



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL -
PPGPV**

ALINE PINTO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, REPRODUTIVA E
CITOGENÉTICA EM HÍBRIDOS F₁ ORIUNDOS DO
CRUZAMENTO *Passiflora vitifolia* vs. *Passiflora hatschbachii***

**ILHÉUS – BAHIA - BRASIL
Fevereiro de 2019**

ALINE PINTO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, REPRODUTIVA E
CITOGENÉTICA EM HÍBRIDOS F₁ ORIUNDOS DO
CRUZAMENTO *Passiflora vitifolia* vs. *Passiflora hatschbachii***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal

Linha de Pesquisa: Melhoramento Genético e Biotecnologia.

Orientadora: Prof. a Dra. Margarete Magalhães de Souza

Co-orientador: Dr. Gonçalo Santos da Silva

**ILHÉUS – BAHIA - BRASIL
Fevereiro de 2019**

ALINE PINTO DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, REPRODUTIVA E
CITOGENÉTICA EM HÍBRIDOS F₁ ORIUNDOS DO
CRUZAMENTO *Passiflora vitifolia* vs. *Passiflora hatschbachii***

Profª. Dra. Margarete Magalhães de Souza
UESC/DCB
(Orientadora)

Claúdio Antonio Ferreira de Melo
UESC/DCB

Jôsie Cloviane de Oliveira Freitas
Universidade Estadual de Goiás (UEG)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por me conceder vida e saúde para percorrer essa árdua, porém gratificante trajetória.

À minha mãe Selma, por seu amor e apoio incondicional em todas etapas da minha vida. Você é a luz que ilumina minha vida, cada conquista minha é sempre por você e para você. TE AMO!!!

À toda família Pinheiro Pinto, em especial minha irmã Andréa, meus sobrinhos Christian Phillipe e André Luiz, e à minha vó Hildete (Dona Dete), por seu amor e por acreditarem em mim. Sempre amarei vocês!!!

Ao meu namorado Cristiano Nunes por ser uma pessoa cheia de luz e paciência. As suas palavras de conforto nos momentos de angústia me deram força para completar mais essa etapa. TE AMO!!!

À professora Margarete pela oportunidade a mim concedida e pela orientação.

Ao meu coorientador Dr. Gonçalo Santos da Silva por seus ensinamentos, conselhos e 'puxões de orelha' rsrsrsr nos momentos necessários. Sem você esse trabalho não teria sido possível. Você sempre será uma referência de profissional a ser seguido!!!

Aos meus amigos do Laboratório de melhoramento de Plantas (LAMEP): Pedro Amorim, pela disponibilidade constante, ajuda na condução dos experimentos e por deixar cada etapa desse trabalho mais leve com seu jeito extrovertido e brincalhão de ser, à Ritão (Rita Moreira) pelos ensinamentos, ajuda, amizade e suporte espiritual, à Vivi (Viviane) pela ajuda nas análises estatísticas de viabilidade polínica e pelos esclarecimentos de dúvidas a qualquer hora do dia ou da noite rsrsrs, e aos colegas Manu (Manuela Lavinsky), Ritinha (Rita Vital), Jona (Jonathan Morales) e Flor (Analu), foi um privilégio trabalhar com vocês.

Ao Senhor Roberto por todo apoio na condução dos experimentos de campo. Serei eternamente grata pela amizade e dedicação com a qual sempre cuidou das minhas plantas.

Ao Dr. Cláudio Antônio Ferreira de Melo, que apesar de não ter trabalho diretamente comigo, sempre se mostrou disposto a ajudar independentemente do reconhecimento acadêmico. Você é um exemplo de Profissional!!!

Às minhas amigas Batatinha (Emile Caroline) e Thaís Marcelo pela amizade e apoio. Reencontra-lás e dividir essa etapa da minha vida com vocês, foi um presente de Deus.

À Thamara pela amizade e pela ajuda na análise estatística de ACP.

À Universidade Estadual de Santa Cruz, em especial ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal pela oportunidade.

À secretária do PPGPV, Caroline Tavares (Carol) pela ajuda na resolução de problemas e lembretes de prazos rrsrrrsrs. Não sei o que seria de nós, discentes, sem você.

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

Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente para que essa etapa fosse cumprida. Serei eternamente grata!!!!

MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA, REPRODUTIVA E CITOGENÉTICA EM HÍBRIDOS F₁ ORIUNDOS DO CRUZAMENTO *Passiflora vitifolia* vs. *Passiflora hatschbachii*

Este trabalho teve como objetivo confirmar a natureza híbrida de plantas F₁ obtidas do cruzamento *Passiflora vitifolia* vs. *Passiflora hatschbachii*, avaliar os híbridos e realizar a descrição do híbrido interespecífico HD26-102 visando sua submissão para registro na Sociedade Internacional de Passiflora, tendo em vista que esse genótipo apresenta características interessantes ao mercado de plantas ornamentais. No capítulo 1 foi realizado um levantamento bibliográfico relacionado aos avanços citogenético, reprodutivo e morfológico em espécies e híbridos de *Passiflora* obtidos até o presente momento pelo grupo de pesquisa do laboratório de Melhoramento de Plantas (LAMEP) da UESC. Nesse artigo foram relatados os cruzamentos realizados e os híbridos obtidos, além das características moleculares e citogenéticas dos genótipos estudados. No capítulo 2 foi feita a confirmação via marcador molecular ISSR dos híbridos HD26-102, HD26-104, HD26-143 e HD26-146 obtidos do cruzamento *P. vitifolia* vs *P. hatschbachii*. Os híbridos foram confirmados mediante a análise e segregação de bandas dos genitores nas progênies. Paralela a essa análise, o híbrido HD26-102 também foi confirmado mediante a aplicação de GISH (Genomic *in situ* hybridization). A utilização da GISH com o DNA marcado dos pais permitiu a visualização de dois conjuntos cromossômicos distintos no cariótipo do híbrido (nove cromossomos do genitor feminino e nove cromossomos do genitor masculino). Em função das características florais e da intensidade e regularidade no florescimento, o híbrido HD26-102 foi descrito visando o seu lançamento como uma nova cultivar ornamental, sendo denominado *P. 'Lamepiana'*. A viabilidade dos grãos de pólen e a receptividade do estigma desse mesmo híbrido foi testada através das seguintes análises: Solução de Alexander, germinação *in vitro* dos grãos de pólen, coloração do estigma com benzidina e através da reatividade do estigma ao peróxido de hidrogênio. O híbrido se mostrou viável e capaz de ser utilizado em novos cruzamentos como genitor paterno ou materno. A natureza amilácea dos grãos de pólen de *P. 'lamepiana'* e *P. vitifolia* foram determinados através da reação do tecido de reserva com Lugol. Com base em descritores florais e morfológicos foi realizada a sua descrição do híbrido HD26-102 visando a sua submissão para registro na Passiflora International Society. O capítulo 3 foi elaborado com base na avaliação dos híbridos a diferentes níveis de luz, para tal, os híbridos submetidos a sol pleno, 30%, 50% e 80% radiação solar foram avaliados com base em 19 descritores morfológicos quantitativos e em 11 descritores morfológicos qualitativos. Para as características vegetativas quantitativas dois componentes principais representaram 69,5% das variações observadas nos genótipos. Por outro lado, para as características florais quantitativas quatro componentes principais foram responsáveis 90,3% das variações observadas. Para características qualitativas a submissão a diferentes índices de luz não resultou em características distintas entre os híbridos. No geral, para a maioria das características analisadas houve melhor crescimento vegetativo dos híbridos cultivados em ambiente a pleno sol. No capítulo 4 técnicas citogenéticas convencionais e moleculares foram utilizadas para análise dos híbridos HD26-102, HD26=104, HD26-143, HD26-146 e dos seus genitores *P. vitifolia* e *P. hatschbachii*. A coloração cromossômica com Giemsa permitiu a verificação da estabilidade numérica ($2n = 18$) tanto nos genitores quanto nos híbridos. A presença de satélites também foi analisada através da coloração com Giemsa. Por outro lado, o bandamento CMA₃/DAPI permitiu a

distinção precisa de regiões ricas em GC e a ocorrência de dois pares de cromossomos satelitados tanto nos genitores quanto nos híbridos. Para identificação do genoma dos genitores nos híbridos, foi aplicada a GISH usando as sondas de ambos genitores simultaneamente. A GISH permitiu a diferenciação do genoma de cada genitor nos quatro híbridos analisados. Com base nos resultados obtidos para caracterização morfológica observa-se que híbridos de *Passiflora* possuem potencial de lançamento como nova cultivar no mercado de plantas ornamentais e que apesar das condições de luminosidade não afetar diretamente a morfologia floral, condição de pleno sol induz maior intensidade, regularidade no florescimento e vigor vegetativo nos híbridos. Paralelo a isso, a confirmação da hibridação via marcadores ISSR e a análises reprodutivas em híbridos de *Passiflora* permitem a confirmação e seleção de genótipos com potencial de continuação em Programas de melhoramento genético. A GISH e o CMA/DAPI se mostraram técnicas de grande importância no melhoramento de plantas, pois além de permitirem a confirmação da hibridação, demonstram estabilidade cariotípica entre os genomas genitores e dos híbridos.

Palavras-chave: Confirmação de híbridos, descrição morfológica, desenvolvimento vegetativo, plantas ornamentais, viabilidade polínica.

