).

As sementes de maracujá doce apresentaram menor frequência relativa de emergência em relação aos maracujás amarelo e roxo. Foi possível observar que a germinação de sementes de *P. alata* Curtis foi heterogênea, ou seja, não apresentou sincronização, o que confirma a distribuição polimodal da frequência relativa da germinação (FERRARI, 2009). Ainda para esta espécie, observou-se o maior tempo médio de emergência (27 dias) em média altitude escarificada (Figura 2).

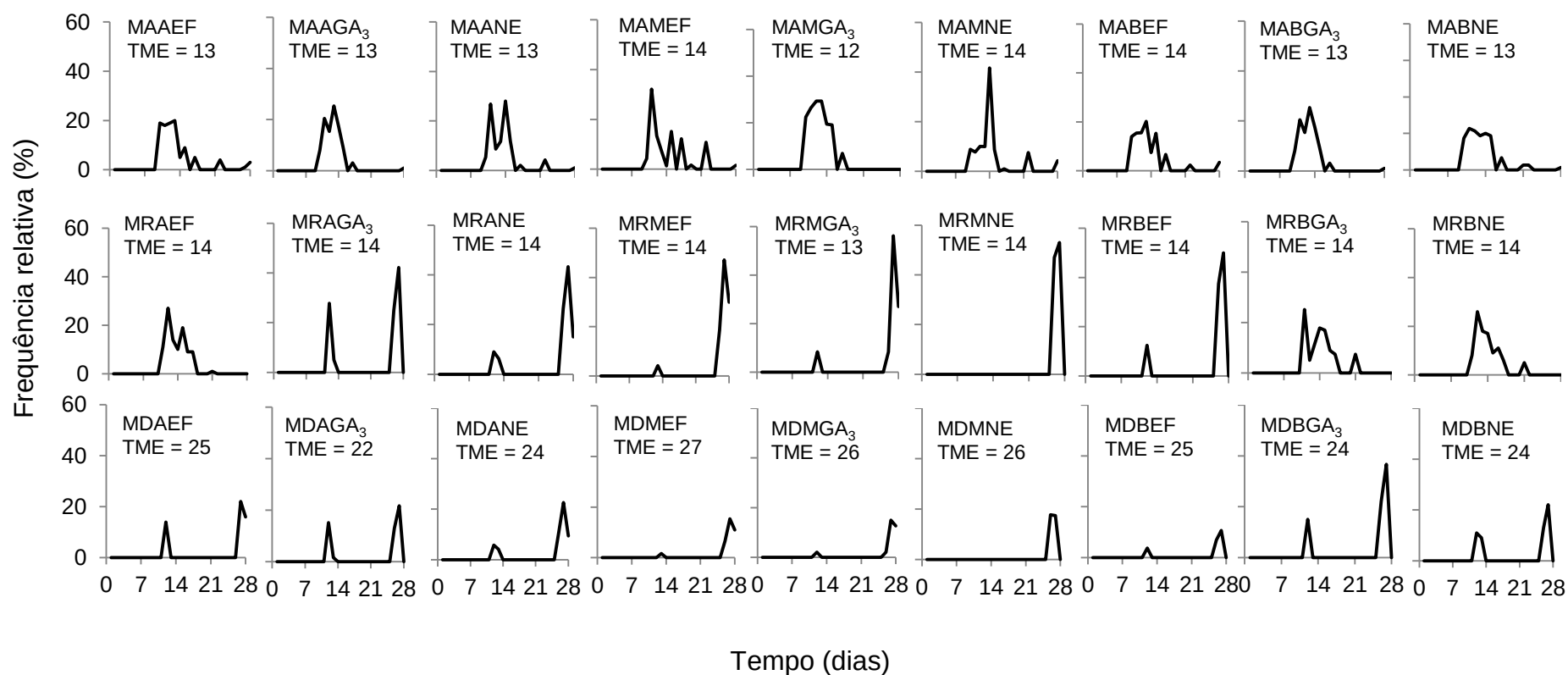


Figura 2 - Frequência relativa de emergência (%) de espécies de *Passiflora* spp. em diferentes altitudes e tratamentos.

Legenda: MA = maracujá amarelo; MR = maracujá roxo; MD = maracujá doce; A = altitude alta; M = altitude média; B = altitude baixa; E = escarificação física; GA₃ = ácido giberélico; SE = sem escarificação; TMG = tempo médio de emergência (dias).

Os resultados do teor de água das sementes de maracujá amarelo estão descritos na tabela 5. Verifica-se para cada tempo de envelhecimento (tradicional e com saturação salina), evidência que houve aumento na umidade das sementes pelo método tradicional, enquanto o método de envelhecimento em saturação salina provocou leve queda no teor de água, mantendo-se por todos os períodos de envelhecimento com pouca alteração. Segundo Tunes et al. (2011), o teste de envelhecimento acelerado pode promover maior absorção de água pelas sementes devido à exposição à atmosfera úmida. A variação do teor de água das sementes pode aumentar o processo de deterioração, pois quanto maior o teor de água das sementes, maior a sensibilidade à alta temperatura e umidade relativa do ar que ocorrem durante o teste (LIMA et al., 2011).

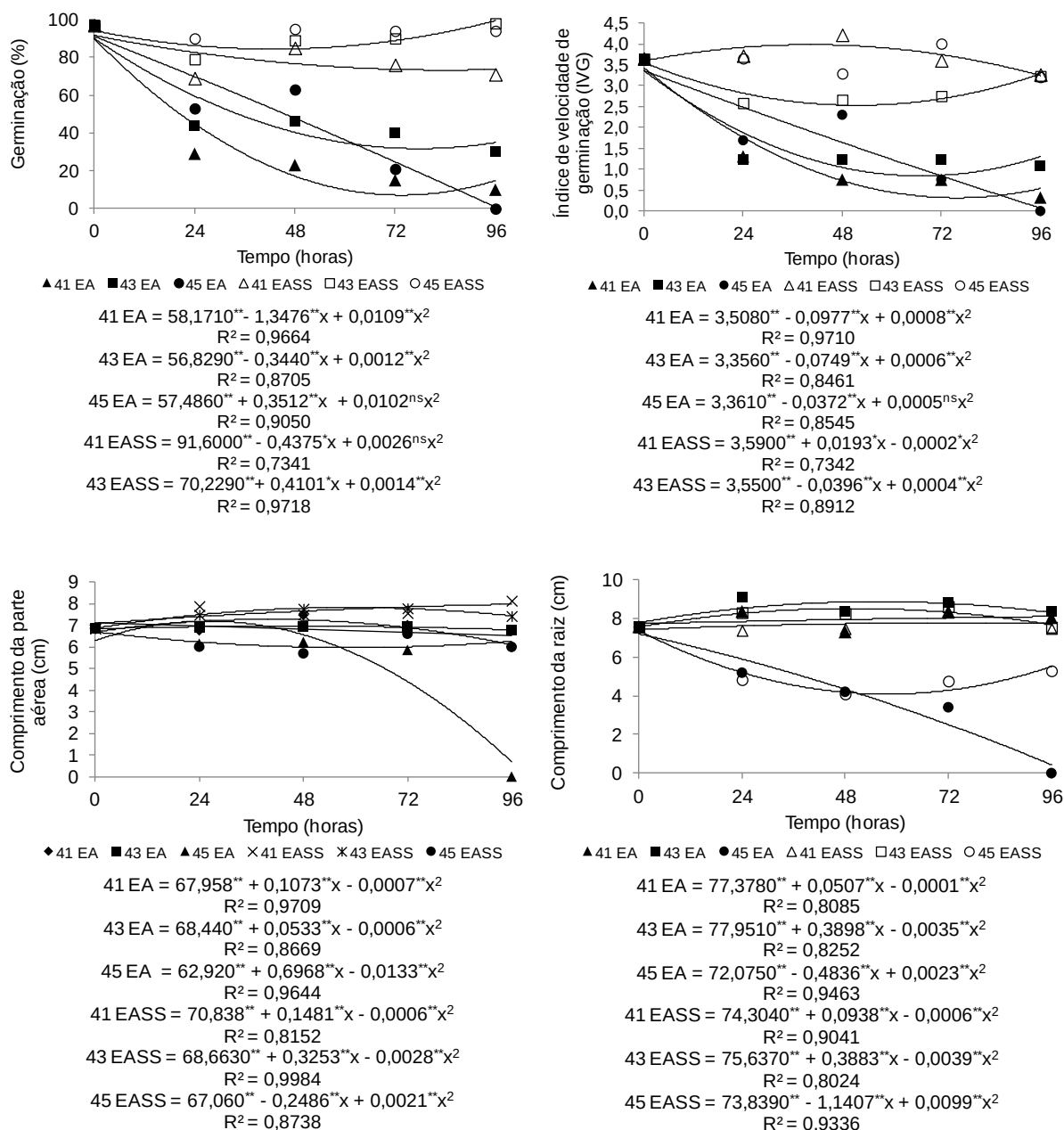
Tabela 5 - Teor de água (%) de sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener após o envelhecimento acelerado tradicional (EA) e o envelhecimento acelerado com saturação salina (EASS) nas temperaturas de 41, 43 e 45 °C por 0, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição.

Tempos (h)	EA			EASS		
	Temperaturas (°C)					
	41	43	45	41	43	45
0	11	11	11	11	11	11
24	14	16	13	10	10	9
48	16	18	11	9	7	9
72	14	15	22	9	8	9
96	16	18	20	8	8	9

As sementes mais úmidas são mais afetadas pelas condições do envelhecimento acelerado, apresentando maior grau de deterioração. (Tabela 5). Dessa forma, o uso de solução salina (NaCl) contribuiu para retardar a absorção de água pelas sementes durante o envelhecimento das mesmas (TORRES et al., 2009). Fato que pode ser atribuído à diferença de potencial osmótico entre a solução e a semente, o que pode exercer efeito negativo na germinação.

Na figura 3 estão descritos a germinação, o índice de velocidade de germinação, o comprimento da parte aérea e raiz, a massa fresca e seca de sementes de maracujá amarelo submetidas ao envelhecimento acelerado tradicional (EA) e o envelhecimento acelerado com saturação salina (EASS).

Para o envelhecimento acelerado tradicional (EA), o efeito da temperatura foi não significativo para a massa fresca e seca a 41 e 43 °C, enquanto para o método de envelhecimento acelerado com saturação salina com NaCl (EASS), foi não significativo para a germinação e o índice de velocidade de germinação a 45 °C, massa fresca a 41 °C e massa seca a 41 e 45 °C (Figura 3).



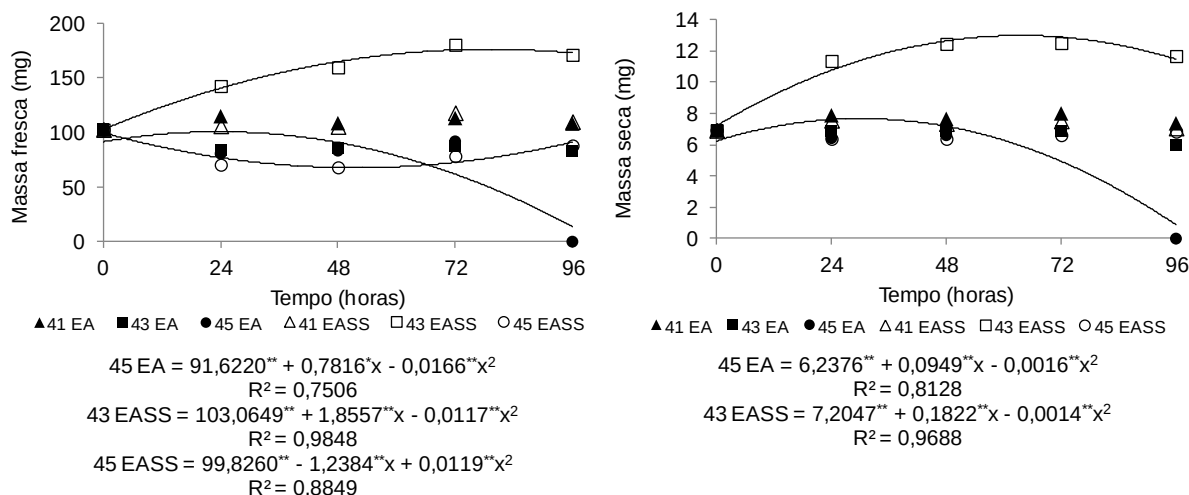


Figura 3 - Germinação (%), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (cm), comprimento da raiz (cm), massa fresca (mg) e massa seca (mg) de plântulas de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener após o envelhecimento acelerado tradicional (EA) e envelhecimento acelerado com saturação salina (EASS) nas temperaturas de 41, 43 e 45 °C por 0, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição.

No envelhecimento acelerado tradicional, o aumento da temperatura e o período de envelhecimento proporcionaram redução da germinação e do vigor das sementes de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener. A maior exposição ao EA, na temperatura de 45 °C reduziu a germinação e o desenvolvimento da plântula, o que é esperado, pois quanto maior a exposição ao EA, maior é a taxa de deterioração das sementes. A temperatura de 45 °C foi drástica para as sementes durante o período de envelhecimento, não houve germinação e vigor no período de 96 horas de exposição. O teste de envelhecimento acelerado em sementes de crambe na temperatura de 45 °C foi letal apresentando 0% de germinação, com 96 horas de exposição (WERNER et al., 2013).

A exposição ao envelhecimento acelerado pode reduzir a qualidade fisiológica e também a viabilidade das sementes, corroborando com LARRÉ et al. (2007) em sementes de maracujá amarelo.

Para o envelhecimento acelerado com saturação salina, o aumento da temperatura e do tempo de exposição não proporcionou deterioração das sementes. A

temperatura de 43 °C, inicialmente, estimulou a germinação e o vigor das sementes após 72 horas de exposição, no qual exibiu maior sensibilidade para o potencial fisiológico. Esse período de 72 horas de envelhecimento, tanto no procedimento tradicional quanto em solução saturada de NaCl, corrobora com o encontrado por Torres et al. (2009) em sementes de melão (Figura 3).

A adição do NaCl faz com que as sementes não absorvam muita água (proporciona uma menor umidade relativa do ar quando comparado apenas com água no envelhecimento acelerado tradicional) e não sofram um processo de deterioração acentuado, mesmo diante de uma metodologia que causa um estresse nas sementes com a utilização de alta temperatura (TUNES et al., 2011). A umidade relativa do ar está diretamente relacionada com o conteúdo de água das sementes, que influencia vários processos metabólicos nas sementes, enquanto a temperatura afeta a velocidade com que os processos bioquímicos ocorrem e interfere indiretamente no conteúdo de água das sementes (BEWLEY; BLACK, 1994).

Os resultados do teor de água das sementes de *Passiflora* spp. estão descritos na tabela 6. Os teores de água das sementes envelhecidas oscilaram entre 9,2 e 13%, sendo o menor valor observado no maracujá doce situado em baixa altitude 9,2% e o maior valor para o mesmo em alta altitude.

Tabela 6 - Teor de água (%) de espécies de *Passiflora* spp. antes e após o envelhecimento acelerado com saturação salina na temperatura de 43 °C por 72 horas de exposição.

Espécies	Teor de água (%)	
	Não envelhecida	Envelhecida
<i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>		
Alta altitude	8,4 aB*	11,5 bA
Média altitude	9,4 aA	9,8 cA
Baixa altitude	9,3 aB	10,2 cA
<i>Passiflora edulis</i>		
Alta altitude	9,0 aB	11,5 bA
Média altitude	9,5 aB	12,5 aA
Baixa altitude	9,2 aB	10,0 cA
<i>Passiflora alata</i>		
Alta altitude	9,1 aB	13,0 aA
Média altitude	9,3 aB	11,0 bA
Baixa altitude	8,8 aA	9,2 cA

*Médias seguidas de mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não

diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade.

Os teores de água das sementes não envelhecidas oscilaram entre 8,4 e 9,5%, sendo o menor valor observado para o maracujá amarelo situado em alta altitude e o maior valor para o maracujá roxo em média altitude (Tabela 6). Essa variação de 1,1% dos teores de água para as diferentes espécies é importante na padronização das avaliações de qualidade fisiológica de sementes e obtenção de resultados consistentes (MARCOS FILHO, 2005).

As sementes de maracujá envelhecidas apresentaram maiores teores de água em comparação com as sementes não envelhecidas, porém para o maracujá amarelo em média altitude e doce em baixa altitude não houve diferença significativa (Tabela 6). O envelhecimento acelerado com saturação salina com NaCl contribuiu para retardar a absorção de água pelas sementes (ALVES; SÁ, 2012).

A tabela 7 mostra os resultados de germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento da parte aérea, massa fresca e seca. Houve interação significativa entre espécies x altitudes x envelhecimento para germinação, índice de velocidade de germinação, comprimento da parte aérea, massa fresca e seca.

Verifica-se que a exposição das sementes de maracujá ao envelhecimento a 43 °C por 72 horas não influenciou na germinação das sementes não envelhecidas, mas houve diferença significativa para sementes de maracujá doce em média altitude, não envelhecidas e envelhecidas. O envelhecimento a 43 °C, nos períodos de 48, 72 e 96 horas promoveu incremento da percentagem de germinação de sementes de crambe (AMARO et al., 2014). Para o vigor, houve diferença significativa para sementes não envelhecidas e envelhecidas (Tabela 7).

O teste de envelhecimento acelerado com saturação salina diferenciou as espécies nas diferentes altitudes. Sementes de maracujá roxo provenientes de média altitude, envelhecidas apresentaram maior valor de germinação (95%) e índice de velocidade de germinação (3,06). Sementes de maracujá amarelo de alta altitude, envelhecidas apresentaram maiores valores para comprimento da parte aérea (7,63 cm) e de massa fresca (176,83 mg). Sementes de maracujá doce de alta altitude, envelhecidas apresentaram maior valor de massa seca (16,50 mg) (Tabela 7).

Tabela 7 - Germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de espécies de *Passiflora* spp. submetidas ao envelhecimento acelerado com saturação salina na temperatura de 43 °C por 72 horas.

G (%)			IVG			CPA (cm)			MF (mg)			MS (mg)		
MA	MR	MD	MA	MR	MD	MA	MR	MD	MA	MR	MD	MA	MR	MD
A 97a	A 85a	A 24ab	B 3,65a	A* 1,56b	B 0,40a	C 6,88a	A 4,20 a	B 6,13a	A* 102,92 a	A 73,73 a	B 59,50 a	C 6,93 ab	A 7,53a	A 7,95 a
NEM 83b	A 87a	A 36 a	B* 2,11b	B 2,98a	A 0,65a	C* 4,47b	A 4,71 a	B 3,00b	B 71,10 b	A 74,75 a	B 57,00 a	B 6,36 b	A 5,96b	A 6,50 a
B 71b	A 67b	A 12 b	B 1,79b	A 1,57b	A 0,21a	B 4,64b	A 4,41 a	AB 3,50b	B 73,13 b	A* 81,21 a	B 60,59 a	A 7,55 a	A 7,13a	A 7,61 b
A 93a	A 82b	A 22 a	B 2,83a	A 1,84b	B* 0,23a	C 7,63a	A 5,13ab	B* 3,34a	C* 176,83a	A* 88,91 a	C* 121,50a	B* 12,12a	B* 8,48a	C* 16,50a
E M 79b	B 95a	A 20 a	A* 2,82a	A 3,06a	A 0,19a	B 4,58b	B 6,06 a	A* 3,32a	B 73,33 b	A 85,80a	B 91,00 b	A* 6,29 b	B 6,68b	B 8,75 b
B 64c	A 60c	A 19 a	A* 2,20b	A 2,18b	A 0,38a	B 4,82b	A 4,71 b	A 4,25a	B 75,84 b	B 74,69 b	B 122,38a	A* 6,26 b	B 6,38b	B 15,55a

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna (altitudes), maiúscula na linha (espécies), asterisco (envelhecimento) não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Legenda: MA = maracujá amarelo; MR = maracujá roxo; MD = maracujá doce; A = altitude alta; M = altitude média; B = altitude baixa; NE = sementes não envelhecidas; E = sementes envelhecidas.

Existem variações individuais devidas às influências de fatores bióticos e abióticos, mesmo dentro da mesma espécie durante o desenvolvimento das sementes, e à variabilidade genética (SANTOS et al., 2009).

Na tabela 8 estão as médias de germinação, o índice de velocidade de germinação, o comprimento da parte aérea, da raiz, a massa fresca e seca de plântulas de maracujazeiro submetidas à deterioração controlada.

Tabela 8 - Médias de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), da raiz (CR), massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener submetidas à deterioração controlada na temperatura de 45 °C, com (17, 22 e 25%) de umidade nos tempos de 24 e 48 horas.

U (%)	G (%)			IVG			CPA (cm)		
	24	48	$\bar{X}$	24	48	$\bar{X}$	24	48	$\bar{X}$
17	88	77	83 B*	2,61	2,18	2,39 B	4,64	4,55	4,59 A
22	99	99	99 A	3,23	2,72	2,97 A	4,59	4,89	4,74 A
25	99	94	97 A	3,43	2,52	2,97 A	4,70	4,65	4,67 A
$\bar{X}$	95 A	90 B	-	3,09 A	2,47 B	-	4,64 A	4,69 A	-
	CR (cm)			MF (mg)			MS (mg)		
	24	48	$\bar{X}$	24	48	$\bar{X}$	24	48	$\bar{X}$
17	4,80	4,61	4,71 B	86,01	84,12	85,06 A	7,30	7,28	7,29 A
22	5,91	6,19	6,05 A	89,55	88,91	88,91 A	7,03	6,98	7,00 A
25	5,81	6,02	5,91 A	90,35	87,13	87,13 A	7,11	6,40	6,75 A
$\bar{X}$	5,50 A	5,61 A	-	88,63 A	85,43 A	-	7,14 A	6,88 A	-

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Não houve interação significativa entre as umidades e o tempo de exposição das sementes pelo teste de deterioração controlada. As sementes de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener submetidas à deterioração controlada por 24 horas apresentaram maior média de germinação (95%) e índice de velocidade de germinação (3,09). Para o comprimento da parte aérea, da raiz, massa fresca e seca não houve diferença significativa entre os tempos (24 e 48 horas) de exposição à deterioração controlada (Tabela 8).

Sementes de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener apresentaram maiores médias para a germinação, o índice de velocidade de germinação e o comprimento

de raiz com 22 e 25% de umidade. Nos teores de água (17, 22 e 25%) não houve diferença significativa para comprimento da parte aérea, massa fresca e seca (Tabela 8).

O teste de deterioração controlada para sementes da espécie *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener sugere que o ajuste no grau de umidade seja tal que o período de 24 horas a 45 °C permita a melhor diferenciação na germinação e índice de velocidade de germinação com 22 e 25% de umidade. Porém, para o vigor, o tempo de exposição (24 e 48 horas) e as umidades (17, 22 e 25%) permitiram resultados favoráveis a 45 °C. Segundo Torres et al. (2013), a combinação de 24h/45 °C tem sido uma das mais utilizadas, sendo recomendadas para sementes de quiabo.

Na tabela 9 estão apresentados os valores de índice de velocidade de germinação, comprimento da parte aérea e massa fresca. Houve interação significativa entre espécies x altitudes para índice de velocidade de germinação, comprimento da raiz e massa fresca para a deterioração controlada a 45 °C, com 25% de umidade durante 24 horas.

Tabela 9 - Índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da raiz (CR) e massa fresca (MF) de plântulas de espécies de *Passiflora* spp. cultivadas em diferentes altitudes submetidas a deterioração controlada na temperatura de 45 °C, com 25% de umidade no tempo de 24 horas.

IVG			CR (cm)			MF (mg)			
MA	MR	MD	MA	MR	MD	MA	MR	MD	
A	3,43 aA*	2,50 bB	0,77 aC	5,81 abB	5,80 aB	8,00 aA	90,35 aA	79,49 aA	58,00 aB
M	3,05 bA	3,15 aA	0,70 aB	6,05 aB	7,24 aA	8,00 aA	74,86 bA	78,50 aA	56,75 aB
B	1,83 cB	2,53 bA	0,57 aC	5,03 bA	5,31 bA	5,81 bA	66,50 bA	74,42 aA	69,71 aA

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Legenda: MA = maracujá amarelo; MR = maracujá roxo; MD = maracujá doce; A = altitude alta; M = altitude média; B = altitude baixa.

Sementes de maracujá amarelo situadas em alta altitude apresentaram maior valor de índice de velocidade de germinação (3,43). Sementes de maracujá doce situadas

em alta e média altitudes apresentaram maiores valores de comprimento da raiz (8 e 8 cm, respectivamente). Sementes de maracujá amarelo e roxo situadas em alta altitude apresentaram maiores valores de massa fresca (90,35 e 79,49 mg, respectivamente) (Tabela 9).

O teste de deterioração controlada na temperatura de 45 °C, com 25% de umidade durante 24 horas diferenciou as espécies nas diferentes altitudes. Para as sementes de girassol da cultivar Catissol o ajuste do teor de água para 20 e 24% no teste de deterioração controlada não foi eficiente para provocar a separação entre os lotes (OLIVEIRA et al., 2013).

Os valores de germinação, comprimento da parte aérea e massa seca de plântulas de *Passiflora* spp. com 24 horas de exposição estão apresentados na tabela 10. As sementes de maracujá amarelo e roxo apresentaram maiores médias de germinação (87 e 84%, respectivamente) e comprimento da parte aérea (4,52 e 4,44 cm, respectivamente) das plântulas em relação às sementes de maracujá doce. O maracujá doce apresentou maior média para a massa seca (7,35 mg).