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL, REPRODUCTIVE AND CYTOGENETIC EVALUATION IN F₁ HYBRIDS ORIGINATED FROM CROSSING *Passiflora vitifolia* vs. *Passiflora hatschbachii*

The main objective of this work was to confirm the hybrid nature of F₁ plants obtained from the crossing *Passiflora vitifolia* vs. *Passiflora hatschbachii*, cytogenetically evaluate the hybrids and perform a description of the interspecific hybrid HD26-102 aiming its submission to the International Passiflora Society, considering that this genotype presents interesting characteristics to the market of ornamental plants. In chapter 1 a bibliographical survey was carried out related to cytogenetic, reproductive and morphological advances in species and *Passiflora* hybrids obtained up to the present moment by the research group of the Laboratory of Plant Breeding (LAMEP) located at UESC. In this article were reported crosses and obtained hybrids, as well as the molecular and cytogenetic characteristics of the studied genotypes. In chapter 2 there were the confirmation by ISSR molecular markers of the hybrids HD26-102, HD26-104, HD26-143 and HD26-146 obtained from crossing *P. vitifolia* vs *P. hatschbachii*. The hybrids were confirmed by agarose gel segregation of an informational band referring to the female parent and two bands referring to the male parent. Parallel to this analysis, the hybrid HD26-102 was also confirmed by the application of GISH (Genomic in situ hybridization). The use of GISH with parental labeled DNA allowed the visualization of two distinct chromosomal sets in the hybrid karyotype (nine chromosomes of the female genitor and nine chromosomes of the male genitor). Due to floral characteristics, intensity and regularity in flowering, the hybrid HD26-102 was described aiming at its launching as a new ornamental cultivar, being denominated *P. 'Lamepiana'*. The viability of the pollen grains and the receptivity of the stigma of this same hybrid was tested through the following analyzes: Alexander solution, in vitro germination of the pollen grains, stigma staining with benzidine and through the reactivity of the stigma to peroxide of hydrogen. The hybrid was viable and capable of being used in new crosses as a paternal or maternal parent. The amylose nature of the pollen grains of *P. 'Lamepiana'* and *P. vitifolia* were determined by the reaction of the reserve tissue with Lugol. Based on floral and morphological descriptors, its description of the hybrid HD26-102 was made for submission to the Passiflora International Society. Chapter 3 was elaborated based on the evaluation of the hybrids at different levels of light, for that the hybrids submitted to full sun, 30%, 50% and 80% solar radiation were evaluated based on 19 quantitative morphological descriptors and 11 descriptors morphological characteristics. For the quantitative vegetative characteristics two main components represented 69.5% of the variations observed in the genotypes. On the other hand, for the quantitative floral characteristics four main components accounted for 90.3% of the observed variations. For qualitative characteristics the submission to different light indices did not result in different characteristics among hybrids. In general, for most of the analyzed characteristics, there was a better vegetative development of the hybrids cultivated in full sunlight. In Chapter 4, conventional and molecular cytogenetic techniques were used to analyze the hybrids HD26-102, HD26 = 104, HD26-143, HD26-146 and their parents *P. vitifolia* and *P. hatschbachii*. The chromosomal staining with Giemsa allowed the numerical stability ($2n = 18$) to be verified in both the parents and the hybrids. The presence of satellites was also analyzed by staining with Giemsa, however, due to the reduced size of the chromosomes of the hybrids, their visualization was not possible precisely. On the other hand, the CMA3 / DAPI banding allowed the precise distinction of GC-rich regions and the occurrence of two pairs of satellites chromosomes in both the parents and the hybrids. For genome identification of the parents in the hybrids, GISH was applied using the probes from

both parents simultaneously. GISH allowed differentiation of the genome of each parent in the four hybrids analyzed. From the results of the GISH, the absence of chromosomal changes in the hybrids was observed, suggesting the occurrence of chromosomal stability. Based on the results obtained for morphological characterization it is observed that *Passiflora* hybrids have a great potential of launching as a new cultivar in the market of ornamental plants and that although the luminosity conditions do not directly affect the floral morphology, full sun condition induces greater intensity, flowering regularity and vegetative vigor in hybrids. Parallel to this, the confirmation of hybridization via ISSR markers and reproductive analyzes in *Passiflora* hybrids allows the confirmation and selection of genotypes with potential for continuation in Genetic breeding programs. GISH and CMA / DAPI showed to be techniques of great importance in plant breeding, since besides confirming the hybridization, they demonstrate karyotype stability between the genomes and the genomes of the hybrids.

Keywords: Confirmation of hybrid, morphological description, ornamental plants, pollen viability, vegetative development.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| REFERENCIAL TEÓRICO..... | 2 |
| Distribuição geográfica da Família Passifloraceae e do gênero Passiflora..... | 2 |
| Caracterização botânica e morfológica do gênero Passiflora..... | 3 |
| Características reprodutivas das passifloras..... | 4 |
| Hibridação e biologia reprodutiva em Passiflora..... | 6 |
| Utilização de marcadores moleculares na confirmação da hibridação..... | 8 |
| Citogenética em espécies e em híbridos do gênero Passiflora..... | 9 |
| GISH em Passiflora..... | 11 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 13 |
| CAPÍTULO 1..... | 20 |
| Contributions of genetic, cytogenetic and morphological studies in species and <i>Passiflora</i> hybrids..... | 20 |
| ABSTRACT..... | 20 |
| INTRODUCTION..... | 22 |
| Cytogenetics in species and hybrids of the genus <i>Passiflora</i> | 23 |
| The use of molecular markers in hybridization confirmation and diversity analysis of passion flowers..... | 29 |
| Comprehension of reproductive biology in <i>Passiflora</i> | 32 |
| Potential use of <i>Passiflora</i> species and hybrids in breeding programs..... | 35 |
| Induction of hybridization in ornamental passiflowers..... | 36 |
| Influence of luminosity on the morphological development of <i>Passiflora</i> hybrids and species..... | 38 |
| ACKNOWLEDGEMENTS..... | 42 |
| CAPÍTULO 2..... | 53 |
| DESCRIÇÃO DE HÍBRIDO F₁ DE <i>Passiflora</i> COM POTENCIAL ORNAMENTAL..... | 53 |
| RESUMO..... | 53 |
| ABSTRACT..... | 55 |
| INTRODUÇÃO..... | 56 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 57 |
| Germoplasma..... | 57 |
| Extração de DNA..... | 58 |
| Confirmação da hibridação via marcador ISSR..... | 58 |
| Preparação de lâminas para GISH..... | 59 |
| Preparação das sondas para GISH..... | 60 |
| GISH..... | 60 |
| Descrição Morfológica..... | 61 |
| Caracterização reprodutiva..... | 62 |
| Viabilidade polínica..... | 62 |
| Germinação in vitro do grão de pólen..... | 62 |
| Natureza do tecido de reserva do grão de pólen..... | 63 |

| | |
|---|------------|
| Receptividade do estigma | 63 |
| RESULTADOS | 64 |
| Confirmação da hibridação via marcadores ISSR | 64 |
| Descrição morfológica | 64 |
| GISH | 68 |
| Viabilidade polínica | 68 |
| Teste de germinação in vitro de grãos de pólen | 70 |
| Tipo de tecido de reserva dos grãos de pólen de P. 'Lamepiana' e P. vitifolia | 71 |
| DISCUSSÃO | 72 |
| Confirmação da hibridação via marcadores ISSR e GISH | 72 |
| Descrição morfológica | 73 |
| Caracterização reprodutiva | 74 |
| CONCLUSÕES | 77 |
| AGRADECIMENTOS | 77 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 77 |
| CAPÍTULO 3 | 84 |
| AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS VEGETATIVAS E FLORAIS EM HÍBRIDOS F₁ DE <i>Passiflora vitifolia</i> vs. <i>Passiflora hatschbachii</i> SUBMETIDOS A DIFERENTES NÍVEIS DE LUZ..... | 84 |
| RESUMO..... | 84 |
| ABSTRACT | 86 |
| INTRODUÇÃO..... | 87 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 88 |
| Material vegetal e condições de cultivo | 88 |
| Delineamento experimental e análise dos dados | 90 |
| Caracterização morfológica..... | 91 |
| RESULTADOS | 92 |
| Características vegetativas quantitativas..... | 93 |
| Características florais quantitativas | 97 |
| Características qualitativas | 102 |
| DISCUSSÃO | 103 |
| CONCLUSÕES | 106 |
| AGRADECIMENTOS | 107 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 107 |
| CAPÍTULO 4 | 112 |
| ANALISE CITOGENÉTICA EM HÍBRIDOS F₁ DE <i>Passiflora</i> | 112 |
| RESUMO..... | 112 |
| ABSTRACT | 114 |
| INTRODUÇÃO..... | 115 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 116 |
| Material Vegetal | 116 |

| | |
|---|------------|
| Preparo das Lâminas | 117 |
| Coloração com Giemsa e análise cariomorfológica | 117 |
| Coloração com Fluorocromos CMA ₃ e DAPI..... | 118 |
| Extração e fragmentação do DNA para GISH | 118 |
| Preparação das sondas para GISH | 119 |
| Aplicação da GISH | 119 |
| Fotodocumentação | 120 |
| RESULTADOS | 121 |
| Coloração convencional..... | 121 |
| Bandamento CMA ₃ /DAPI..... | 127 |
| GISH | 128 |
| DISCUSSÃO | 128 |
| CONCLUSÕES | 131 |
| AGRADECIMENTOS | 131 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 132 |

INTRODUÇÃO

Composto por cerca de 525 espécies já descritas (CERVI; IMIG, 2013), muitas com elevada importância econômica e ecológica (BERNACCI et al., 2013), o gênero *Passiflora* constitui-se o maior e mais representativo gênero dentro da família Passifloraceae (CERVI; IMIG, 2013). De ocorrência nas regiões tropicais, subtropicais e principalmente neotropicais como no caso do Brasil, o gênero *Passiflora* se destaca pelo grande número de espécies distribuídas entre os biomas do país, como em áreas de ocorrência da Floresta Atlântica Sul e na região da Chapada Diamantina no estado Bahia (NUNES; QUEIROZ, 2006; BERNACCI; SOUZA, 2012).

O grande número de espécies com ocorrência no Brasil, resultou no seu reconhecimento como centro de diversidade do gênero *Passiflora* (SOUZA et al., 2003), tendo como consequência o aumento no número de pesquisas envolvendo espécies desse gênero, principalmente em relação a espécies comerciais. Além de pesquisas envolvendo espécies de interesse agrônomo, estudos envolvendo espécies ornamentais e silvestres possibilitou a criação de um Banco de Germoplasma de *Passiflora* pelas Embrapas: Mandioca e Fruticultura, Cerrados e Semiárido contendo cerca de 592 acessos com o intuito de evitar a erosão e promover a conservação da variabilidade genética dos indivíduos uma vez que não se conhece as características genéticas de vários desses genótipos (MORERA et al., 2018). Outros Bancos de Germoplasma como o BAG localizado na UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz) também se destinam a conservação dos recursos genéticos de passifloras.

De forma geral, apesar da grande variedade e do potencial de uso de muitas dessas espécies, as plantas do gênero *Passiflora* têm sido usadas quase que exclusivamente para fins medicinais e alimentícios, sendo as espécies *P. edulis* Sims, *P. cincinnata* Mast e *P. alata* Curtis as mais cultivadas para esses propósitos (FAUSTINO et al., 2010, MELETTI, 2011). Com destaque especial para *P. edulis*, a qual por ser amplamente utilizada para produção de sucos e consumo *in natura*, representa 95% de toda a área de maracujá cultivada entre as cinco regiões do Brasil (MELETTI, 2011; MORERA et al., 2018).

Entretanto, dada a exuberância de suas flores e a peculiaridade de suas folhas (SOUZA; PEREIRA, 2003), muitas espécies apresentam um potencial ornamental ainda pouco explorado no agronegócio brasileiro.