Tabela 10 - Germinação (G), comprimento da parte aérea (CPA) e massa seca (MS) de plântulas de espécies de *Passiflora* spp. cultivadas em diferentes altitudes submetidas a deterioração controlada na temperatura de 45 °C, com 25% de umidade no tempo de 24 horas.

	G (%)				CPA (cm)				MS (mg)			
	MA	MR	MD	$\bar{X}$	MA	MR	MD	$\bar{X}$	MA	MR	MD	$\bar{X}$
A	99	88	30	72 A*	4,70	4,39	3,34	4,14 A	7,11	6,68	8,05	7,28 A
M	88	87	20	65 A	4,31	4,48	3,32	4,03 A	5,79	5,78	7,05	6,20 B
B	74	78	21	57 B	4,55	4,45	3,75	4,25 A	5,22	5,03	6,96	5,74 B
$\bar{X}$	87 A	84 A	24 B	-	4,52 A	4,44 A	3,47 B	-	6,04 B	5,83 B	7,35 A	-

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Legenda: MA = maracujá amarelo; MR = maracujá roxo; MD = maracujá doce; A = altitude alta; M = altitude média; B = altitude baixa.

Sementes situadas em alta e média altitudes submetidas ao teste de deterioração controlada com 25% de umidade no tempo de 24 horas apresentaram maiores médias para a germinação (72 e 65%, respectivamente), em relação à baixa altitude

(57%). Não houve diferença significativa entre as médias de altitudes para o comprimento da parte aérea. Sementes de maracujá de alta altitude apresentaram maior média para a massa seca (7,28 mg) em relação à média e baixa altitude, que foram 6,20 e 5,74 mg, respectivamente (Tabela 10).

4.4 CONCLUSÕES

Sementes sem escarificação de maracujá amarelo, escarificadas de maracujá roxo e maracujá doce tratadas com ácido giberélico apresentam maiores valores de germinação e vigor.

Sementes de maracujá amarelo apresentam qualidade fisiológica superior em relação às demais espécies.

Sementes de maracujá localizadas em alta altitude apresentam maior germinação e vigor.

O envelhecimento acelerado com saturação salina a 43 °C por 72 horas e o teste de deterioração controlada na temperatura de 45 °C, com 25% de umidade durante 24 horas diferenciam as espécies nas diferentes altitudes.

4.5 REFERÊNCIAS

ALVES, C. Z.; SÁ, M. E. de. Adequação da metodologia do teste de envelhecimento acelerado em sementes de rúcula. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 2789-2798, 2012.

AMARO, H. T. R.; DAVID, A. M. S. DE S.; SILVA NETA, I. C.; ASSIS, M. DE O.; ARAÚJO, E. F.; ARAÚJO, R. F. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst), cultivar FMS Brilhante. **Revista Ceres**, v. 61, n. 2, p. 202-208, 2014.

ARAUJO NETO, A. C.; ARAÚJO, P. C.; MOREIRA, E. S.; MOREIRA, G. L. P.; MEDEIROS, J. G. F. Germinação e vigor de sementes de pinha (*Annona squamosa* L.) de diferentes procedências. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17, p. 1548-1555, 2013.

BAALBAKI, R. Z.; ELIAS, S.; MARCOS FILHO, J.; McDONALD, M.B. **Seed vigor testing handbook**. Ithaca: AOSA, 2009, 341 p.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. Seed dormancy in trees of climax tropical vegetation types. **Tropical Ecology**, v. 46, n. 1, p. 17-28, 2005.

BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; GIOVANNI, R.; BORGES, R. A. X.; HERING, R. L. O.; SERRANO, T.; SANTOS FILHO, L. A. F. Passifloraceae. In:

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Org.). **Livro vermelho da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 830-834, 2013.

BEWLEY, D. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BINOTTI, F. F. da S.; HAGA, K. I.; CARDOSO, E. D.; ALVES, C. Z.; SÁ, M. E.; ARF, O. Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 30, n. 2, p. 247-254, 2008.

BOTEZELLI, L.; DAVIDE, A. C.; MALAVASI, M. M. Características dos frutos e sementes de quatro procedências de *Dipteryx alata vogel* (baru). **Revista Cerne**, v. 6, n. 1, p. 9-18, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS. 399 p. 2009.

CEASA. CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DO ESPÍRITO SANTO. Disponível em: <<http://www.ceasa.es.gov.br/?p=2163>>. Acesso em 6 nov 2013.

COELHO, M. D. F. B.; NETO, M. H. C.; BARBOSA, M. K. R.; OLIVEIRA, M. C. D.; LIMA, A. K. B. L. B.; SOUZA, J. W. N. D. Superação da dormência em sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea* de duas populações. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, n. 8, v. 4, p. 179-182, 2013.

FERRARI, T. B. **Metabolismo germinativo de sementes de *Passiflora alata* Curtis tratadas com giberelinas e citocinina**. Botucatu, 2009. Tese (doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009, 94 f.

FERREIRA, M.; ARAÚJO, A. J. **Procedimentos e recomendações para testes de procedências**. Curitiba: EMBRAPA/IBDF/PNPF, 1981. 28 p.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. Experimental designs: um pacote R para análise de experimentos. **Revista da Estatística da Universidade Federal de Ouro Preto**, v. 1, n. 1, p.1-9, 2011.

- FRAIFE FILHO, G. A.; LEITE, J. B. V.; RAMOS, J. V. **Maracujá**. 2010. Publicado no site da Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira/CEPLAC. Disponível: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/maracuja.htm>>. Acesso em 15 jan 2015.
- GONÇALVES, E. P.; PAULA, R. C.; DEMATTÊ, M. E. S. P.; SILVA, M. A. D. Potencial fisiológico de sementes de mutambo (*Guazuma ulmifolia* Lam.) em diferentes procedências. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, p. 218-222, 2009.
- HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. **Handbook of vigour test methods**. 3. ed. Zürich: ISTA, 1995. 117 p.
- HOOLE, Y. R. Gibberellins: perception, transduction and responses. **Plant Molecular Biology**, v. 26, p. 1529-1555, 1994.
- HOPKINS, W. G.; HÜNER, N. P. A. **Introduction to plant physiology**. 3 ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2004. 560p.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2013. **Maracujá**: área plantada e quantidade produzida. Brasília-DF. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 abr 2014.
- JIANHUA, Z.; McDONALD, M. B. The saturated salt accelerated aging test for small-seeded crops. **Seed Science and Technology**, v. 25, n. 1, p. 123-131, 1996.
- LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA, 1983. 174p.
- LABOURIAU, L. G.; VALADARES, M. E. B. On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 48, n. 2, p. 263-284, 1976.
- LARRÉ, C. F.; ZEPKA, A. P. S.; MORAES, D. M. Análise bioquímica e condutividade elétrica de sementes de maracujá submetidas a envelhecimento Acelerado. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 711-713, 2007.
- LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; DOS SANTOS, A.; MEZZOMO, R.; PIVETA, G.; BLUME, E. Qualidade fisiológica e tratamentos de sementes de *Cedrela fissilis* procedentes do Sul do Brasil. **Revista Árvore**, v. 37, n. 2, p. 201-210, 2013.

LIMA, C. B.; COSSA, C. A.; NEGRELLE, R. R. B.; BUENO, J. T.; LOURENÇO, C. C.; BATISTA, N. A.; JANANI, J. K. Germinação e envelhecimento acelerado na análise da qualidade fisiológica de sementes de alfavaca cravo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 865-874, 2011.

LIMA, C. S. M.; BETEMPS, D. L.; TOMAZ, Z. F. P.; GALARÇA, S. P.; RUFATO, A. R. Germinação de sementes e crescimento de maracujá em diferentes concentrações do ácido giberélico, tempos de imersão e condições experimentais. **Revista Brasileira Agrociência**, v. 15, n. 1-4, p. 43-48, 2009.

LOPES, J. C.; BONO, G. M.; ALEXANDRE, R. S.; MAIA, V. M. Germinação e vigor de plantas de maracujazeiro 'amarelo' em diferentes estádios de maturação do fruto, arilo e substrato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1340-1346, 2007.

MAGUIRE, J. B. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 2, p. 176-177, 1962.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.) **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999, p.1-24.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

MARTINS, C. M.; VASCONCELLOS, M. A. S.; ROSSETTO, C. A. V.; CARVALHO, M. G. Prospeção fitoquímica do arilo de sementes de maracujá amarelo e influência em germinação de sementes. **Ciência Rural**, v. 40, n. 9, p. 1934-1940, 2010.

MAYER, A. C.; POLJAKOFF-MAYBER, A. **The germination of seeds**. London: Pergamon Press, 1989. 270 p.

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

OLIVEIRA, A. C. S.; MARTINS, G. N.; SILVA, R. F.; VIEIRA, H. D. Testes de vigor em sementes baseados no desempenho de plântulas. **Inter Science Place**, v. 2, n. 4, p. 1-21, 2009.

OLIVEIRA, D. A.; NUNES, Y. R. F.; ROCHA, E. A.; BRAGA, R. F.; PIMENTA, M.

A. S.; VELOSO, M. D. M. Potencial germinativo de sementes de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth. - Fabaceae: Mimosoideae) sob diferentes procedências, datas de coleta e tratamentos de escarificação. **Revista Árvore**, v. 32, n. 6, p. 1001-1009, 2008.

OLIVEIRA, F. N.; TORRES, S. B.; VIEIRA, F. E. R.; OLIVEIRA-BENTO, S. R. S.; PAIVA, E. P. Testes de vigor baseados na tolerância a estresses em sementes de girassol. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 1, p. 78-84, 2013.

POWELL, A. A.; MATTHEWS, S. Application of the controlled deterioration test to detect seed lots of Brussels sprouts with low potential for storage under commercial conditions. **Seed Science and Technology**, v. 12, p. 649-657, 1984.

RODRIGUES, P. M. S.; SILVA, H. P.; BRAGA, L. L.; NUNES, Y. R. F.; VELOSO, M. D. M.; GONZAGA, A. P. D. Efeito da luz e da procedência na germinação de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae-Caesalpinoideae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 264-266, 2007.

SANTOS, C. A. C.; VIEIRA, E. L.; PEIXOTO, C. P.; LEDO, C. A. S. Germinação de sementes e vigor de plântulas de maracujazeiro amarelo submetidos à ação do ácido giberélico. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 2, p. 400-407, 2013.

SANTOS, F. S.; PAULA, R. C.; SABONARO, D. Z.; VALADARES, J. Biometria e qualidade fisiológica de sementes de diferentes matrizes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex A. DC) Standl. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 82, p. 163-173, 2009.

SANTOS, L. F.; OLIVEIRA, E. J.; SILVA, A. S.; CARVALHO, F. M.; COSTA, J. L.; PÁDUA, J. G. ISSR Markers as a Tool for the Assessment of Genetic Diversity in *Passiflora*. **Biochemical Genetics**, v. 49, p. 540-554, 2011.

SILVA, F. F. S.; DANTAS, B. F. Efeito da temperatura na germinação de sementes de *Sideroxylon obtusifolium* (Sapotaceae) de diferentes procedências. **Revista Sodebras**, v. 8, n. 90, p. 40-43, 2013.

TAIZ; L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2013. 820 p.

TIRADENTES, A. T. **Emergência, crescimento inicial de plântulas e enxertia hipocotilidonar por garfagem no topo em fenda cheia com miniestacas apicais para diferentes passifloráceas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias, 2011, 91 f.

TOLEDO, M. Z.; FONSECA, N. R.; CÉSAR, M. L.; SORATTO, R. P.; CAVARIANI, C.; CRUSCIOL, C. A. C. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 2, p. 124-133, 2009.

TORRES, S. B.; GOMES, M. D. A.; SILVA, F. G.; BENEDITO, C. P.; PEREIRA, F. E. C. B. Controlled deterioration to evaluate okra seed vigor. **Horticultura Brasileira**, v. 31, p. 317-321, 2013.

TORRES, S. B.; OLIVEIRA, F. N.; OLIVEIRA, A. K.; BENEDITO, C. P.; MARINHO, J. C. Envelhecimento acelerado para avaliação do potencial fisiológico de sementes de melão. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 70-75, 2009.

TUNES, L. M.; PEDROSO, D. C.; BADINELLI, P. G.; TAVARES, L. C.; RUFINO, C. A.; BARROS, A. C. S. A.; MUNIZ, M. F. B. Envelhecimento acelerado em sementes de azevém com e sem solução salina e saturada. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 33-37, 2011.

WAGNER JÚNIOR, A.; SANTOS, C. E. M.; ALEXANDRE, R. S.; SILVA, J. O. C.; NEGREIROS, J. R. S.; PIMENTEL, L. D.; ÁLVARES, V. S.; BRUCKNER, C. H. Efeito da pré embebição das sementes e do substrato na germinação e no desenvolvimento inicial do maracujazeiro-doce. **Revista Ceres**, v. 54, n. 311, p. 1-6, 2007.

WERNER, E. T.; LOPES, J. C.; GOMES JUNIOR, D.; LUBER, J.; AMARAL, J. A. T. Accelerated aging test to evaluate the quality of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst - Brassicaceae) seed physiology. **Idesia**, v. 31, p. 35-43, 2013.

YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y. Gibberellins and light-stimulated seed germination. **Journal of Plant Growth Regulation**. New York, v. 20, n. 4, p. 369-376, 2002.

ZUCARELI, C.; CASTRO, M. M.; OLIVEIRA, H. R.; BRANCALIÃO, S. R.; RODRIGUES, J. D.; ONO, E. O.; BOARO, C. S. F. Fitoreguladores e germinação de sementes de maracujá doce em condições de laboratório. **Scientia Agraria**, v. 4, n. 1-2, p. 9-14, 2003.

5 CAPÍTULO 2 - DIVERSIDADE GENÉTICA DE MARACUJAZEIROS CULTIVADOS EM DIFERENTES ALTITUDES NO ESPÍRITO SANTO

RESUMO - O maracujazeiro pertence à família Passifloraceae e ao gênero *Passiflora*, que é o mais importante economicamente. O Brasil é considerado centro de origem e o maior centro de diversidade genética do gênero. O gradiente altitudinal pode influenciar a distribuição da variação genética dentro e entre populações de plantas e a diversidade genética pode mudar com a altitude. Objetivou-se com este trabalho avaliar a diversidade genética de maracujazeiros cultivados em diferentes altitudes do Espírito Santo utilizando-se marcadores SSR e ISSR. Foram utilizadas folhas jovens de cinco plantas matrizes de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, *P. edulis* Sims e *P. alata* Curtis cultivadas em três altitudes (baixa, média e alta) no Espírito Santo. Para SSR foram encontrados baixo número de alelos, alta heterozigosidade esperada e altos valores de PIC, enquanto para a análise ISSR detectou-se um elevado número de bandas por *primer* e alto polimorfismo. Há maior similaridade genética entre *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *P. edulis* Sims. *Passiflora alata* Curtis apresenta maior distância genética em relação às espécies. As populações de baixa altitude se diferenciam das demais independente da espécie e do marcador utilizado.

Palavras-chave: *Passiflora* spp. SSR. ISSR. Diversidade.

ABSTRACT - The passion fruit belongs to the Passifloraceae family and gender *Passiflora*, which is the most important economically. Brazil is considered center of origin and the largest center of genetic diversity of the genus. The altitudinal gradient may influence the distribution of genetic variation within and between populations of plants and genetic diversity can change with altitude. Thus, this study aimed to evaluate the genetic diversity of cultivated passion fruit at different altitudes of the Espírito Santo using SSR and ISSR markers. Young leaves were used in five mother plants of *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, *P. edulis* Sims and *P. alata* grown in three heights (low, medium and high) of the Espírito Santo. SSR was found low number of alleles, heterozygosity was high and high PIC values and the ISSR analysis revealed a large number of bands per primer and high polymorphism. There is greater genetic similarity between *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* and *P. edulis* Sims. *Passiflora alata* has greater genetic distance for the species. Altitude low populations are differentiated from other unrelated species and marker used.

Keywords: *Passiflora* spp. SSR. ISSR. Diversity.

5.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado centro de origem e apresenta maior diversidade genética do gênero *Passiflora* (família Passifloraceae) com aproximadamente 139 espécies (BERNACCI et al., 2013). O gênero está amplamente distribuído pelas Américas, possui grande variabilidade genética a ser estudada e utilizada em programas de melhoramento. São destaques para o maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener), de maior interesse econômico (BELLON et al., 2007) devido a qualidade dos frutos, rendimento e preferência do consumidor e os maracujás roxo (*P. edulis* Sims) e doce (*P. alata* Curtis) cultivados em pequenas áreas para o consumo em mercados restritos (SANTOS et al., 2011).

As espécies deste gênero apresentam valor medicinal, ornamental, social e comercial elevado (FREITAS et al., 2011). A importância econômica das flores decorre principalmente a partir de *P. alata* Curtis (maracujá doce) e *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (maracujá amarelo) (SILVA et al., 2014).

O Espírito Santo é o segundo maior produtor nacional de maracujá e são cultivados, principalmente em Jaguaré, Sooretama, Pinheiros, Linhares, São Mateus, Conceição da Barra, Santa Maria de Jetibá e Rio Bananal (CEASA, 2013).

Regiões com altitude entre 100 a 900 m são as mais indicadas para o cultivo de maracujazeiros (FRAIFE FILHO et al., 2010) permitindo que a cultura seja cultivada principalmente no Espírito Santo.

Gradientes de altitude compreendem um conjunto de variáveis ambientais, que influenciam a variação genética das populações e a distribuição das espécies de plantas (OHSAWA; IDE, 2008). O gradiente altitudinal pode influenciar a variação genética dentro e entre populações de plantas, sendo complexa e variável entre as espécies (OHSAWA; IDE, 2008; BYARS; PARSONS; HOFFMANN, 2009). Segundo Ohsawa et al. (2007), a diversidade genética pode mudar com a altitude incluindo os níveis mais altos de diversidade (altitude mediana), em comparação com os níveis mais baixos (altitude baixa e alta).

O uso de marcadores moleculares para estudos de diversidade tem aumentado

no gênero *Passiflora*, por meio do uso de marcadores dominantes e codominantes (COSTA et al., 2012; CERQUEIRA SILVA et al., 2014a; CERQUEIRA SILVA et al., 2014b; LOUGON et al., 2014).

Entre estes, os microssatélites são ideais para verificar as diferenças alélicas entre genótipos e estimar a variabilidade genética (OLIVEIRA et al., 2006). Além da codominância, do multialelismo, do alto polimorfismo e poder de resolução, rapidez e simplicidade da técnica, também podem ser transferidos entre espécies e utilizados para análises moleculares filogeneticamente próximas. Assim, a utilização do SSR conservados em diferentes espécies é vantajosa por possibilitar estudos comparativos entre espécies (BARBARÁ et al., 2007).

De forma complementar os marcadores "Inter simple sequence repeat" (ISSR) são dominantes e valiosas ferramentas em estudos de diversidade genética interespecífica de maracujá (SANTOS et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de três espécies de maracujazeiros cultivados em três altitudes no estado do Espírito Santo por meio de SSR conservados entre as espécies e ISSR. Estes resultados ampliarão o conhecimento da variação inter e intraespecífica e poderão servir para orientação de programas de melhoramento e conservação das espécies.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

-MATERIAL VEGETAL

A amostra foi constituída de plantas matrizes das espécies de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (maracujazeiro amarelo), *P. edulis* Sims (maracujazeiro roxo) e *P. alata* Curtis (maracujazeiro doce), coletadas em pomares localizados em três diferentes altitudes (entre 0 e 100 - baixa; >100 até 600 - média e >600 m - alta) do estado do Espírito Santo (Tabela 1).

Tabela 1 - Local de coleta das plantas das espécies de *Passiflora* spp.

Espécies	Localidades	Latitudes	Longitudes	Altitude (m)	Nº de plantas
<i>P. edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg	Santa Maria de Jetibá	19° 59' 37,68" S	40° 40' 25,68" O	674	5
	Alegre	20° 46' 13,06" S	41° 30' 27,96" O	365	5
	Marataízes	21° 09' 32,58" S	40° 55' 07,56" O	6	5
<i>P. edulis</i> Sims	Santa Maria de Jetibá	19° 59' 40,32" S	40° 40' 21,66" O	674	5
	Jerônimo Monteiro	20° 47' 43,86" S	41° 30' 33,96" O	210	5
	Marataízes	21° 09' 32,28" S	40° 55' 07,62" O	6	5
<i>P. alata</i> Curtis	Santa Maria de Jetibá	20° 02' 34,20" S	40° 43' 34,08" O	655	5
	Alegre	20° 47' 44,94" S	41° 30' 35,52" O	350	5
	Jerônimo Monteiro	20° 46' 13,06" S	41° 25' 33,06" O	100	5

-EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Folhas jovens e sadias foram coletadas de cada planta e armazenadas em freezer a -30 °C. A extração do DNA genômico foi realizada a partir de cerca de 300 mg de tecido de folha macerada em nitrogênio líquido de acordo com o protocolo de Doyle e Doyle (1990), com as modificações abaixo.

Foram adicionados aos tubos contendo as amostras 700 µL do tampão de extração pré-aquecido, contendo 2% CTAB, 1,4 mol L⁻¹ NaCl, 20 mmol L⁻¹ EDTA (pH 8,0), 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0), 1,0% PVP e 2,0% mercaptoetanol, estes dois últimos foram necessários para remoção dos

compostos fenólicos. Este material foi incubado em banho-maria a 65 °C por 30 minutos e homogeneizado suavemente a cada 10 minutos.

Após as amostras atingirem a temperatura ambiente, adicionaram-se 650 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), para efetuar a desproteínização. Este material sofreu suaves inversões durante aproximadamente 1 minuto até ficar turvo. A fase orgânica foi separada por centrifugação, a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de 2 mL devidamente identificado. Adicionou 200 µL de tampão de extração e adicionou 650 µL de clorofórmio e centrifugou novamente a 12.000 rpm por 10 minutos. A adição de clorofórmio, centrifugação e transferência da fase aquosa para novo tubo realizou-se mais duas vezes. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de dois terços (500 µL) do volume de isopropanol gelado e 230 µL de acetato de amônio. O precipitado foi sedimentado por centrifugação, a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 250 µL etanol a 70%, para a retirada de sal presente (entre cada lavagem, o material foi centrifugado a 12.000 rpm durante 10 minutos). Após o descarte do último sobrenadante, o material foi seco em condições naturais, até que o etanol fosse removido. Em seguida, o material foi ressuspendido em 40 µL de solução TE (Tris-EDTA - 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0) 1 mmol L⁻¹ EDTA (pH 8,0)) com RNase em uma concentração final de 10 µg mL⁻¹ e incubado em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Logo após, o material foi armazenado a 20 °C até o uso.

A integridade do DNA genômico foi verificada em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio e a concentração determinada em espectrofotômetro NANODROP 2000. A qualidade do DNA foi estabelecida pela relação de absorbância A260/A280. Com base neste resultado, todas as amostras foram diluídas para a concentração de trabalho de 10 ng µL⁻¹.

-AMPLIFICAÇÃO POR SSR E ISSR

Em cada amostra foram amplificados 13 *primers* de SSR desenvolvidos para *Passiflora edulis* (OLIVEIRA, 2006) (Tabela 2). A reação de amplificação de PCR foi constituída de: 30 ng de DNA, 0,1 µM dos iniciadores, 1 U de Taq DNA

Polimerase, 0,2 mM de dNTP e 1,5 mM de cloreto de magnésio e tampão de PCR IO (1X - Phoneutria), sendo adicionado água ultrapura para completar o volume final da reação de 15 µL. O programa utilizado foi o de 4 minutos a 94 °C; seguindo de 35 ciclos, de 94 °C por 1 minuto, 56 - 60 °C (dependendo do *primer*) por 1 minuto, 72 °C por 3 minutos, e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Foi utilizada condição de amplificação em esquema de "touchdown", com base no programa TD 60 (um ciclo de 94 °C por 5 min; 8 ciclos (94 °C por 40 s, 60 ± 1 °C por ciclo por 40 s e 72 °C por 50 s); 24 ciclos (94 °C por 40 s, 56 °C por 40 s, 72 °C por 50 s); um ciclo de 72 °C por 5 min).

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de poliacrilamida 6%, com tampão de corrida TAE (tris-base, ácido acético e EDTA), a 90 volts por aproximadamente 3 horas e meia, corados com brometo de etídeo e submetidos à luz UV para visualização (Fotodocumentador L PIX HE).

Nas amplificações com o ISSR a partir de 32 *primers* da University of British Columbia, Vancouver, Canadá, foram escolhidos 14 (Tabela 2) de acordo com o maior número de fragmentos polimórficos e qualidade da amplificação, verificados previamente.

As reações foram realizadas utilizando 30 ng de DNA, 0,5 µM do iniciador, 1 U de Taq DNA Polimerase, 0,3 mM de dNTP e 1,5 mM de cloreto de magnésio e tampão de PCR IO (1X - Phoneutria), sendo adicionado água ultrapura para completar o volume final da reação de 20 µL. As condições de amplificação foram: 5 minutos a 94 °C, seguidos de 40 ciclos de 1minuto a 94 °C, 1 minuto a 50 °C e 2 minutos a 72 °C, com a fase final de extensão de 10 minutos a 72 °C. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com GelRed e tampão de corrida TBE 1X a 90 volts por aproximadamente 1 hora e meia. Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta utilizando o Sistema de Fotodocumentação L PIX HE da Locus Biotecnologia.