Desde antes da introdução das passifloras no 'Novo Mundo', as flores de *P. caerulea* L. e *P. incarnata* L. já despertavam admiração em função da sua beleza (PEIXOTO, 2005) e eram utilizadas para decoração de pérgolas e estufas na Europa (RUSHING, 2003). Somente

por volta do século XIX com a obtenção do primeiro híbrido artificial de *Passiflora* (*P.* ‘Violacea’) pelo inglês Thomas Milne, o uso das passifloras deixou de ser restrito a espécies (PEIXOTO, 2005), sendo obtido a partir de então uma grande quantidade de híbridos principalmente com intuito ornamental (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Vários têm sido os objetivos do melhoramento genético do maracujazeiro, entretanto, a obtenção de híbridos com flores exuberantes e colorações diversificadas têm sido um dos principais focos da hibridação interespecífica (VANDERPLANK, 2000). Sendo a hibridação relatada como uma técnica de sucesso por diversos autores (JUNQUEIRA et al., 2008; FALEIRO et al., 2011; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014; SOUZA, 2018). Além disso, estudos citogenéticos e a caracterização morfológica tanto de espécies quanto de híbridos de passifloras também vêm apresentando avanços ao longo dos anos.

Além da obtenção de flores exuberantes e de coloração variadas, pesquisas envolvendo híbridos de *Passiflora* buscam o entendimento cromossômico das espécies em função da hibridação, uma vez que esses fatores podem corroborar para o sucesso da hibridação e da viabilidade do híbrido (LAVINSCKY, 2016). Além disso, a grande diversidade de espécies dentro do gênero *Passiflora*, pode resultar em plantas híbridas com características morfológicas, citogenéticas e reprodutivas diferenciadas. Nesse contexto, estudos cariomorfológicos envolvendo espécies e híbridos de *Passiflora* precisam ser incentivados a fim de promover a continuidade dos Programas de Melhoramento. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos: confirmar através de marcadores ISSR e GISH a hibridação de plantas oriunda do cruzamento *P. vitifolia* vs *P. hatschbachii*, aplicar técnicas de citogenética visando a caracterização cromossômica dos genitores e híbridos, avaliar as características florais e vegetativas dos híbridos submetidos a diferentes níveis de luz, caracterizar morfológica e reprodutivamente o híbrido HD26-102 visando o seu registro perante a Sociedade Internacional de Passiflora (<http://www.passiflorasociety.org>).

REFERENCIAL TEÓRICO

Distribuição geográfica da Família Passifloraceae e do gênero Passiflora

A família Passifloraceae é subdividida em duas tribos: Paropsieae e Passiflorieae (CERVI, 2006) e em 17 gêneros (BERNACCI et al., 2013). Dentre essas duas tribos, a tribo Passiflorieae possui destacada importância por englobar o gênero *Passiflora*, o qual abriga um

grande número de espécies amplamente distribuídas geograficamente (CERVI, 2006). Com a ocorrência mundial de cerca de 650 espécies (BERNACCI et al., 2013).

O gênero *Passiflora* é composto por espécies que possuem peculiaridades botânicas, como a presença de uma corona filamentosa, e de flores de grande exuberância. As espécies do gênero *Passiflora* encontram-se espalhadas pelo mundo em áreas tropicais e subtropicais, especialmente em países da América central como a República Dominicana (MACDOUGAL et al., 2018), países da América do Norte como o México (LOZADA-PÉREZ; GUTIÉRREZ, 2016) e em diversos países da América do Sul como: Peru (ESQUERRE-IBAÑEZ, 2015), Colombia (MORALES et al., 2016; AGUIRRE-MORALES et al., 2016b; PÉREZ; MOLINARI, 2017) e Brasil (IMIG; CERVI, 2014; CERVI; LINSINGEN, 2010). Além disso, regiões da África também são citadas como áreas de ocorrência de passifloras (BERNACCI et al., 2013).

O Brasil possui posição destaque em função da ocorrência de um grande número de espécies de plantas da família Passifloraceae. Dos quatro gêneros de ocorrência no Brasil (*Passiflora* L., *Dilkea* Mast., *Mitostemma* Mast. e *Ancistrothysus* Harms), o gênero *Passiflora* é o mais representativo no país (VANDERPLANK, 2000), sendo em função disso considerado um centro de diversidade desse gênero (MELETTI et al., 2000; SOUZA et al., 2003). Dentre as 650 espécies mundialmente descritas, aproximadamente 23% (146 espécies) ocorrem no Brasil, das quais cerca de 58% (85 espécies) são consideradas endêmicas (BERNACCI et al., 2013). Entretanto, a distribuição das passifloras no território brasileiro não é homogênea, uma vez que grande parte das espécies ocorre nas Florestas Atlânticas do Sul da Bahia e na região central do estado, principalmente nas cidades da Chapada Diamantina (NUNES; QUEIROZ, 2006; BERNACCI; SOUZA 2012). Na porção Norte do país as passifloras ocorrem principalmente no ambiente amazônico (CERVI; LINSINGEN, 2010; SOUZA; HOPKINS, 2011).

Caracterização botânica e morfológica do gênero Passiflora

No geral as espécies do gênero *Passiflora* se caracterizam por serem trepadeiras arbustivas, herbáceas ou lenhosa com ciclo de vida de plantas perenes ou semi-perenes (PEREIRA et al., 2005), nas quais ocorrem presença de estípulas e de duas a três coronas coloridas compostas por estruturas filamentosas, a qual juntamente com o androginóforo caracterizam a família (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Apesar da existência de variação dentro do gênero, em sua grande maioria as folhas são simples e alternas, inteiras ou lobadas, com bordadura lisa ou dentada. Brácteas estão pressas

ao pecíolo, no qual pode haver presença ou ausência de glândulas. As flores são hermafroditas, isoladas, pentâmeras, composta por pétalas membranáceas que se alternam com as sépalas carnosas lanceoladas (CERVI, 1997; NUNES; QUEIROZ, 2006).

Algumas espécies possuem flores agrupadas formando inflorescências (NUNES; QUEIROZ, 2006; ULMER; MACDOUGAL, 2004). Nas flores, estruturas reprodutivas como: estames e carpelos são sustentados pelo androginóforo, o qual está localizado na base central do cálice. O ovário floral pode ter formato ovoide, globoso ou fusiforme, com a presença de três carpelos e de um único lóculo. Os três estiletos presentes nas flores podem estar dispostos de forma individual ou fundidos na sua base. Na estrutura feminina os estigmas podem encontrar-se capitados, reniformes ou orbiculares (NUNES; QUEIROZ, 2006).

Sementes ariladas (VANDERPLANK, 2000) são protegidas por um tecido mucilaginoso dentro do fruto bagóide indeiscente ou capsular, o qual se abre para dispersão das sementes (NUNES; QUEIROZ, 2006; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Características reprodutivas das passifloras

O conhecimento do sistema reprodutivo das passifloras é um importante alicerce para o planejamento de programas de melhoramento envolvendo essas espécies e se constitui como um parametro determinante de sucesso na obtenção de híbridos. Uma vez que o grande número de espécies resulta em comportamentos meióticos e estruturas reprodutivas variadas (MORERA et al., 2018).

Formato e dimensões diferenciadas, por exemplo, são características encontradas nos grãos de pólen de espécies do gênero *Passiflora* (DETTKE; SANTOS, 2009).

Em alguns casos a ocorrência de formação de grãos de pólen com dimensões alteradas pode resultar de irregularidades meióticas, especialmente em *Passiflora*, uma vez que a fecundação cruzada favorece a variabilidade polínica como consequência das variadas combinações heterozigótica formadas (SOUZA et al., 2008).

Apesar do favorecimento alogâmico, alguns cruzamentos envolvendo *passifloras* podem resultar em variações nas características reprodutivas das progênes originadas, como inviabilidade, ou viabilidade reduzida do pólen e a machoesterilidade (OLIVEIRA; RUGGIERO, 1998), como resultado da ação de genes nas fases da meiose, como no caso dos genes *ms* (macho esterilidade) (PAGLIARINI, 2000).

Por outro lado, as recombinações alélicas resultantes da hibridação podem favorecer uma maior viabilidade no híbrido em detrimento aos seus genitores, como observado para os híbridos oriundos do *P. foetida* var. *foetida* vs. *P. palmeri* var. *sublanceolata* (ABREU, 2008).

Resultados semelhantes para os híbridos HD25 também foram observados por SOUZA (2018). Em híbridos do cruzamento *P. edulis* f. *flavicarpa* vs. *P. amethystina* a viabilidade foi acima de 70% (BARBOSA; VIEIRA, 1997). A contagem polínica desses híbridos demonstrou que os mesmos apresentam grande potencial para a continuação de programas de melhoramento que visam a produção de híbridos triplos ou retrocruzados com características peculiares.

No segmento biotecnológico, o conhecimento da viabilidade do pólen pode auxiliar no planejamento do melhoramento a ser conduzido e determinar a escolha do sentido do cruzamento (TECHIO; DAVIDE, 2007). Além da germinação *in vitro*, corantes nucleares como a Solução de Alexander e o Diacetato de Fluoresceína podem ser utilizados para análise da viabilidade polínica através da contagem direta (ABREU, 2008; OLIVEIRA, 2017; SOUZA, 2018), fornecendo assim percentuais referentes ao potencial reprodutivo dos genótipos e a sua capacidade de hibridação.

Paralela a viabilidade dos grãos de pólen, a receptividade do estigma também é de essencial conhecimento na condução e para o sucesso dos cruzamentos (DAFNI, 1992). A determinação do momento exato de maior receptividade pode resultar em economia de tempo e maior frutificação (SOUZA et al., 2004) e conseqüentemente na aceleração de programas de melhoramento que visam a obtenção de híbridos.

No geral, o momento que estigma permanece apto à deposição do pólen pode variar de algumas poucas horas (entre 12 horas) até 10 horas (DAFNI, 1992; SHIVANNA, 2003), sendo necessária à sua determinação exata previamente à indução da fertilização artificial, especialmente das espécies que apresentam protandria (DAS et al., 2013).

Em algumas espécies de *Passiflora*, a receptividade do estigma está diretamente relacionada ao desenvolvimento floral e aos estados de pré e pós-antese em função da atividade da esterase (MORERA et al., 2018). No maracujazeiro, diferentes análises servem para inferir a atividade esterásica no estigma, dentre elas a análise com benzidina, com peróxido de hidrogênio (OLIVEIRA, 2017), bem como com a-naftil-acetato em conjunto com fast blue B, assim como observado em 17 espécies do gênero *Passiflora* utilizando esse reagente (MORERA et al., 2018). Outros testes, como a polinização *in vivo* e testes histoquímicos também têm sido utilizados, entretanto muitas vezes esses testes apresentam incoerências com relação aos resultados (SOUZA et al., 2004).

Análises paralelas da viabilidade do grão de pólen e da receptividade do estigma, servem para embasar a escolha do melhor genótipo a ser utilizado como genitor masculino ou feminino no cruzamento, aumentando as chances de sucesso na hibridação. Para *P.*

edmundoi, por exemplo, elevados percentuais de grãos de pólen viáveis observados nas análises (acima de 70%), atreladas a presença de receptividade do estigma, indicam a alta potencialidade da espécie como genitor materno ou paterno na obtenção de híbridos ornamentais (OLIVEIRA, 2017).

Diferentemente da análise prévias do potencial de hibridação mediante a viabilidade polínica e receptividade estigmática, a condução de fertilização *in vivo* pode responder questionamentos relacionados a incompatibilidade entre as espécies em função de barreiras pré-zigóticas e ao potencial de utilização de muitas espécies na hibridação. Em *P. gibertii*, *P. galbana*, *P. edmundoi*, *P. mucronata*, *P. racemosa* e *P. edulis*, por exemplo, a realização dessa técnica permitiu a identificação desse tipo de barreira, uma vez que nessas espécies o contato do estigma com os grãos de pólen não promoveu a sua germinação, contrastando com os resultados observados para as espécies *P. foetida*, *P. tenuifila*, *P. suberosa*, *P. morifolia* e *P. capsularis*, as quais foram classificadas como auto-compatíveis (MORERA et al., 2018).

Hibridação e biologia reprodutiva em Passiflora

A apreciação das espécies da família Passifloraceae, especificamente do gênero *Passiflora*, datam dos séculos XVI e XVII com a conquista do ‘Novo Mundo’ pelas expedições espanholas. A fé católica e os elementos florais de morfologia semelhantes à elementos relacionados ao cristianismo, levaram à sua apreciação e denominação de *Passiflora* (flor de la pasión). A admiração pelas flores das passifloras ganhou tamanha proporção que em 1610 uma obra religiosa inspirada nas características de suas flores e na conversão dos povos da América ao cristianismo foi publicada (CERVI, 1997). A partir das expedições jesuíticas, as passifloras foram distribuídas do ‘Novo Mundo’ (Américas) (KILLIP, 1938) para o ‘Velho Mundo’ (Europa) (VANDERPLANK, 2000), passando a ser cultivadas para fins ornamentais em casa de vegetação (PEIXOTO, 2005). Restrita ao cultivo de algumas espécies por produtores locais, a produção dessas plantas só ganhou algum impulso após a obtenção da *Passiflora* ‘violácea’, primeiro híbrido desse gênero ao qual se tem registro (PEIXOTO, 2005).

Até os primeiros cinco 5 anos dos anos 2000, a literatura relatava a obtenção de mais de 400 híbridos de *Passiflora*, dos quais a sua grande maioria obtidos com o intuito agrônômico (PEIXOTO, 2005). Alguns cruzamentos envolvendo *P. edulis* e *P. alata* com espécies de potencial ornamental (*P. caerulea*, *P. mucronata*, *P. galbana*, *P. coccinea*, *P. setacea*) já foram testados (FALEIRO et al. 2011).

A crescente indução da hibridação interespecífica entre espécies de *Passiflora* no Brasil, têm resultado na crescente obtenção e registro de cultivares ornamentais, como o híbrido BRS Estrela do Cerrado, primeiro híbrido de *Passiflora* lançado comercialmente no segmento ornamental no Brasil e de híbridos retrocruzados (BRS Rubiflora e BRS Roseflora) (FALEIRO et al., 2009). Além disso, híbridos como a *Passiflora* ‘Gabriela’, *Passiflora* ‘Bella’ (BELO et al., 2018), *Passiflora* ‘Alva’, *Passiflora* ‘Priscilla’ e *Passiflora* ‘Aninha’, (SANTOS et al., 2012) também já foram registrados perante a Sociedade Internacional de *Passiflora*. Apesar da falta de registro de alguns híbridos obtidos recentemente como a *Passiflora* ‘Jhovis’, *Passiflora* ‘Vivis’ (SOUZA, 2018) e dos híbridos triplos *Passiflora* ‘leonel’s e *Passiflora* ‘vittali’ (SANCHÊS, 2018), a sua obtenção demonstra que a introdução de híbridos ornamentais de *Passiflora* no mercado tende a expandir nos próximos anos.

Em *Passiflora*, a hibridação inter e intraespecífica é favorecida pela abundância e sincronismos no florescimento. Características florais como a viabilidade polínica e a receptividade do estigma constituem-se fatores determinantes na hibridação envolvendo essas espécies (BRUCKNER; OTONI, 1999). Fatores com a compatibilidade genética em função da homologia cromossômica entre as espécies a serem cruzadas são essências para o sucesso na obtenção de híbridos (PEREIRA et al., 2005). Sendo necessária uma meiose regular para que ocorra a recombinação dos genomas das diferentes espécies, resultando assim, na formação de um novo indivíduo com dois conjuntos cromossômicos completos (LAVINSCKY, 2016), e reprodutivamente viável (PAGLIARINI, 2000; 2001; PEREIRA et al., 2017).

Além da geração de cultivares resistentes (JUNQUEIRA et al., 2008), a hibridação em *Passiflora* nos últimos anos, tem recebido um enfoque ornamental mediante a obtenção de variedades com características florais peculiares (ABREU et al., 2009; SANTOS et al., 2012), como flores com formatos e cores diferenciadas, além de maior prolongamento no florescimento (CONCEIÇÃO et al., 2011).

As diferentes combinações alélicas oriundas da fecundação cruzada constituem-se uma característica importante da hibridação em *Passiflora*. A autoincompatibilidade favorece o cruzamento entre genótipos distintos e o aumento da variabilidade genética (MELETTI et al., 2003; SOUZA, et al., 2003), beneficiando o desenvolvimento de Programas de Melhoramento Genético dessas espécies.

Naturalmente, o maracujazeiro é visitado principalmente por abelhas do tipo melíferas (*Apis mellifera*) e por mamangavas (*Xylocopa* spp.), sendo esta última o agente polinizador mais eficiente, uma vez que as mamangavas possuem o tamanho e a estrutura das peças

bucais ideais para o transporte e troca dos grãos de pólen entre as flores (SIQUEIRA; KILL, 2009). Em *P. edulis* a visitação floral por *A. mellifera* pode reduzir a taxa de fecundação cruzada, já que essas abelhas, reduzem a disponibilidade do pólen nas flores e conseqüentemente o seu transporte e troca com outras flores por meio de outros polinizadores (SIQUEIRA; KILL, 2009).

Outro inseto de visitação prejudicial no maracujazeiro são as arapuás, uma vez que elas diminuem a atração dos agentes polinizadores pelo maracujazeiro em função do corte da corona das flores. Beija-flores (*Ensifera ensifera*) (LINDBERG; OLESEN, 2001), vespas e morcegos (BERNACCI et al., 2013b) apesar da menor frequência, também se constituem como promotores da fecundação cruzada no maracujazeiro.

Utilização de marcadores moleculares na confirmação da hibridação

Antes do desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas moleculares de citogenética, a confirmação da paternidade de plantas supostamente híbridas, era realizada mediante a análise de características morfológicas dos pais. A avaliação com base em descritores morfológicos e na manifestação de caracteres intermediário dos pais nos híbridos se constituía como uma metodologia simples (SANTOS et al., 2012), porém demandava bastante tempo. A partir do surgimento de técnicas de biologia molecular, como os marcadores moleculares, resultados mais confiáveis passaram a serem obtidos de forma mais rápida (FALEIRO et al., 2003).

Marcadores moleculares têm sido empregados de forma eficiente na confirmação de híbridos de *Passiflora*. Dentre os mais utilizados se destacam os marcadores dos tipos: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), RAPD (*Random Amplified Polimorphic DNA*) e os marcadores do tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), sendo os dois primeiros capazes de distinguir genótipos heterozigotos e os dois últimos capazes apenas de identificar indivíduos homozigotos (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998; ZÁRATE et al., 2005).

A acurácia das informações fornecidas pelos marcadores codominantes do tipo SSR, resulta na sua preferência para confirmação da hibridação por diversos pesquisadores. Esse tipo de marcador consegue distinguir indivíduos homozigotos de heterozigotos a partir de primers específicos previamente conhecidos e delineados para loco SSR (MELO, 2014). Entretanto, a falta de *primers* específicos para maioria das espécies de *Passiflora* restringe a sua utilização, pois atualmente existem primers desenvolvidos apenas para algumas espécies

como: *P. setacea*, *P. cincinnata*, *P. alata*, *P. edulis* e *P. contracta* (PÁDUA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2005; CAZÉ et al., 2012; CERQUEIRA-SILVA et al., 2014).

Dessa forma, a confirmação de híbridos oriundos de espécies que não possuem *primers* desenvolvidos dependem da transferabilidade de *primers* para essas espécies, assim como realizado para confirmação dos híbridos ornamentais *P. 'Vivis'*, *P. 'Jhovi'* (oriundos do cruzamento *P. coccinea* vs. *P. hatschbachii*) (SOUZA, 2018) via marcadores SSR e para 43 plantas híbridas oriundas do cruzamento *Passiflora vitifolia* vs. *Passiflora hatschbachii* também confirmadas através desse mesmo marcador (SOUZA, 2017). Para marcadores do tipo RAPD também é necessária a realização da transferabilidade, assim como realizado para os híbridos ornamentais *Passiflora 'alva'*, *Passiflora 'priscilla'* e *Passiflora 'aninha'* confirmados tanto por marcadores SSR, quanto por marcadores do tipo RAPD (SANTOS et al., 2012). Híbridos denominados *P. 'Bella'* e *P. 'Gabriela'* também tiveram sua paternidade confirmada utilizando ambos os marcadores (BELO et al., 2018).

O primeiro trabalho publicado com a utilização de marcadores moleculares para a confirmação da hibridação cruzada em *Passiflora* utilizou marcadores moleculares do tipo RAPD para confirmação de 15 genótipos híbridos, tanto híbridos F₁ quanto retrocruzados (JUNQUEIRA et al., 2008). A partir dessa confirmação, diversos outros trabalhos envolvendo a confirmação de híbridos via marcadores RAPD em *Passiflora* foram publicados, como os trabalhos envolvendo o cruzamento e a obtenção de híbridos dos cruzamentos: entre *P. gardneri* vs. *P. gibertii*, *P. watsoniana* vs. *P. gardneri* vs. *P. alata* e *P. watsoniana* vs. *P. alata* (CONCEIÇÃO et al., 2011). A possibilidade de confirmação da natureza híbrida das plantas sem a necessidade de esperar o seu desenvolvimento (FALEIRO et al., 2003), faz dos marcadores moleculares uma ferramenta essencial na redução de tempo e de custos (CONCEIÇÃO et al., 2011) para obtenção de uma nova cultivar, além de contribuir para aceleração dos programas de melhoramento.

Citogenética em espécies e em híbridos do gênero Passiflora

Análises comparativas entre diferentes espécies têm servido como base para o entendimento evolutivo (VIANA; SOUZA, 2012) e reprodutivo das plantas do gênero *Passiflora* (FALEIRO et al., 2008). Importantes descobertas evolutivas e citotaxonômicas, principalmente no que se refere a variações no nível de ploidia, vêm sendo realizadas aplicando-se técnicas clássicas e moleculares de coloração cromossômica em passifloras (MELO et al., 2001, MELO; GUERRA, 2003).