Todas as amplificações foram realizadas em Termociclador (Veriti 384-well Thermal Cycler Applied Biosystems).

Tabela 2 - Primers SSR e ISSR utilizados na amplificação de *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener, *P. edulis* Sims e *P. alata* Curtis coletadas em diferentes altitudes.

SSR **	TA (°C)	Primer "forward" (5' - 3')	Primer "reverse" (5' - 3')	ISSR	Sequência 5'→3'
PE03	60	GCAGCGAGGGAAGAAAAA	TGAGACATCGTGCGTGAA	UBC 807	AGAGAGAGAGAGAGAGT
PE08	56	CCGGATACCACGCATTA	TCTAATGAGCGGAGGAAAGC	UBC 808	AGAGAGAGAGAG AGAGC
PE15	56	ACCGTTAAATCCAAGCAAGT	AAATGCAAAGAATGATATGTTA	UBC 810	GAGAGAGAGAGAGAGAT
PE18	56	CCGTGAACCAACCATTCTC	CCGTGAACCAACCATTCTC	UBC 811	GAGAGAGAGAGAGAGAC
PE20	58	AGGATCACCATAGAAAACCAT	GTTAGGTTGGCATTGCTCTT	UBC 812	GAGAGAGAGAGAGAGAA
PE23	60	CAATCCCTTGACCCATAGA	CGTCCATCCTTCTCCTTT	UBC 815	CTCTCTCTCTCTCTCTG
PE27	58	TTGCTCATTGCACTCATCCT	GCAGACATTTCTGGAGCA	UBC 842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
PE37	60	CAAAAGGATAGGCCTGATGTC	TGCTTGGTCATCCACTGAAG	UBC 854	TCTCTCTCTCTCTCTCRG
PE38	60	GATCGGTCCTCGGTTAGAC	AGTCACACAGCATGAGAAATC	UBC 865	CCGCCGCCGCCGCCGCCG
PE41	56	ATCGGGGTTTCGCTTATTTG	CGTTCATCCTTTAGTGGGCTA	UBC 878	GGATGGATGGATGGA
PE66	60	CCATAGTCCCAACAAGCATC	GCTGTGGACCCTAACTCAGTC	UBC 886	VDVCTCTCTCTCTCTCT
PE74	*60	CCCTCTTATCAATAGCGTTGG	GCACGAGCACGAGTATTTATT	UBC 887	DVDTCTCTCTCTCTCTC
PE90	*60	TCAGGAAGATTGCATGTTAGT	CTGGGTTTTGTTTATGTTGC	UBC 890	VHVGTGTGTGTGTGTGT
				UBC 891	HVHTGTGTGTGTGTGTG

**Oliveira et al. (2006).

*TD = touchdown.

A identificação dos alelos em cada indivíduo com dados obtidos por SSR foi genotipada por indivíduo e os alelos identificados. Após a genotipagem a diversidade genética foi estimada pela heterozigosidade esperada (H_e), pelo conteúdo de informação polimórfica (PIC), pelo número de alelo na população (NA), pela frequência máxima de alelos (f_m), pelo número médio de alelos por loco (N_m), pelo número total de alelos (N_t), pelo número efetivo (N_e), pela proporção de alelo em cada população (P_a) e pelo número de alelo raro (N_r). As estimativas de dissimilaridade genética para SSR foram realizadas de acordo com o índice ponderado, organizados em matrizes; para posterior análise de agrupamento pela ligação média entre grupos UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average).

Para ISSR as bandas polimórficas detectadas entre os indivíduos das populações de cada espécie foram codificadas como presença de bandas (1) e ausência (0). Apenas bandas apresentando amplificação consistente foram consideradas. As estimativas de dissimilaridade genética foram realizadas de acordo com Jaccard, e posteriormente realizado o agrupamento pela ligação média entre grupos UPGMA. A diferenciação da variabilidade genética entre e dentro das populações e a distância entre os pares das populações foram avaliadas pela análise de variância molecular AMOVA. Todas as análises de divergência genética e de agrupamento foram realizadas com o auxílio do programa Genes (CRUZ, 2008).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 3 está a caracterização molecular das espécies de *Passiflora* spp. utilizando SSR. O loco PE 66 apresentou maior heterozigosidade esperada (H_e) (0,631) e maior conteúdo de informação polimórfica (PIC) (0,559) em todos os indivíduos. Foi detectado de 1 a 3 alelos em cada SSR, para as três espécies. Para os locos 20, 27, 38 e 41 apresentaram maior frequência máxima de alelos.

Para *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg obteve $H_e=0,611$, para *P. edulis* Sims $H_e=0,631$ e *P. alata* Curtis $H_e=0,650$. Valores semelhantes foram encontrados por Cerqueira-Silva et al. (2012), ao avaliarem acessos de *P. cincinnata*, obtendo $H_e=0,51$ e por Pádua et al. (2005), que obtiveram $H_e=0,52$, utilizando acessos de *P. alata*. A diversidade e variabilidade encontrada no gênero podem estar associadas à alogamia e autoincompatibilidade das espécies (PÉREZ-ALMEIDA et al., 2010). A diversidade genética de plantas é influenciada pelo sistema de reprodução, pela forma de vida, pela dispersão de sementes, pela deriva genética e pela história evolutiva. A forma de vida tem influências altamente importantes para a diversidade genética (HU et al., 2014).

Em relação ao conteúdo de informação polimórfica (PIC), Botstein et al. (1980) definiram o PIC como um indicador de qualidade do iniciador do marcador estudado e o mesmo será considerado altamente informativo, quando apresentar PIC superior a 0,5; razoavelmente informativo, quando possuir valores entre 0,25 e 0,50; e, levemente informativo, o que obtiver valores inferiores a 0,24.

Os locos PE 18 para *P. alata* Curtis e para *P. edulis* Sims e PE 15 para *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. foram altamente informativos (PIC: 0,575, 0,556 e 0,535, respectivamente). Em média, os SSR foram classificados como razoavelmente a levemente informativo para todas as espécies (Tabela 3).

Para *P. edulis* Sims foram encontrados nos 13 SSR 29 alelos e todas as espécies apresentaram entre 1 a 3 por loco. Cazé et al. (2012), ao caracterizarem locos de SSR desenvolvidos para *P. contracta* encontraram 42 alelos, com variação de 2 a 9 alelos, com média igual a 5. Isto mostra um baixo número de alelos por loco e poucos marcadores microssatélites polimórficos têm sido característicos do gênero, o que pode sugerir que estes locos se concentram em regiões conservadas, com pequena taxa de mutação (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014a).

Tabela 3 - Caracterização dos 13 SSR utilizados na caracterização molecular das espécies de *Passiflora* spp.

SSR	Total				<i>P. edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Degener				<i>P. edulis</i> Sims				<i>P. alata</i> Curtis			
	He	PIC	NA	<i>fm</i>	He	PIC	NA	<i>fm</i>	He	PIC	NA	<i>fm</i>	He	PIC	NA	<i>fm</i>
PE03	0,407	0,324	2	0,721	0,000	0,000	1	1,000	0,000	0,000	1	1,000	0,277	0,239	2	0,833
PE08	0,547	0,444	3	0,531	0,540	0,452	3	0,571	0,578	0,486	3	0,454	0,489	0,369	2	0,571
PE15	0,447	0,403	3	0,150	0,611	0,535	3	0,500	0,480	0,412	3	0,666	0,611	0,535	3	0,500
PE18	0,609	0,533	3	0,010	0,429	0,337	2	0,687	0,631	0,556	3	0,466	0,650	0,575	3	0,384
PE20	0,000	0,000	1	1,000	0,000	0,000	1	1,000	0,000	0,000	1	1,000	0,000	0,000	1	1,000
PE23	0,339	0,282	2	0,280	0,375	0,304	2	0,750	0,413	0,327	2	0,708	0,000	0,000	1	1,000
PE27	0,493	0,371	2	1,000	0,152	0,141	2	0,916	0,459	0,353	2	0,642	0,320	0,268	2	0,800
PE37	0,085	0,080	2	0,050	0,124	0,116	2	0,933	0,124	0,116	2	0,933	0,000	0,000	1	1,000
PE38	0,500	0,412	3	1,000	0,124	0,116	2	0,933	0,124	0,116	2	0,933	0,000	0,000	1	1,000
PE41	0,624	0,553	3	1,000	0,544	0,483	3	0,615	0,544	0,483	3	0,615	0,408	0,324	2	0,714
PE66	0,631	0,559	3	0,550	0,606	0,529	3	0,500	0,500	0,375	2	0,500	0,497	0,373	2	0,533
PE74	0,469	0,359	2	0,680	0,244	0,214	2	0,857	0,074	0,071	2	0,961	0,074	0,071	2	0,961
PE90	0,447	0,366	3	0,187	0,320	0,268	2	0,800	0,524	0,440	3	0,600	0,132	0,123	2	0,928
Média	0,431	0,361	2,42	0,373	0,313	0,269	2,15	0,774	0,342	0,287	2,23	0,729	0,266	0,221	1,85	0,786

Legenda: He = heterozigosidade esperada; PIC = conteúdo de informação polimórfica; NA = número de alelo e *fm* = frequência máxima de alelos.

Em relação à frequência máxima (fm) de alelos encontrados, maior parte dos locos apresentou valores maiores que 50%, o que revela ampla diversidade genética entre os acessos avaliados. Apenas o loco PE 08 e PE 18 para a *P. edulis* Sims e PE 18 para *P. alata* Curtis apresentaram frequência máxima de alelo menor que 50% (Tabela 3).

Número médio (Nm), total (Nt), efetivo (Ne), proporção de alelo em cada população (Pa) e número de alelos raros (Nr) para SSR são apresentados na tabela 4.

P. edulis Sims apresentou maior número de alelo médio (2,2308), maior número total de alelo (29), maior número efetivo de alelos (0,2308) e maior proporção de alelo em cada população (0,725). *P. edulis* Sims e *P. alata* Curtis apresentaram um alelo raro cada um com 4,1667% para *P. alata* Curtis e *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. não apresentou alelos raros (Tabela 4).

Tabela 4 - Número médio (Nm), total (Nt), efetivo (Ne), proporção de alelo em cada população (Pa) e número de alelos raros (Nr) para SSR.

Espécies	Nm	Nt	Ne	Pa	Nr	Nr(%)
<i>P. edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg.	2,1538	28	2,1538	0,700	0	0,0000
<i>P. edulis</i> Sims	2,2308	29	2,2308	0,725	1	3,4483
<i>P. alata</i> Curtis	1,8462	24	1,8462	0,600	1	4,1667

São considerados alelos raros aqueles que apresentam frequência menor que 0,05. Os alelos deixaram de ser raros na população *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. em razão do aumento da sua frequência. Há hipótese de que esses alelos estejam ligados a genes de interesse agrônômico (REIS et al., 2011).

A análise dos 14 *primers* ISSR das espécies de *Passiflora* spp. avaliadas está apresentada na tabela 5. Os 14 *primers* ISSR produziram 218 bandas, com média de 15,57 bandas por primer, dos quais 215 (99%) foram polimórficos. Os tamanhos dos fragmentos variaram de 110-2200 pb.

O *primer* UBC 865 apresentou maior número de bandas (21) e o UBC 887 o menor (9). Todas as espécies apresentaram alto número de bandas polimórficas acima de 67%, sendo que *P. edulis* Sims apresentou 98% (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise dos *primers* ISSR de três espécies de *Passiflora* spp.

ISSR	Total				<i>P. edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Degener				<i>P. edulis</i> Sims				<i>P. alata</i> Curtis			
	NTB	NBP	% P	A	NTB	NBP	% P	A	NTB	NBP	% P	V	NTB	NBP	% P	A
UBC 807	15	15	100	1500-370	14	14	100	1500-370	13	13	100	1000-370	11	11	100	900-370
UBC 808	12	12	100	1050-380	12	12	100	1010-390	12	12	100	1050-380	8	8	100	1010-490
UBC 810	21	19	90	1500-110	18	14	78	1000-110	10	9	90	900-110	15	10	67	1000-150
UBC 811	17	17	100	2000-290	11	10	91	1500-390	12	12	100	1500-490	14	12	86	1300-290
UBC 812	13	13	100	1200-350	10	10	100	1200-350	9	9	100	850-350	11	11	100	1200-350
UBC 815	16	16	100	1100-300	14	14	100	1100-300	16	16	100	1100-300	10	10	100	1050-380
UBC 842	15	15	100	750-250	15	15	100	750-250	13	13	100	750-250	13	13	100	750-250
UBC 854	19	19	100	2000-290	16	16	100	1800-290	18	18	100	2000-290	16	16	100	750-390
UBC 865	21	21	100	1900-310	19	19	100	1800-390	13	13	100	1500-310	18	17	94	1900-410
UBC 878	17	17	100	2000-390	17	17	100	2000-500	15	15	100	1800-390	17	17	100	2000-390
UBC 886	18	18	100	2200-280	18	18	100	2200-300	13	13	100	1000-300	17	16	94	2100-280
UBC 887	9	9	100	1080-480	9	9	100	1020-480	9	9	100	1050-500	9	9	100	1080-480
UBC 890	11	11	100	1100-380	11	11	100	1100-380	9	9	100	1000-450	7	7	100	1050-380
UBC 891	14	13	93	1100-300	13	12	92	1100-300	12	9	75	1000-300	12	11	92	1050-300
Total	218	215	99	-	197	191	97	-	174	170	98	-	178	168	94	-

Legenda: NTB = número total de bandas; NBP = número de bandas polimórficas; %P = porcentagem de polimorfismo; V = amplitude dos fragmentos gerados pelos *primers*.