Estudos envolvendo a coloração cromossômica com Giemsa, permitiu observação de passifloras diploides ($2n = 12$, $2n = 18$, $2n = 20$ e $2n = 22$) (MELO et al., 2001; SOUZA et al., 2008), tetraplóides ($2n = 4x = 24$) (KNIGHT, 1991; BRUNER, 1998; MELO; GUERRA, 2003), hexaplóides ($2n = 6x = 36$) (MELO; GUERRA, 2003) e octaplóides ($2n = 8x = 72$) (SNOW; MACDOUGAL, 1993; MELO et al. 2001; MELO; GUERRA, 2003), além do estabelecimento do número de cromossomos básico primário ($x_1 = 6$) e secundário ($x_2 = 9, 10, 12$) do gênero (MELO et al., 2001; MELO; GUERRA, 2003; HANSEN et al., 2006).

Em espécies, a coloração convencional possibilita ainda a identificação de satélites e a elaboração de kariogramas e ideogramas com base pareamento de cromossomos homólogos, assim como realizado para *P. coccinea*, *P. vitifolia* e *P. tholozanii* (OLIVEIRA, 2017). Com tudo, para híbridos de *Passiflora*, o tamanho reduzido e a similaridade cromossômica tornam essa caracterização laboriosa, o que dificulta a análise e a classificação precisa dos cromossomos. (SILVA et al., 2018; SOUZA, 2018). Em algumas espécies, essa dificuldade tem sido observada na identificação e quantificação de satélites (SILVA et al., 2018; SOUZA, 2018). (cadê a citação).

Apesar da coloração com Giemsa não ser tão precisa em todos os aspectos dos estudos cariotípicos, técnicas de citogenética como o bandamento C e a coloração base específica CMA₃/DAPI têm se mostrado eficientes na localização de regiões ricas em heterocromatina constitutiva (VIANA; SOUZA, 2012) e no mapeamento de satélites (MELO et al., 2014), respectivamente. Bem como na análise citotaxonômica entre diferentes espécies. Em *P. edulis* e *P. cacao* a aplicação de bandamento C demonstrou o compartilhamento em comum de regiões heterocromáticas, revelando que apesar de se constituírem como duas espécies diferentes, as mesmas possuem proximidade citogenética (VIANA; SOUZA, 2012).

Passifloras apresentam diferenças entre regiões heterocromáticas ricas em bases GC e AT. Sequências ricas em GC colocalizam com sítios de DNAr 45S e de satélites e são características de Região Organizadora de Nucléolo (RON) em espécies do gênero *Passiflora* (MELO et al., 2014), sendo possível a sua utilização para confirmação de híbridos (ORTOLONI et al., 2007; COELHO et al., 2016), uma vez que os mesmos são considerados marcadores cromossômicos (MELO et al., 2001). Poucas variações numéricas são observadas nessas espécies, por outro lado a posição desses blocos pode ser completamente distinta (MELO et al., 2001; MELO et al., 2014).

A análise CMA₃/DAPI em *P. gardneri*, *P. gibertii* e em híbridos F₁ oriundos desse cruzamento demonstrou a ocorrência de uma variação numérica entre 5 a 6 quatro na presença de blocos CMA₃ nos híbridos, sendo estes valores relacionados aos observados nos genitores

(6 blocos CMA₃ em *P. gадneri* e 5 em *P. gibertii*) (SILVA et al., 2018). *P. vitifolia*, *P. tholozanii* e *P. coccinea*, por exemplo, possuem quatro cromossomos com a presença de satélites, localizados nos pares cromossômicos 1 e 4, 4 e 6, 5 e 7, respectivamente (OLIVEIRA, 2017). Semelhantes resultados quanto a número de blocos foram observados em *P. coccinea*, *P. hatschbachii* e em híbridos HD25 (SOUZA, 2018), bem como nos híbridos triplos e nos genitores de HD28, HD29 e HD30 (SANCHÊS, 2018).

Além do bandamento CMA/DAPI, estudos das características cromossômicas através da hibridação via FISH tem possibilitado a análise sitio-específica entre espécies distintas (VIANA; SOUZA, 2012) e a comparação entre espécies de diferentes táxons (MELO; GUERRA, 2003). Na FISH, regiões de constrição secundária e espécie-específica de DNA 45 e 5S podem ser localizadas e mapeadas através da aplicação de sondas que hibridam no DNA alvo (SCHWARZACHER; HASLOP-HARRISON, 2002) e geram resultados que podem ser utilizados para confirmação da hibridação (HASTEROK et al., 2005) e para comparação evolutiva entre as espécies (SILVA et al., 2005).

Híbridos obtidos do cruzamento entre *P. edulis* f. *flavicarpa* vs. *P. amethystina* tiveram a sua natureza híbrida confirmada através da comparação de regiões de sítios de DNAr 45 S e 5S entre os híbridos e os genitores (SILVA et al., 2005), bem como híbridos oriundos do cruzamento *P. gадneri* vs. *P. gibertii* (SILVA et al. 2018) e híbridos F₁ do cruzamento *P. coccinea* vs. *P. hatschbachii* (SOUZA, 2018). Recombinações cromossômicas em híbridos retrocruzados de *Passiflora* também foram analisadas aplicando-se sondas de DNAr 45 e 5S na FISH (MELO et al., 2017).

GISH em Passiflora

Outra técnica utilizada na confirmação de híbridos que tem gerado resultados satisfatórios é a GISH (Genomic *in situ* hybridization). Derivada da FISH (Fluorescente *in situ* hybridization), a GISH é uma técnica de citogenética molecular que utiliza o DNA genômico marcado dos genitores envolvidos no cruzamento, para identificação dos conjuntos cromossômicos dos parentais nos híbridos e conseqüentemente para confirmação da hibridação (SILVA; SOUZA, 2013). Através dessa metodologia a distinção dos cromossomos nos híbridos pode ser realizada através da hibridação sonda-bloqueio, procedimento no qual o DNA genômico paterno é fragmentado e marcado e o DNA materno não-marcado e em concentração adequada são ambos hibridados nos cromossomos do suposto híbrido (SILVA; SOUZA, 2013), ou através da hibridação sonda-sonda, procedimento no qual o DNA

genômico de ambos os genitores são marcados e hibridado concomitantemente nos cromossomos do híbrido. (MELO et al., 2015a).

Tanto a GISH utilizando DNA sonda-bloqueio, quanto utilizando sonda-sonda têm demonstrado resultados satisfatórios na confirmação de híbridos de *Passiflora*. Em híbridos oriundos do cruzamento *P. gardneri* vs. *P. gibertii*, a utilização do mix de hibridação contendo o DNA paterno marcado e o DNA materno como bloqueio, confirmou o caráter híbrido das plantas F₁ analisadas. Para distinção dos conjuntos cromossômicos herdados dos parentais, foi necessário o aumento da concentração do bloqueio de 100:1 em relação à sonda (SILVA et al., 2018). Ajustes na concentração sonda-bloqueio são necessários quando as espécies envolvidas no cruzamento são filogeneticamente aparentadas, uma vez que o elevado grau de proximidade genética pode resultar em hibridação cruzada e conseqüentemente na baixa distinção entre os diferentes conjuntos cromossômicos (SILVA; SOUZA, 2013).

Na confirmação da hibridação em plantas F₁ e retrocruzadas de *Passiflora*, resultados satisfatórios e semelhantes foram obtidos utilizando-se tanto as sondas dos genitores materno e paterno concomitantemente, quanto na aplicação de um mix de hibridação contendo sonda-bloqueio (MELO et al., 2015a). A distinção de dois lotes cromossômicos utilizando a GISH sonda-sonda também foi relatada para híbridos F₁ do cruzamento *P. coccínea* vs *P. hatschbachii* (SOUZA, 2018) e para híbridos triplos interespecíficos de *Passiflora* (SANCHÊS, 2018). Além disso, a GISH também possibilita a observação de cromossomos recombinantes em híbridos retrocruzados (MELO et al. 2015a) e em híbridos triplos de *Passiflora* (SANCHÊS, 2018).

Avanços nos estudos evolutivos e filogenéticos com base na GISH podem ser alcançados comparando-se a hibridação cromossômica entre diferentes espécies (MELO et al., 2017; SILVA et al., 2018).

Na meiose essa técnica também tem demonstrado ser uma ferramenta bastante eficiente na análise e comparação de eventos meióticos, podendo ser aplicada para verificação de irregularidades cromossômicas proveniente do pareamento entre cromossomos homeólogos dos híbridos e de desbalanceamento cromossômicos originados por problemas no fuso (LAVINSCKY et al., 2017; SOUZA, 2017), bem como para observação da formação de univalentes, bivalentes e multivalentes (YOUNIS et al., 2015), que podem influenciar a viabilidade do híbrido (SILVA; SOUZA, 2013).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, P. P. **Análises em *Passiflora palmeri*, *Passiflora foetida* e híbridos F₁ ornamentais: Relações citogenéticas e caracterização fisiológica.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus 2008.
- ABREU, P. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V., PIRES; M. M.; DE ALMEIDA, A. A. F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, v. 166, n. 3, p. 307-315, 2009.
- AGUIRRE-MORALES, ADRIANA CAROLINA; BONILLA-MORALES, MIGUEL MACGAYVER; CAETANO, CREUCÍ MARIA. *Passiflora franciscoi*, a new species of *Passiflora* subgenus *Astrophea* (Passifloraceae) from Colombia. **Phytotaxa**, v. 252, n. 1, p. 56-62, 2016.
- BARBOSA, L. V.; VIEIRA, M. L. C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener and *P. amethystina* Mikan. **Euphytica**, v. 98, n. 1-2, p. 121-127, 1997.
- BELO, G. O.; SOUZA, M. M.; SILVA, G. S.; LAVINSCKY, M. P. Hybrids of *Passiflora*: *P. gardneri* versus *P. gibertii*, confirmation of paternity, morphological and cytogenetic characterization. **Euphytica**, v. 214, n. 1, p. 2, 2018.
- 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.; SOUZA, M.M. *Passiflora cacao* (Passifloraceae), a new species from Southern Bahia, Brazil. **Novon** (Saint Louis, Mo.), v. 22, p. 1-7, 2012.
- BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. Hibridação em maracujá. In DORÉM, A. (Ed). **Hibridação artificial de plantas**. Viçosa: UFV, p. 379-399, 1999.
- BRUNER, W. R. Tetraploid *Passiflora incarnata*. *Passiflora*, 8(1): 1-2, 1998.
- 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, n. 9, p. 11343-11348, 2012.
- CERQUEIRA- SILVA, C. B.; SANTOS, E. S.; VIEIRA, J. G.; MORI, G. M.; JESUS, O. N.; CORRÊA, R. X.; SOUZA, A. P. New microsatellite markers for wild and commercial species of *Passiflora* (Passifloraceae) and cross- amplification. **Applications in plant sciences**, v. 2, n. 2, p. 1300061, 2014.
- CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; NUNES, O; OLIVEIRA E.J.; L.; SOUZA, A.P. Characterization and selection of passion fruit (yellow and purple) accessions based on molecular markers and disease reactions for use in breeding programs. *Euphytica* (Wageningen), v. 202, n. 3, p. 345-359, 2014.

CERVI, A. C. **Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora***. Cyanus, 1997.

CERVI, A. C. **O gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae) no Brasil: espécies descritas após o ano de 1950**. Real Jardín Botánico, 2006.

CERVI, A. C.; LINSINGEN, L. V. *Passiflora kikiana*, a new species of Passifloraceae from the Brazilian Amazon. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 4, p. 1062-1064, 2010.

CERVI, A.C.; IMIG, D.C. A new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Phytotaxa**, p. 46 - 50, 2013.

COELHO, M.S.E.; BORTOLETI, K.C.A.; ARAÚJO, F.P.; MELO, N.F. Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrid and its parents. **Euphytica** v. 210, n. 1, p. 93-104, 2016.

CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; SOUZA, M. M.; BELO, G. D. O.; SANTOS, S. F. D.; FREITAS, J. C. O. D. Hybridization among wild passionflower species. **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, n. 2, p. 237-240, 2011.

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

DAS, M. R.; HOSSAIN, T.; MIA, M. B.; AHMED, J. U.; KARIMAN, A. S.; HOSSAIN, M. M. Fruit setting behaviour of passion fruit. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 05, p. 1066, 2013.

DETTKE, G. A.; SANTOS, R. D. Tipos de aberturas dos grãos de pólen de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Acta botanica brasilica**, v. 23, p.1119-1128, 2009.

ESQUERRE-IBÁÑEZ, B. A new species of *Passiflora* supersection Tacsonia (Passifloraceae) from Amazonas, Northern Peru. **Phytotaxa**, v. 202, n. 4, p. 266-72, 2015.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; DE OLIVEIRA, E. J.; PEIXOTO, J. R.; COSTA, A. M. Germoplasma e melhoramento genético do maracujá-histórico e perspectivas. **Documentos**, 2011.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R.; BORGES, R. D. S.; ARAÚJO, S. D.; SOARES-SCOTT, M. D. BRS Estrela do Cerrado, BRS Rubiflora, BRS Roseflora: híbridos de maracujazeiro para uso como plantas ornamentais. **Embrapa Cerrados-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2008.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados de pesquisa 2005-2008.

FALEIRO, F. G.; PIRES, J. L.; LOPES, U. V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotropica**, v. 15, p. 41-46, 2003.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F.; PEIXOTO, J.R. Pré-melhoramento do maracujá. In: LOPES, M.A.; FAVERO, A.P.; FERREIRA, M.A.J.F.; FALEIRO, F.G.;

FOLLE, S.M.; GUIMARÃES, E.P. (Eds.) Pré-melhoramento de plantas: estado da arte e experiências de sucesso. Embrapa Informação Tecnológica: Brasília-DF, p. 550-570, 2011.

FARIAS NETO, AL de; RIBEIRO JÚNIOR, WQ (Ed.). **Livros e cultivares apresentados no II Encontro da Sociedade Brasileira de Melhoramento de Plantas–Regional-DF. Planaltina: Embrapa Cerrados**, p. 44-45, 2009.

FAUSTINO, T. T.; BATISTA, R. B.; ANDREATINI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 32, p. 429-436, 2010.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético**. Embrapa, 1998.

HANSEN, A. K.; GILBERT, L. E.; SIMPSON, B. B.; DOWNIE, S. R.; CERVI, A. C.; JANSEN, R. K. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany**, v. 31, n. 1, p. 138-150, 2006.

HASTEROK, R.; KSIAZCZYK, T.; WOLNY, E.; MALUSZYNSKA, J. FISH and GISH analysis of Brassica genomes. **Acta Biol. Cracov. Ser. Bot**, v. 47, p. 185-192, 2005.

IMIG, D. C.; CERVI, A. C. A new species of *Passiflora* L. (Passifloraceae), from Espírito Santo, Brazil. **Phytotaxa**, v. 186, n. 5, p. 292-296, 2014.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BELLON, G.; RAMOS, J. D.; BRAGA, M. F.; SOUZA, L. D. Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 191-196, 2008.

KILLIP, E. P. The American species of Passifloraceae. **The American species of Passifloraceae.**, n. 407, 1938. KNIGHT, R. J. Development of tetraploid hybrid passion fruit clones with potential for the north temperate zone. **HortScience**, v. 26, n. 12, p. 1541-1543, 1991.

LAVINSCKY, M. P. **Análises meióticas em genitores e híbridos interespecíficos F₁ (Progênie HD15) de *Passiflora* L.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2016.

LAVINSCKY, M.P.; SOUZA, M.M.; SILVA, G.S.; MELO, C.A.F. Contributions of classical and molecular cytogenetic in meiotic analysis and pollen viability for plant breeding. **Genetics and Molecular Research** v. 16, n. 3, 2017.

LINDBERG, A. B.; OLESEN, M. O. The fragility of extreme specialization: *Passiflora mixta* and its pollinating hummingbird *Ensifera ensifera*. **Journal of Tropical Ecology**, v. 17, p. 323-329, 2001.

LOZADA-PÉREZ, LUCIO; GUTIÉRREZ, JORGE FERNANDO ROJAS. A new species of *Passiflora* L. (Passifloraceae) from Guerrero and Oaxaca, México. **Phytotaxa**, v. 263, n. 3, p. 297-300, 2016.

MACDOUGAL, J. M.; OCHOA, J.; KROSNICK, S. E. *Passiflora intricata*, an apetalous new species from the Dominican Republic in Supersection Auriculatae (Passifloraceae). **Phytotaxa**, v. 367, n. 3, p. 291-296, 2018.

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

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

MELETTI, L. M. M.; SANTOS, R. R. dos.; MINAMI, K. Melhoramento do Maracujazeiro Amarelo: Obtenção do Cultivar ‘Composto IAC-27’. **Scientia Agricola**, v. 57, p. 491-498, 2000.

MELO, C. A. F. **Caracterização morfológica, citogenética e confirmação molecular de híbridos interespecíficos retrocruzados de *Passiflora* L.** Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2014.

MELO, C. A. F.; SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Establishment of the genomic in situ hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 1, p. 2176-2188, 2015a.

MELO, C. A. F.; SOUZA, M. M.; ABREU, P. P.; VIANA, A. J. C. Karyomorphology and GC-rich heterochromatin pattern in *Passiflora* (Passifloraceae) wild species from Decaloba and *Passiflora* subgenera. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 209, n. 11, p. 620-631, 2014.

MELO, C. A. F.; SOUZA, M. M.; SILVA, G. S. Karyotype analysis by FISH and GISH techniques on artificial backcrossed interspecific hybrids involving *Passiflora sublanceolata* (Killip) MacDougal (Passifloraceae). **Euphytica**, v. 213, n. 8, p. 161, 2017.

MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 226, n. 1-2, p. 69-84, 2001.

MELO, N. F.; GUERRA, M. Variability of the 5S and 45S rDNA sites in *Passiflora* L. species with distinct base chromosome numbers. **Annals of Botany**, v. 92, n. 2, p. 309-316, 2003.

MORALES, MIGUEL MACGAYVER BONILLA; AGUIRRE-MORALES, Carolina; CARDENAS, Julian. *Passiflora creuci-caetanoae* a new species of *Passiflora* L. supersection Tacsonia (Passifloraceae) from Colombia. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 267-274, 2016.

MORERA, M.; COSTA, A.; FALEIRO, F.; CARLOSAMA, A.; CARRANZA, C. Maracujá: dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico. **Embrapa Cerrados-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2018.

- MORERA, M.; COSTA, A.; FALEIRO, F.; CARLOSAMA, A.; CARRANZA, C. Maracujá: dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico. **Embrapa Cerrados-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2018.
- NUNES, T. S.; QUEIROZ, LP de. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus**, v. 6, n. 3, p. 194-226, 2006.
- OLIVEIRA, E. D.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 2, p. 331-333, 2005.
- OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. **Simpósio Brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro**, v. 5, n. 19989, p. 291-310, 1998.
- OLIVEIRA, O. L. S. **Análises genéticas e citogenética em espécies de *Passiflora* L. existentes no banco ativo de germoplasma (BAG-Passifloras) da UESC**. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2017.
- ORTOLONI, F. P.; MATAQUEIRO, M. F.; MORO, J. R. Caracterização citogenética em *Schlumbergera truncate* (Haworth) Moran e *Schlumbergera x buckley* (T. Moore) Tjaden (Cactaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 21, p. 361-367, 2007.
- 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, n. 4, p. 863-865, 2005.
- PAGLIARINI, M. S. Citogenética aplicada ao melhoramento. **In: Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001.
- PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, p. 997-1002, 2000.
- PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.457-464, 2005.
- PEREIRA, T. N. S.; GERONIMO, I. G. C.; ROSSI, A. A. B.; PEREIRA, M. G. *Passiflora cristalina* and *Passiflora miniata*: meiotic characterization of two wild species for use in breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, p. 273-279, 2017.
- PEREIRA, T.; NICOLI, R. G.; MADUREIRA, H.; JUNIOR, P. C. D.; GABURRO, N. D. O. P.; COUTINHO, K. Caracterização morfológica e reprodutiva de espécies silvestres do gênero *Passiflora*. **IV REUNIÃO TÉCNICA DE PESQUISAS EM MARACUJAZEIRO**, p. 29, 2005.

PÉREZ, J. A. O.; MOLINARI, M. *Passiflora gustaviana*, a new species of *Passiflora* (Supersection Laurifolia) from Colombia revealed by multivariate analysis. **Systematic Botany**, v. 42, n. 4, p. 848-858, 2017.

RUSHING, F. **Tough plants for southern gardens-low care, no care, tried and true winners**. Nashville: Cool Springs Press, p. 240, 2003.

SANCHÊS, R. C. V. S. **ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM ACESSOS DE *Cucumis melo* L. E HÍBRIDOS TRIPLOS DE *Passiflora* L.** Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2018.

SANTOS, E. A.; SOUZA, M. M.; ABREU, P. P.; ARAÚJO, I. S.; VIANA, A. P.; DE ALMEIDA, A. A. F.; DE OLIVEIRA FREITAS, J. C. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**, v. 184, n. 3, p. 389-399, 2012.

SCHWARZACHER, T; HASLOP-HARRISON, P. Practical in situ Hybridization. **Springer-Verlag Inc.**, New York. 2002.