Para *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. observou-se maior número de bandas (197), das quais 191 (97%) foram polimórficas, além de maior amplitude de tamanho dos fragmentos que variaram de 110-2200 pb em relação às outras espécies. O *primer* UBC 865 apresentou maior número de bandas (19) (Tabela 5).

A análise ISSR detectou elevado número de bandas por *primer* e baixa percentagem de marcadores monomórficas, indicando alta variabilidade genética interespecífica dos acessos. Estudos com *Passiflora*, também verificaram níveis elevados de polimorfismo, variando 70,5-98% (SANTOS et al., 2011; COSTA et al., 2012). No entanto, a análise ISSR não é recomendada para estudos taxonômicos e filogenia, o elevado número de bandas polimórficas pode ser agrupado de acordo com a origem geográfica (WU et al., 2009).

A análise de variância molecular (AMOVA) das espécies de *Passiflora* spp. está apresentada na tabela 6.

Pelos dados de AMOVA tanto com dados de SSR como de ISSR, no geral, as três espécies apresentaram diferenças genéticas quanto à altitude, com diferença significativa para as espécies e as altitudes entre e dentro das populações com ($p < 0,01$). Os valores de Φ_{ST} foram maiores para dados SSR e *P. alata* Curtis apresentou maior valor de Φ_{ST} (0,81) com este marcador. A Φ_{ST} apresentou maior valor para os dados SSR em relação ao ISSR para as três altitudes. Maior valor de Φ_{ST} (0,87) foi encontrado em baixa altitude para SSR (Tabela 6).

Houve diferenciação genética das espécies de acordo com a altitude de coleta. No geral houve maior variação genética entre que dentro de cada altitude para as três espécies com dados de SSR e dentro para os dados ISSR, e *P. edulis* Sims apresentou resultados similares para ambos os marcadores. Apenas *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. com dados de ISSR não apresentou significância dentro.

Os dados de SSR mostraram maior diversidade genética entre população para *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. (70,26%) e *P. alata* Curtis (80,65%). No entanto, para estas espécies a maior diversidade genética dentro da população foi detectada por ISSR.

P. edulis Sims apresentou padrão semelhante com os dois marcadores entre e dentro de populações dados SSR (43,33 e 56,67%) e ISSR (44,21 e 55,79%), respectivamente.

Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) de três espécies de *Passiflora* spp. coletadas em três altitudes, a partir de dados de SSR e ISSR.

SSR								ISSR				
	FV	GL	SQ	QM	Componente de variância	%	ØST	SQ	QM	Componente de variância	%	ØST
<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i> Deg.	Entre	2	6,14	3,07	0,57	70,26 ^{**}	0,70 ^{**}	159,00	79,50	10,61	28,63 ^{**}	0,28 ^{**}
	Dentro	12	2,88	0,24	0,24	29,74 ^{**}		317,40	26,45	26,46	71,37 ^{ns}	
	Total	14	9,02	0,64	0,81	100,00		476,40	34,03	37,06	100,0	
<i>Passiflora edulis</i> Sims	Entre	2	3,13	1,56	0,25	43,33 ^{**}	0,43 ^{**}	188,40	94,20	15,04	44,21 ^{**}	0,44 ^{**}
	Dentro	12	3,89	0,32	0,32	56,67 ^{**}		227,80	18,90	18,90	55,79 ^{**}	
	Total	14	7,02	0,50	0,57	100,00		416,20	29,72	34,03	100,0	
<i>Passiflora alata</i> Curtis	Entre	2	4,53	2,26	0,43	80,65 ^{**}	0,81 ^{**}	207,20	103,60	16,70	45,38 ^{**}	0,45 ^{**}
	Dentro	12	1,24	0,10	0,10	19,35 ^{**}		241,20	20,10	20,10	54,62 ^{**}	
	Total	14	5,77	0,41	0,53	100,00		448,40	32,03	36,80	100,0	
Alta	Entre	2	9,86	4,93	0,94	81,31 ^{**}	0,81 ^{**}	165,87	82,93	12,39	37,15 ^{**}	0,37 ^{**}
	Dentro	12	2,60	0,22	0,22	18,69 ^{**}		251,60	20,97	20,97	62,85 ^{**}	
	Total	14	12,46	0,89	1,16	100,00		417,47	29,82	33,36	100,0	
Média	Entre	2	10,12	5,06	0,94	71,34 ^{**}	0,71 ^{**}	200,80	100,40	14,99	37,05 ^{**}	0,37 ^{**}
	Dentro	12	4,52	0,38	0,38	28,66 ^{**}		305,60	25,47	25,47	62,95 ^{**}	
	Total	14	14,64	1,05	1,31	100,00		506,40	36,17	40,45	100,0	
Baixa	Entre	2	7,40	3,70	0,72	87,66 ^{**}	0,87 ^{**}	239,20	119,60	20,10	51,28 ^{**}	0,51 ^{**}
	Dentro	12	1,22	0,10	0,10	12,34 ^{**}		229,20	19,10	19,10	48,72 ^{**}	
	Total	14	8,62	0,62	0,82	100,00		468,40	33,45	39,20	100,0	

^{ns} não significativo; ^{**} significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

Legenda: FV = fonte de variação, GL = grau de liberdade, SQ = soma de quadrado, QM = quadrado médio.

Maior valor de Φ_{ST} (0,44) foi encontrado para os dados ISSR (Tabela 6).

Os dados SSR mostraram maior diferenciação da diversidade genética entre população para as três altitudes. Os dados ISSR mostraram maior diferenciação dentro da população para alta altitude (62,85%) e média altitude (62,95%) (Tabela 6).

Para a baixa altitude, dados ISSR, foi observado um padrão semelhante para a diversidade genética entre e dentro da população.

Estudo com *Poa hiemata* utilizou marcadores microssatélites em que os dados da AMOVA também apresentaram maior estruturação genética entre população para as altitudes. Estudo com *Sisyrinchium micranthum* Cav. ao utilizar ISSR também verificou maior variância dentro das populações, no qual corresponde com a estrutura genética de espécies alógamas (TACUATIA et al., 2012).

Corroborando os dados de variação entre e dentro com os dois marcadores, os agrupamentos mostraram maior similaridade genética interpopulacional com SSR e intrapopulacional com dados de ISSR (Figura 1). As populações de baixa altitude sempre se diferenciaram das demais independentes da espécie e do marcador utilizado e as populações de média e alta altitude não apresentaram distinção com marcadores SSR e apresentaram com ISSR.

A espécie *P. alata* Curtis apresentou clara distinção entre os indivíduos dependendo da altitude, independente do marcador, com formação de três grupos bem definidos. As maiores e menores distâncias genéticas entre foram 0,46 e 0,05, respectivamente com SSR, e de 0,70 e 0,26, respectivamente para ISSR (Figura 1).

À espécie *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. maiores e menores distâncias genéticas entre os 15 acessos foram de 0,75 e 0,11, respectivamente, com dados SSR. A formação de três grupos cada um constituído de indivíduos da mesma altitude com dados SSR. Os indivíduos em baixa altitude apresentaram maior dissimilaridade genética em relação aos demais e maior similaridade genética entre si, com os indivíduos 1 e 3 com 100% de similaridade. Com ISSR, (as maiores e menores dissimilaridades entre os indivíduos foram de 0,77 e 0,45, respectivamente), houve a formação de três grupos, cada um agrupando indivíduos da mesma altitude (Figura 1).

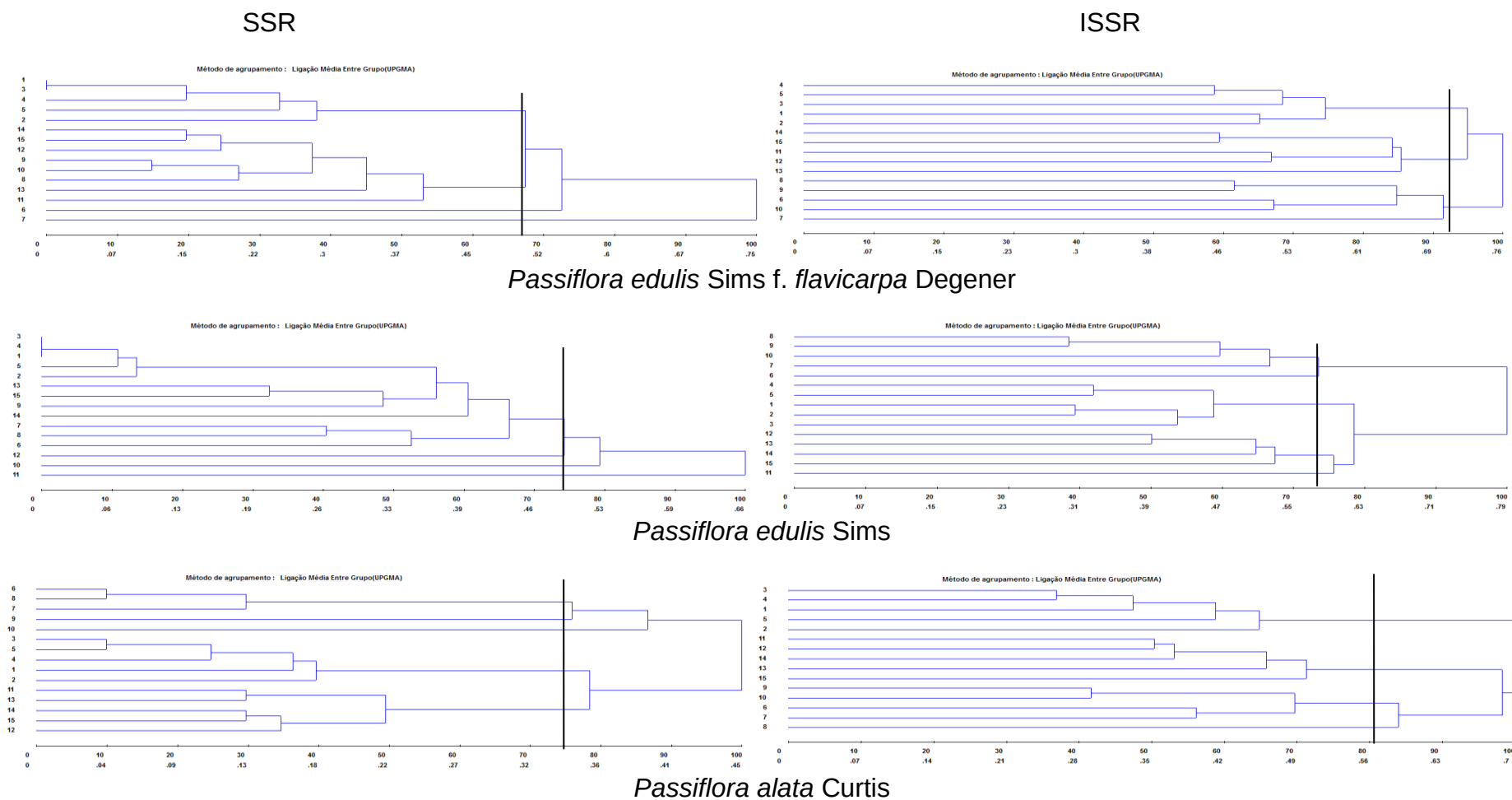
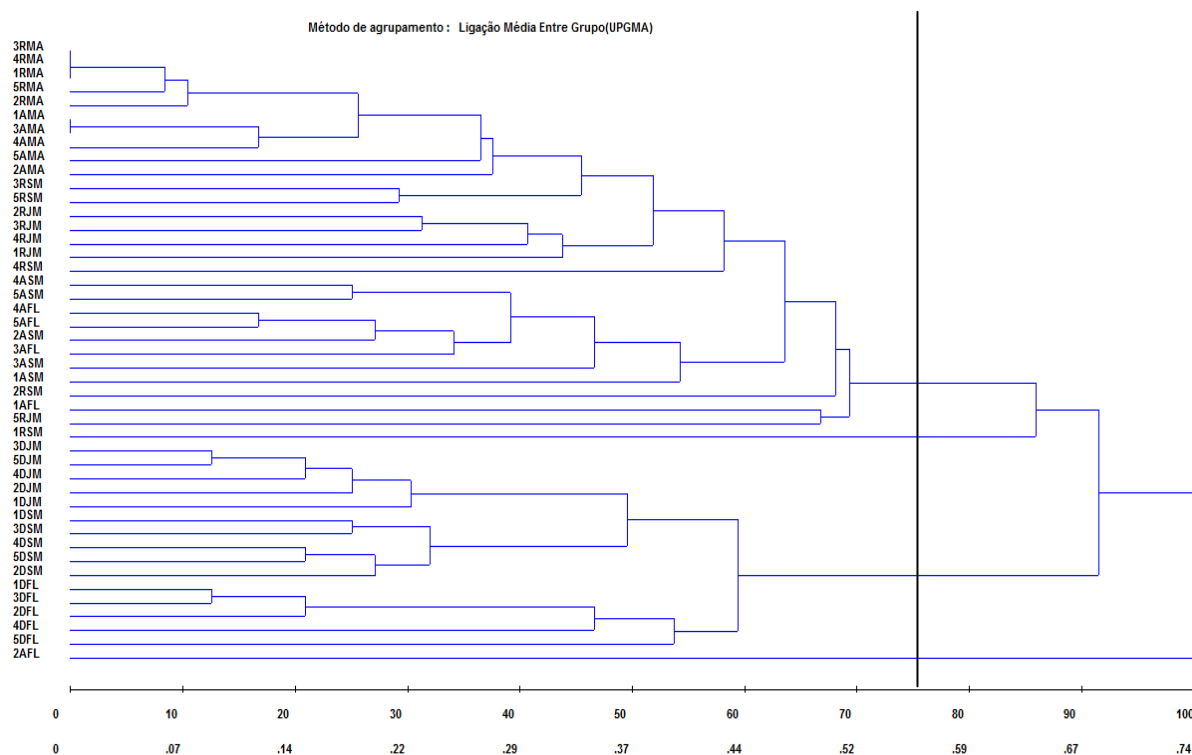