SHIVANNA, K. R. Pollen Biology and Biotechnology Science Publishers. **Enfield, NH, USA**, 2003.

SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Genomic in situ hybridization in plants. **Genet Mol Res**, v. 12, n. 3, p. 2953-65, 2013.

SILVA, G. S.; SOUZA, M. M.; DE MELO, C. A. F.; URDAMPILLETA, J. D.; FORNI-MARTINS, E. R. Identification and characterization of karyotype in *Passiflora* hybrids using FISH and GISH. **BMC genetics**, v. 19, n. 1, p. 26, 2018.

SILVIA, M. C.; VIEIRA, M. L. C.; MONDIN, M.; AGUIAR-PERECIN, M. L. Comparative karyotype analysis of three *Passiflora* L. species and cytogenetic characterization of somatic hybrids. **Caryologia**, v. 58, n. 3, p. 220-228, 2005.

SIQUEIRA, K. M. M.; KIILL, LHP. Informações sobre polinizadores em maracujazeiro no Vale do São Francisco. **Embrapa Semiárido-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

SNOW, N.; MACDOUGAL, J. M. New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Systematic Botany**, p. 261-273, 1993.

SOUZA, A. C. **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, ESTIMATIVA DE PARÂMETROS GENÉTICOS E ANÁLISES DE COMPORTAMENTO MEIÓTICO EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS F₁ DE *Passiflora* L.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2017.

SOUZA, M. A. D.; HOPKINS, M. J. G. *Passiflora fissurosa*, uma nova espécie de Passifloraceae para o Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 41, n. 4, p. 449-452, 2011.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; DA CRUZ SILVA, L. DA SILVA REIS, D. S.; SUDRÉ, C. P. Karyotype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro. **Cytologia**, v. 68, n. 2, p. 165-171, 2003.

- SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; MADUREIRA, H. C. Flower receptivity and fruit characteristics associated to time of pollination in the yellow passion fruit *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Passifloraceae). **Scientia Horticulturae**, v. 101, n. 4, p. 373-385, 2004.
- SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 247-258, 2008.
- SOUZA, M.M., PEREIRA, T.N.S. Passifloras como plantas ornamentais. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS. Lavras, MG. Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais. UFL, Lavras, MG, p.24, 2003.
- SOUZA, V. O. de. **ANÁLISES MORFOLÓGICAS, GENÉTICAS E CITOGENÉTICAS EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Passiflora coccinea* e *P. hatschbachii***. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2018.
- TECHIO, V. H.; DAVIDE, L. C. Análise genômica em cromossomos de plantas com base no pareamento meiótico. **Biotemas**, v. 20, n. 4, p. 7-18, 2007.
- ULMER T, MACDOUGAL JM. **Passiflora - passionflowers of the world**. Timber Press, Portland, 2004.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M.; ULMER, B. *Passiflora: Passionflowers of the world*. Portland, Or.: Timber Press 430p.-illus., col. illus. ISBN, v. 881926485, 2004.
- VANDERPLANK, J. **Passion flowers**. 3^a ed. Cambridge: The MIT Press, 224 p., 2000.
- VIANA, A. J. C.; SOUZA, M. M. Comparative cytogenetics between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensis*. **Plant Biology**, v. 14, n. 5, p. 820-827, 2012.
- YOUNIS, A.; RAMZAN, F.; HWANG, Y.J.; LIM, K, B. FISH and GISH: molecular cytogenetic tools and their applications in ornamental plants. **Plant Cell Rep.**, v. 34, p. 1477 - 1488, 2015.
- ZÁRATE, S.; PÉREZ-NASSER, N.; CASAS, A. Genetics of wild and managed populations of *Leucaena esculenta* subsp. *Esculenta* (Fabaceae; Mimosoideae) in La Montaña of Guerrero, Mexico. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 52, n. 7, p. 941-957, 2005.

CAPÍTULO 1 Manuscrito nas normas da revista Euphytica

Aline Pinto dos Santos¹, Margarete Magalhães Souza^{1*}, Gonçalo Santos Silva¹

Contributions of genetic, cytogenetic and morphological studies in species and *Passiflora* hybrids

¹Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Melhoramento de Plantas, Rod. Jorge Amado, Km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brazil.

*Corresponding author: e-mail: souzammag@yahoo.com.br (M.M. Souza); Phone/Fax.: +557336805055.

ABSTRACT

More than 500 species of passion fruit have been described, most of them species with potential for ornamentation. Brazil is an important center of diversity of the genus *Passiflora* with the occurrence of more than one hundred native species. In addition to the discovery of new species, recent research has focused on obtaining hybrids with differentiated colors and exotic forms. The presence of peculiar characteristics, such as a corona with remarkable features and vast numbers of species with differentiated flowers, has aroused interest in the development of new cultivars. Through artificial crosses, intra and interspecific hybrids have been obtained and studied regarding chromosomal inheritance patterns through classical and molecular techniques of karyotype analysis. Molecular tools such as FISH and GISH have provided support for understanding how the inheritance and expression of genotypic parameters determine hybrids characteristics, as well as the occurrence of chromosomal changes triggered by different types of crosses. Molecular assessments of both species and hybrids show that chromosomes in these individuals tend to be metacentric or submetacentric and have the presence of 2 to 3 pairs of satellites. In addition, the use of SSR, ISSR and RAPD markers are efficient in confirming *Passiflora* hybrids and it is an important tool in the analysis of genetic diversity. Parallel to these observations, aspects related to floral biology and the preference of hybrids for more enlightened environments also provide a great knowledge about the production and the conditions of cultivation of the species and hybrids, stimulating the use of the genus *Passiflora* in the market of ornamental plants. In this context, this article aims to demonstrate the importance of classical and molecular cytogenetic

techniques in investigating karyotypic aspects of species and *Passiflora* hybrids, as well as to demonstrate the best cultivation conditions for the development of these hybrids.

Key-words: cytogenetic, interespecific hybrids, luminosity, ornamental plants, *Passiflora* hybrids

INTRODUCTION

Because it is a center of diversity of the genus *Passiflora*, Brazil assumes a prominent position in the possession of a varied number of wild species of this genus. Of the species known today, 137 are native to the Brazilian flora, with occurrence of endemic species (Bernacci et al. 2013). Despite the large number of known species and the constant discovery of new species with potential for various purposes, the species of the family Passifloraceae are used almost exclusively for food and medicinal purposes (Agriannual 2017).

Probably tropical forests are home to several *Passiflora* species with ornamental potential, which have not yet been described in the literature. Despite the increase in the number of researches for this genus, the access difficulties can maintain a large number of species without botanical description or occurrence record, as occurred for *P. cacao* Bernacci & M.M. Souza, which remained unknown to botanical community until the year 2012, when it was described by Bernacci and Souza (2012). The knowledge of these species and their use in gardening and ornamentation can serve as support for the preservation of wild germplasm threatened with extinction (Abreu et al. 2008). Research about *Passiflora* genus in recent years has made possible characterization of new species and the registration of hybrids for the ornamental segment, which is still little explored in Brazil. However, it is still necessary to promote knowledge of the scenic beauty and ornamental potential of the various *Passiflora* species (Abreu et al. 2008).

Passiflora cultivation for ornamental purposes began around 1,625 in Europe from the introduction of these plants in the "Old World" (Vanderplank 2000) from the Americas (Killip 1938) through Jesuit expeditions. They were later cultivated in a greenhouse around the 17th century. Subsequently, artificial hybrids and selected clones of *P. incarnata* L. and *P. caerulea* L. were used in landscaping in Europe and North America (Peixoto 2005). The introduction of species of *Passiflora* genus in Europe made it possible to spread to other continents, under different environmental and cultivation conditions, such as, for example, walls, pergolas, fences and even potting (Ulmer and MacDougal 2004; Vanderplank 2000). The potential of the use of passifloras has aroused the interest of several horticulturists and researchers, allowing studies on their morphology, chromosomal characteristics, floral biology, heritability, crosses and hybrids. These studies generate a large volume of data that allows us to understand molecular, cytogenetic and reproductive mechanisms of these species,

as well as the best way of cultivation (Junqueira et al. 2008; Cerqueira-Silva et al. 2014; Souza et al. 2018; Melo et al. 2017).

The great interest in passifloras allowed the maintenance of different genotypes in Active Germoplasm Bank, in order to ensure conservation of genetic variability (Oliveira 2017). Aiming the conduction of research and the conservation of wild characteristics that can be used in breeding programs, as well as the knowledge of efficient crossing strategies to obtain new hybrids and the best cytogenetic techniques for the study of species and hybrids of passifloras. In this context, the main objective of this article is to report the importance of chromosome studies and the advances obtained in the study of hybrids and species belonging to the *Passiflora* genus, as well as to demonstrate how the evaluation of morphological characteristics under different growing conditions can contribute to a new perspective of the use of passifloras in the segment of ornamental plants.

Cytogenetics in species and hybrids of the genus *Passiflora*

In recent years, the use of classical and molecular cytogenetic techniques has been widely used in the investigation of chromosomal patterns and *in situ* hybridization in several species and hybrids of the genus *Passiflora*. (Coelho et al. 2016; Melo et al. 2017; Silva et al. 2018). Studies related to cytogenetics in passifloras hybrids, in general, aim understanding morphological and molecular characteristics of chromosomal (Melo et al. 2016). Classical techniques such as C-band (staining of constitutive heterochromatin regions), CMA₃ (chromomycin A₃)/DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindol) and molecular techniques such as FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) and GISH (Genomic *in situ* hybridization) have supported the understanding of traits related to inheritance and chromosomal behavior from crosses involving different species of the genus, and thus generating refined data that enable classification and comparison of chromosome characteristics, as well as evolutionary and diversity among different species (Santos et al. 2012; Melo 2014; Melo et al. 2016)

Through classical cytogenetics, it has been possible to compare important differences that help in the characterization and serve to elucidate karyotype organization and evolution of species belonging to the genus *Passiflora* (Melo and Guerra 2001). The proximity between these species is directly related to evolutionary traits resulting from numerical and structural chromosome modifications. Generally, these modifications tend to be smaller among genetically related species (Hansen et al. 2006). Karyotypic analysis of two species belonging to the subgenus *Decaloba*: *P. capsularis* L. ($2n = 12$). and *P. rubra* L. ($2n = 12$) demonstrated

that these species share some chromosomal similarities resulted from evolutionary events, such as the number and position of satellites.