Figura 1 - Dendrograma das espécies de *Passiflora* spp., obtido pelo método UPGMA.

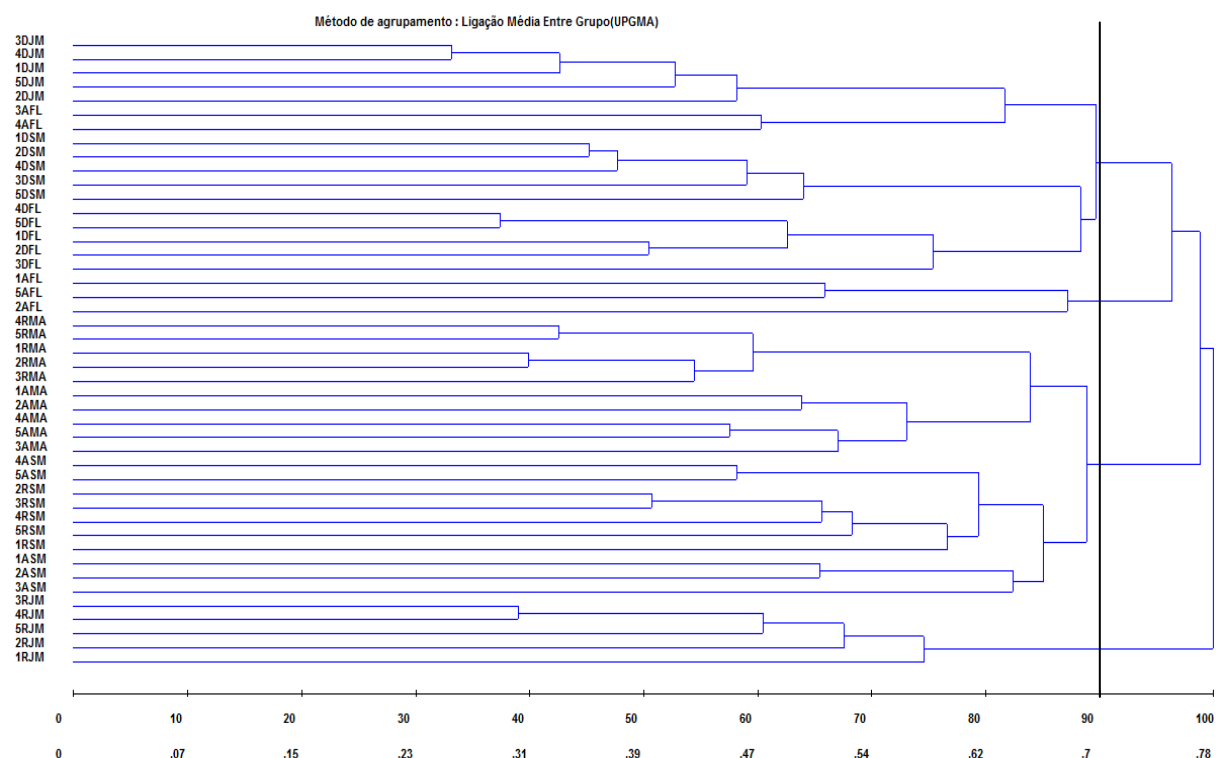
Legenda: 1,2,3,4,5 = altitude baixa, 6,7,8,9,10 = altitude média, 11,12,13,14,15 = altitude alta.

Para *P. edulis* Sims maiores e menores distâncias genéticas entre os 15 acessos, por SSR foram de 0,66 e 0,07, respectivamente, sendo formados dois grupos. Um com indivíduos de baixa altitude e outro com indivíduos de alta e média altitude. Indivíduos em baixa altitude apresentaram maior dissimilaridade genética em relação a alta e média altitude. Com dados ISSR, (maiores e menores distâncias genéticas foram de 0,79 e 0,30, respectivamente), verifica-se a formação de três grupos correspondentes às diferentes altitudes refletindo maior dissimilaridade genética entre elas (Figura 1).

Considerando uma análise geral com os 45 indivíduos estudados das três espécies, os dados SSR evidenciaram maior similaridade genética interpopulacional e os de ISSR intrapopulacional (Figura 2).



SSR



ISSR

Figura 2 - Agrupamento dos indivíduos pertencentes às três espécies de *Passiflora* spp. nas três altitudes, obtida pelo método UPGMA.

Legenda: AMA = maracujá amarelo em baixa altitude, AFL = maracujá amarelo em média altitude, ASM = maracujá amarelo em alta altitude, RMA = maracujá roxo em baixa altitude, RJM = maracujá roxo em média altitude, RSM = maracujá roxo em alta altitude, DJM = maracujá doce em baixa altitude, DFL = maracujá doce em média altitude, DSM = maracujá doce em alta altitude.

Para os dados SSR, (as maiores e menores distâncias genéticas entre os 45 acessos de *Passiflora* spp. foram 0,67 e 0,06, respectivamente), houve formação de dois grupos: um reunindo *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *P. edulis* Sims nas três altitudes e outro grupo *P. alata* Curtis nas três altitudes. Os indivíduos das espécies *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *P. edulis* Sims apresentaram maior similaridade genética em baixa altitude. Os indivíduos 1, 3 e 4 (*P. edulis* Sims em baixa altitude) apresentaram 100% de similaridade, como também os indivíduos 1 e 3 (*P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. em baixa altitude). *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *P. edulis* Sims em média e alta altitudes se misturaram (Figura 2).

Na análise de agrupamento ISSR, (maiores e menores distâncias genéticas entre os 45 acessos de *Passiflora* spp. foram 0,78 e 0,26, respectivamente). Houve formação de três grupos: grupo I: *P. alata* Curtis nas três diferentes altitudes, junto com *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. em média altitude; grupo II: *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *P. edulis* Sims em alta e baixa altitude e grupo III: *P. edulis* Sims em média altitude. Os indivíduos de *P. alata* se agruparam em relação às altitudes. Os indivíduos das espécies *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *P. edulis* Sims ficaram mais próximos em baixa altitude, assim como os indivíduos em alta altitude. No entanto, *P. edulis* Sims em média altitude apresentou maior dissimilaridade genética (Figura 2).

Em geral, os marcadores ISSR podem ser ferramentas valiosas para estudar a diversidade genética intraespecífica em *Passiflora*, uma vez que permitem o agrupamento de acessos de acordo com a origem genética (COSTA et al., 2012).

Indivíduos das espécies *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *P. edulis* Sims situadas em média e alta altitudes ficaram mais próximos, ou seja, maior similaridade genética. As populações tendem a se agrupar em um mesmo grupo, quando elas

estão geograficamente restritas e ocorre estreita proximidade uma da outra (HOU; LOU, 2011).

Os resultados mostram que *P. alata* Curtis apresentou maior dissimilaridade genética em relação às outras espécies. Grandes distâncias genéticas entre *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *P. alata* Curtis também foram observadas por Castro et al. (2011).

Em conformidade com Zhang et al. (2006), populações em altitudes superiores podem apresentar redução da diversidade genética e aumento da endogamia, pois nestes locais a pressão de seleção é maior devido às condições climáticas, em altitudes altas as populações podem enfrentar radiação significativamente maior, ventos mais fortes e baixa temperatura (LIU et al., 2012), geralmente a redução da temperatura associada a alturas crescentes causa diminuição na disponibilidade de recursos.

5.4 CONCLUSÕES

Há diferença molecular entre as espécies de *Passiflora* spp., no qual *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *P. edulis* Sims são as mais próximas e *P. alata* Curtis apresenta maior dissimilaridade genética.

Os marcadores SSR e ISSR possibilitam indicar a dissimilaridade entre as espécies, no qual podem ser utilizados para analisar as relações entre as espécies.

O marcador ISSR permite maior diferenciação entre os indivíduos dentro das espécies.

As populações de baixa altitude se diferenciam das demais independente da espécie e do marcador utilizado.

5.5 REFERÊNCIAS

- BARBARA, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F.; LEXER, C. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 16, p. 3759-3767, 2007.
- BELLON, G.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; SANTOS, E. C. dos; BRAGA, M. F.; GUIMARÃES, C. T. Variabilidade genética de paixão

selvagem e comercial (*Passiflora edulis* Sims.) acessos por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 124-127, 2007.

BERNACCI, L. C.; CERVI, A. C.; GIOVANNI, R.; BORGES, R. A. X.; HERING, R. L. O.; SERRANO, T.; SANTOS FILHO, L. A. F. **Passifloraceae**. In: MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. (Org.). Livro vermelho da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 830-834, 2013.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 14-31, 1980.

BYARS, S. G.; PARSONS, Y.; HOFFMANN, A. A. Effect of altitude on the genetic structure of an Alpine grass, *Poa hiemata*. **Annals of Botany**, v. 103, p. 885-899, 2009.

CASTRO, A. P. G.; FALEIRO, F. G.; CARVALHO, D. D. C.; FONSECA, K. G.; VILELA, M. F.; JUNQUEIRA, N. T. V.; CARES, J. E. Genetic variability of *Passiflora* spp. from commercial fields in the Federal District, Brazil. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 996-1002, 2011.

CAZÉ, A. L. R.; KRIEDT, R. A.; BEHEREGARAY, L. B.; BONATTO, S. L.; FREITAS, L. B. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Passiflora contracta*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 11343-11348, 2012.

CEASA. CENTRAIS DE ABASTECIMENTO DO ESPÍRITO SANTO. Disponível em: <<http://www.ceasa.es.gov.br/?p=2163>>. Acesso em 7 jan 2013.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; JESUS, O. N.; SANTOS, E. S. L.; CORRÊA, R. X.; ANETE P. SOUZA, A. P. Genetic breeding and diversity of the genus *Passiflora*: progress and perspectives in molecular and genetic studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 5, n. 8, p. 14.122-14.152, 2014a.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SANTOS, E. S. L.; SOUZA, A. M.; MORI, G. M.; OLIVEIRA, E. J.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 4, p. 170-172, 2012.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M.; SANTOS, E. S. L.; VIEIRA, J. G. P.; MORI, G. M.; JESUS, O. N.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. New microsatellite markers for wild

and commercial species of *Passiflora* (Passifloraceae) and cross-amplification open access. **Applications in Plant Sciences**, v. 2, n. 2, p. 1-5, 2014b.

COSTA, J. L.; JESUS, O. N.; OLIVEIRA, G. A. F.; OLIVEIRA, E. J. Effect of selection on genetic variability in yellow passion fruit. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, p. 253-260, 2012.

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

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

FRAIFE FILHO, G. A.; LEITE, J. B. V.; RAMOS, J. V. **Maracujá**. 2010. Publicado no site da Comissão Executiva de Planejamento da Lavoura Cacaueira/CEPLAC. Disponível: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/maracuja.htm>>. Acesso em 15 jan 2015.

FREITAS, J. P. X.; OLIVEIRA, E. J.; NETO, A. J. C.; SANTOS, L. R. Avaliação de recursos genéticos de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 1013-1020, 2011.

HOU, Y.; LOU, A. Population genetic diversity and structure of a naturally isolated plant species, *Rhodiola dumulosa* (Crassulaceae). **Plos One**, v. 6, n. 9, 2011.

HU, Y.; XIE, X.; WANG, L.; ZHANG, H.; YANG, J.; LI, Y. Genetic variation in cultivated *Rheum tanguticum* populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 3, p. 540-548, 2014.

LIU, Y. F.; XING, M.; ZHAO, W.; FAN, R. J.; LUO, S.; CHEN, X. Genetic diversity analysis of *Rhododendron aureum* Georgi (Ericaceae) located on Changbai Mountain using ISSR and RAPD markers. **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, p. 921-930, 2012.

LOUGON, C. P.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; FREITAS, J. C. DE O.; SILVA, R. N. O.; OLIVEIRA, E. J. de. Genetic variability assessment in the genus *Passiflora* by SSR markers. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 74, n. 3, p. 355-360, 2014.

OHSAWA, T.; IDE, Y. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. **Global Ecology and Biogeography**, v. 17, p. 152–163, 2008.

OHSAWA, T.; TSUDA, Y.; SAITO, Y.; SAWADA, H.; IDE, Y. Altitudinal genetic diversity and differentiation of *Quercus crispula* in the Chichibu Mountains, central Japan. **International Journal Plant Science**, v. 168, p. 333-340, 2007.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

PÁDUA, J. G.; OLIVEIRA, E. J.; ZUCCHI, M. I.; OLIVEIRA, G. C. X.; CAMARGO, L. E. A.; VIEIRA, M. L. C. Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 863-865, 2005.

PÉREZ-ALMEIDA, I.; VÁSQUEZ GARCÍA, S.; PÉREZ, D.; SALAZAR, E. Genetic diversity in six species of *Passiflora* spp. using RAPD introducción. **Revista Facultad Agronómica**, v. 27, p. 347-359, 2010.

REIS, R. V.; OLIVEIRA, E. J.; VIANA, A. P.; PEREIRA, T. N. S.; PEREIRA, M. G.; SILVA, M. G. M. Diversidade genética em seleção recorrente de maracujazeiro amarelo detectada por marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n.1, p.51-57, 2011.

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

SILVA, M. A. A.; SOUZA, M. M.; SILVA, G. S.; MELO, C. A. F.; CORRÊA, R. X.; ARAÚJO, I. S.; CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S. Analysis of transferability of microsatellite primers (SSR) in wild *Passiflora* species and intraspecific genetic diversity in *Passiflora alata*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 5908-5918, 2014.

TACUATIA, L. O.; EGGERS, L.; KALTCHUK-SANTOS, E.; SOUZA-CHIES, T. T. Population genetic structure of *Sisyrinchium micranthum* Cav. (Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. **Genetic Molecular Biology**, v. 35, p. 99-105, 2012.

WU, Z. L.; FANG, L. Y.; WANG, J.; SHEN, Y. J. Analysis of genetic diversity of vitis by using ISSR markers. **Acta Horticulturae**, v. 827, p. 125-130, 2009.

ZHANG, L.; LI, Q. J.; LI, H. T.; CHEN, J.; LI, D. Z. Genetic diversity and geographic differentiation in *Tacca chantrieri* (Taccaceae): an autonomous selfing plant with showy floral display. **Annals of Botany**, v. 98, p. 449-457, 2006.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Sementes de maracujá amarelo sem escarificação, maracujá roxo escarificada e maracujá doce tratadas com ácido giberélico apresentam maiores valores de germinação e vigor.

Sementes de maracujá amarelo e sementes localizadas em alta altitude apresentam maior qualidade fisiológica.

O envelhecimento acelerado com saturação salina a 43 °C por 72 horas e o teste de deterioração controlada na temperatura de 45 °C, com 25% de umidade durante 24 horas diferenciam as espécies nas diferentes altitudes.

Há diferença entre as espécies de *Passiflora* spp., no qual *P. edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. e *P. edulis* Sims são as mais próximas e *P. alata* Curtis apresenta maior dissimilaridade genética em relação às espécies.

Os marcadores SSR e ISSR possibilitam indicar a dissimilaridade entre as espécies, no qual podem ser utilizados para analisar as relações entre as espécies.

O marcador ISSR permite maior diferenciação entre os indivíduos dentro das espécies.

As populações de baixa altitude se diferenciam das demais independente da espécie e do marcador utilizado.

APÊNDICES

Tabela 1 - Quadrado médio de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), da raiz (CR), massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de espécies de *Passiflora* spp. cultivadas em diferentes altitudes e tratadas (E - escarificação física; GA₃ - ácido giberélico SE - sem escarificação) em laboratório.

FV	GL	G	IVG	CPA	CR	MF	MS
Espécies	2	44757,48*	41,93*	24,14*	145,21*	6112,84*	1,73**
Altitude	2	3524,59*	5,30*	3,22**	1,64*	123,09**	10,63*
Tratamento	2	441,03*	1,86*	6,71*	20,23*	393,56*	5,35*
E x A	4	653,26*	3,85*	7,48*	1,85*	253,33*	1,69*
E x T	4	232,37**	1,53*	3,67*	4,16**	207,76**	3,54*
A x T	4	259,48**	0,43*	0,11*	0,72 ^{ns}	221,62*	0,98**
E x A x T	8	352,15*	0,93*	3,02*	1,34 ^{ns}	189,81*	1,61*
Resíduo	81	37,53	0,04	0,34	0,67	29,18	0,21
Total	107	1008,26	1,23	1,54	3,99	185,34	0,85

^{ns} não significativo; **, * significativo em nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

FV = fonte de variação, GL = grau de liberdade, E = espécies, A = altitude, T = tratamentos.

Tabela 2 - Quadrado médio de emergência (E), índice de velocidade de emergência (IVE), diâmetro do coleto (DC), altura (AL), comprimento da parte aérea (CPA), da raiz (CR), massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de espécies de *Passiflora* spp. cultivadas em diferentes altitudes e tratadas (E - escarificação física; GA₃ - ácido giberélico; SE - sem escarificação) em casa de vegetação.

FV	GL	E	IVE	DC	AL	CPA	CR	MF	MS
E	2	43898,78*	20,68*	0,04**	22,28*	30,23**	5,00**	46397,62**	5552,60*
A	2	192,00**	0,07**	0,01**	0,31**	0,40 ^{ns}	1,05 ^{ns}	964,43 ^{ns}	99,50 ^{ns}
T	2	722,11*	0,29*	0,03 ^{ns}	0,33**	0,36 ^{ns}	0,02 ^{ns}	4002,44 ^{ns}	123,68 ^{ns}
E x A	4	913,11*	0,31*	0,03**	2,05**	1,12**	0,54 ^{ns}	25283,91**	313,86**
E x T	4	327,22*	0,13*	0,01**	1,00 ^{ns}	0,72 ^{ns}	0,76 ^{ns}	6865,79 ^{ns}	740,21*
A x T	4	48,94*	0,02**	0,01**	0,33 ^{ns}	0,66 ^{ns}	0,70 ^{ns}	10095,23 ^{ns}	414,17**
E x A x T	8	368,22*	0,08**	0,02**	0,30 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,42 ^{ns}	7890,91 ^{ns}	333,88**
Resíduo	81	37,26	0,02	0,01	0,44	0,39	0,49	5278,00	88,57
Total	107	941,56	0,43	0,01	0,91	0,98	0,59	7125,93	254,86

^{ns} não significativo; **, * significativo em nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

FV = fonte de variação, GL = grau de liberdade, E = espécies, A = altitude, T = tratamentos.

Tabela 3 - Quadrado médio de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), da raiz (CR), massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener submetidas ao envelhecimento acelerado tradicional e envelhecimento acelerado com saturação salina (NaCl) nas temperaturas de 41, 43 e 45 °C por 0, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição.

FV	GL	G	IVG	CPA	CR	MF	MS
E	1	53256,50*	93,86*	1806,50*	109,60*	17189,30*	86,80*
T	2	1835,20*	1,12*	35,44,80*	14981,60*	20322,20*	86,00*
Tempo	4	7304,30*	10,03*	17672,60*	17683,40*	1020,10**	9,60*
E x T	2	206,90*	1,89**	145,90**	825,10*	11649,70*	49,40*
E x Te	4	4147,50*	6,33*	629,70*	330,50*	2989,00*	11,00*
T x Te	8	506,50*	0,75**	733,40*	1100,90*	1995,50*	9,40*
E x T x Te	8	485,90*	1,19*	461,00*	433,80*	1900,00*	9,70*
Resíduo	90	68,50	0,17	15,30	25,70	192,20	0,40
Total	119	985,30	1,65	784,00	994,70	1223,80	5,30

^{ns} não significativo; **, * significativo em nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

FV = fonte de variação, GL = grau de liberdade, E = envelhecimento, T = temperatura, Te = tempo.

Tabela 4 - Quadrado médio de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), da raiz (CR), massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de espécies de *Passiflora* spp. cultivados em diferentes altitudes e submetidas ao envelhecimento acelerado com saturação salina a 43 °C por 72 horas.

FV	GL	G	IVG	CPA	CR	MF	MS
Espécies	2	27009,56**	34,09**	15,20**	12,10**	1519,60**	82,34**
Altitudes	2	2617,56**	2,05**	11,13**	10,86**	5402,21**	59,99**
EN	1	174,22**	0,16**	0,81 ^{ns}	142,30**	14601,98**	122,44**
E x A	4	414,22**	2,62**	6,97**	5,94**	3601,71**	9,47**
E x EN	2	29,56 ^{ns}	0,34**	3,15**	102,79**	3199,55**	60,99**
A x EN	2	4,22 ^{ns}	0,60**	1,57*	17,73**	2173,50**	25,03**
E x A x EN	4	195,56**	0,52**	3,33**	2,13 ^{ns}	1006,32**	12,27**
Resíduo	54	49,63	0,06	0,35	0,94	33,02	0,35
Total	71	910,07	1,27	1,74	7,21	836,72	9,64

^{ns} não significativo; **, * significativo em nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

FV = fonte de variação, GL = grau de liberdade, E = espécies, A = altitude, EN = envelhecimento.

Tabela 5 - Quadrado médio de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), da raiz (CR), massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener submetidas à deterioração controlada na temperatura de 45 °C nos tempos de 24 e 48 horas de exposição com 17, 22 e 25% de umidade.

FV	GL	G	IVG	CPA	CR	MF	MS
Tempo	1	170,678**	2,31**	0,02 ^{ns}	0,07 ^{ns}	61,70 ^{ns}	0,41 ^{ns}
Umidade	2	632,67**	0,90**	0,05 ^{ns}	4,35**	29,68 ^{ns}	0,58 ^{ns}
T x U	2	60,67 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,12 ^{ns}	15,89 ^{ns}	0,30 ^{ns}
Resíduo	18	33,78	0,05	0,06	0,31	22,86	0,24
Total	23	2165,33	5,26	1,33	14,57	564,37	6,53
CV (%)		6,27	7,96	5,15	10,00	5,49	7,02

^{ns} não significativo; **, * significativo em nível de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

FV = fonte de variação, GL = grau de liberdade, T = tempo, U = umidade, CV (%) = coeficiente de variação.

Tabela 6 - Quadrado médio de germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), comprimento da parte aérea (CPA), da raiz (CR), massa fresca (MF) e seca (MS) de plântulas de espécies de *Passiflora* spp. cultivadas em diferentes altitudes e submetidas a deterioração controlada na temperatura de 45 °C no tempo de 24 horas de exposição com 25% de umidade.

FV	GL	G	IVG	CPA	CR	MF	MS
Espécies	2	15336,80*	17,12**	4,08**	8,12**	1006,95**	8,20*
Altitude	2	667,60**	1,56**	0,13 ^{ns}	10,06**	135,76 ^{ns}	7,51*
E x A	4	114,60 ^{ns}	0,90**	0,13 ^{ns}	0,66**	341,77**	0,22 ^{ns}
Resíduo	27	54,80	0,03	0,55	0,24	71,79	0,35
Total	35	33947,00	41,80	23,68	45,42	5590,90	41,77
CV (%)	-	11,40	8,53	17,83	7,59	11,76	9,25

^{ns} não significativo; **, * significativo a 1 e 5% de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

FV = fonte de variação, GL = grau de liberdade, E = espécies, A = altitude, CV (%) = coeficiente de variação.