Cytogenetic descriptions of species of the genus *Passiflora* report the occurrence of diploid individuals $2n = 12$, $2n = 18$, $2n = 20$ and $2n = 22$ (Melo et al. 2001) and polyploids $2n = 4x = 24$ (Knight 1991; Melo et al. 2001; and Melo and Guerra 2003). In addition to variations in chromosome number, cytogenetic studies demonstrate variations in centromeric position in chromosomes of different species. Evolutionary parameters that have aided in taxonomic classification of species (Melo and Guerra 2003). The analysis of the karyotype of *P. alata* Curtis, *P. edmundoi* Sacco., *P. malacophylla* Mast., *P. mucronata* Lam., *P. galbana* Mast., *P. quadrangularis* L. (Souza et al. 2003), *P. edulis* Sims. and *P. cacao* (Viana and Souza 2012) showed that all species have the same chromosomal number ($2n = 18$) differing only in the centromeric position (Souza et al. 2003, Viana and Souza 2012). That variation, as well as the variations observed in the number and relative size of the chromosomes, are probably related to evolutionary processes caused by karyotypic alterations in the species, through numerical and structural rearrangements, which imply in the differentiation between the species (Amorim et al. 2013).

Parallel to chromosome number and centromere position, the presence of satellites also helps in the comparison and establishment of proximity between passifloras species (Melo et al. 2011; Viana and Souza 2012). In *Passiflora* heterochromatin distribution (regions rich in GC and AT) differ between species and it is probably related to evolutionary events that allows comparison between different species and its classification by CMA₃/DA/DAPI banding (Melo et al. 2014). The presence of satellites varies from one to three pairs between different species into the *Passiflora* genus (Melo et al. 2001; Melo et al. 2014; Snow and Macdougall 1993; Vieira et al. 2004). CMA₃⁺ fluorochrome banding in *P. edulis* and *P. cacao*, for example, made it possible to observe two pairs of satellites in both species (Viana and Souza 2012). Same results were found for *P. quadrangularis*, *P. alata*, *P. mucronata* and *P. galbana* (Souza et al., 2003). In some other species of *Passiflora*, this technique also showed satisfactory results (Melo et al., 2013). However, the location of these chromosomal structures can vary completely, as observed in the table 1.

Table 1 Satellites location in *Passiflora* chromosomes through the application of cytogenetic techniques.

| Species | Chromosome Location | Cytogenetic Technique | References |
|---|------------------------------|------------------------------|----------------------|
| <i>P. actinia</i> | Pairs two, seven and nine | CMA/DA/DAPI | Melo et al. 2014 |
| <i>P. alata</i> | Pairs one and two | NOR | Souza et al. 2003 |
| <i>P. bahiensis</i> | Pairs two and seven | CMA/DA/DAPI | Melo et al. 2014 |
| <i>P. cacao</i> | Pairs one and eight | CMA and FISH | Viana and Souza 2012 |
| <i>P. coccinea</i> | Pairs five and nine | CMA/DA/DAPI | Melo et al. 2014 |
| <i>P. coriacea</i> | Pairs one and four | CMA/DA/DAPI | Melo et al. 2014 |
| <i>P. edmundoi</i> | One pair at chromosome three | Feulgen | Souza et al. 2003 |
| <i>P. edulis</i> | Pairs one and four | CMA and FISH | Viana and Souza 2012 |
| <i>P. ferrugínea</i> | Pairs three and six | CMA/DA/DAPI | Melo et al. 2014 |
| <i>P. filamentosa</i> | Pairs two and four | CMA/DA/DAPI | Melo et al. 2014 |
| <i>P. foetida</i> | Pairs one and ten | FISH | Melo et al. 2017 |
| <i>P. galbana</i> | Pairs two and four | Feulgen | Souza et al. 2003 |
| <i>P. gardneri</i> | Pairs one, four and seven | FISH | Silva et al. 2018 |
| <i>P. gibertii</i> | Pairs two, seven and nine | FISH | Silva et al. 2018 |
| <i>P. hastchbachii</i> | Pairs three and eight | CMA/DA/DAPI | Melo et al. 2014 |
| <i>P. malacophylla</i> | One pair at chromosome three | Feulgen | Souza et al. 2003 |
| <i>P. micropetala</i> | Pairs two and five | CMA/DA/DAPI | Melo et al. 2014 |
| <i>P. misersii</i> (Poços de Caldas) | Pairs one and two | CMA/DA/DAPI | Melo et al. 2014 |
| <i>P. misersii</i> (São Roque de Minas) | Pairs one and two | CMA/DA/DAPI | Melo et al. 2014 |
| <i>P. mucronata</i> | Pairs five and six | Feulgen | Souza et al. 2003 |
| <i>P. quadrangularis</i> | Pairs one and eight | Feulgen | Souza et al. 2003 |
| <i>P. serrato-digitata</i> | Pairs three, five and nine | CMA/DA/DAPI | Melo et al. 2014 |
| <i>P. setacea</i> | Pairs two and five | CMA/DA/DAPI | Melo et al. 2014 |

| | | | |
|--------------------------|-----------------------------|------|------------------|
| <i>P. subblanceolata</i> | Pairs two, eight and eleven | FISH | Melo et al. 2017 |
| <i>P. subrotunda</i> | Pairs three, five and six | FISH | Melo et al. 2014 |
| <i>P. vitifolia</i> | Pairs one and four | FISH | Melo et al. 2014 |

The refinement of molecular cytogenetics techniques has enabled the visualization of chromosomal characteristics of great relevance in the understanding of recombination and chromosomal inheritance. Techniques such as GISH and FISH have facilitated the understanding of meiotic and inheritance behavior in both species and hybrids (Melo and Guerra 2003; Silva and Souza 2013; Coelho et al. 2016). Chromosomal alterations are important cytogenetic events involved in the differentiation and evolution of species and are directly related to the ability of pairing between chromosomes (Huang and Zhang 2009), as shown in some studies conducted using molecular cytogenetic techniques. The occurrence of recombinations and deletions are involved in chromosomal modifications from crosses between different species (Melo et al. 2017; Sanchês 2018) and can be detected by FISH and GISH. In backcrossed hybrids (BC₁) originated from the cross between *P. subblanceolata* (ex *P. palmeri* var. *subblanceolata*) ($2n = 22$) and *P. foetida* ($2n = 22$), there were the observation of individuals $2n = 20$, $2n = 21$ and $2n = 22$ using FISH technique (Melo et al. 2017). The conservation of the total chromosomes number from the maternal parent and the formation of a triple hybrid $2n = 3x = 30$ has also been observed with the same technique (Melo et al. 2017).

As well as the CMA₃ technique, changes in the number and positions of satellites were also visualized by FISH using 45S rDNA as probe in *P. subblanceolata* and *P. foetida* (table 1) (Melo et al. 2017). Variations in the number, and position of 5S and 45S rDNA sites in hybrids may occur as a result of hybridization between two distinct species and be detected by FISH, as demonstrated for some *Passiflora* hybrids (Melo et al. 2017). In HD13-101 and HD13-133 originated from the cross *P. subblanceolata* vs. *P. foetida*, for example, the number (2 pairs) of 5S rDNA sites was the same as the parents (Melo et al. 2017) and as the *P. cacao* (Viana and Souza 2012). However, for the hybrids HD13-134 and HD13-143 the number of 5S rDNA sites differed, only two chromosomes were observed with 5S rDNA sites in HD13-134 and three sites in HD13-143 (Melo et al. 2017). Presence of specific sites inherited from maternal and paternal parent in hybrids, allows confirmation of hybridization through the application of FISH (Silva et al. 2018; Melo et al. 2015b) since these sites may behave as specific chromosomal markers (Silva and Souza 2013). For the hybrids obtained from the

cross between *P. gardneri* and *P. gibertii*, the number of sites related to 45S rDNA varied between 5 and 6 sites, and the number of 5S rDNA sites were three in all individuals, supporting the confirmation of hybridization. The marking allowed visualization of 45S and 5S rDNA site-specific in hybrids, inherited from maternal and paternal chromosomes (Silva et al. 1981).

In addition to FISH, GISH has allowed the confirmation of hybridization and the determination of parental proximity between different species. Recombination analysis involving backcross hybrids have also been facilitated through the use of these techniques (Melo et al. 2017), allowing cytogenetic characterization of new cultivars. In F₁ progenies, the nature of the hybrid character has been performed using genomic DNA of both parents involved in the crossing and with the use of probe and blocking DNA (Souza 2018; Sanchês 2018). The progeny obtained from crossing *P. gardneri* vs. *P. gibertii*, for example, had their hybrid character confirmed, using paternal DNA as a probe and maternal DNA as a blocking DNA (100x more concentrated) (Silva et al. 2018). In addition to the application of GISH with probe-blocking DNA, good results have also been obtained using both, paternal and maternal DNAs simultaneously as probe (Melo et al. 2015a). Sixteen F₁ hybrids, originated by crossing *P. coccinea* and *P. hatschbachii* were confirmed by using genomic probes from both parents. In total, 9 maternal and 9 paternal chromosomes were observed distinctly in the genome constitution of the hybrids (Souza 2018). GISH also proved the hybrid nature of backcrossed hybrids (Melo et al. 2017).

The level of proximity between species is a critical factor in the differentiation of parental genomes through GISH. Chromosomes of closely related species tend to exhibit high cross-hybridization, making it difficult to distinguish clearly from the maternal and paternal chromosomes, especially when both DNAs are used as a probe (Silva and Souza 2013). The performance of GISH in HD15-101 F₁ hybrids (*P. gardneri* vs. *P. gibertii*), for example, required adjustment tests for better differentiation in paternal genitor probe hybridization, due to strong cross-hybridization (Silva et al. 2018). The increase in the concentration of 100x of the blocking DNA was necessary for a differentiation between the chromosomes of *P. gibertii* and *P. gardneri* (Silva et al. 2018), since the greater the proximity between species, the greater the amount repetitive sequence and consequently higher is the percentage of occurrence of cross-hybridization (Silva 2017). Increases in the concentration of the blocking DNA to better distinguish the chromosomes of the parent species has been reported by several authors (Stace and Bailey 1999; Silva and Souza 2013).

Parallel to chromosome homology, the size of chromosomes of the species involved in the crossing also directly influences the distinction of chromosomes inherited by the hybrids, since the occurrence of chromosomes of similar size makes it difficult to distinguish them (Silva 2014). However, even in hybrids with chromosomes ranging from 1 to 2.5 μm in length, the technique has shown to be efficient in confirming, as demonstrated in backcrossed HD13 hybrids when genomic DNA of *P. subanceolata* as blocking DNA 100x more concentrated than the paternal genitor's probe. (Melo et al. 2015b). Contradictory to positive results the use of GISH in the confirmation of backcross hybrid of *Passiflora*, is still incipient.

In addition to backcross analysis, GISH has also been little used for meiotic analysis of *Passiflora* hybrids. The first report of GISH application for analysing meiose in hibrids (originated from *P. gardneri* vs. *P. gibertii*) was made using a mix hybridization probe-blocking, which allowed the observation of chromosomes irregularities with formation of bivalents, tretavalents and multivalentes arrangment (Lavinsky 2016), as well as in hybrids of the crossing between *P. vitifolia* Kunth and *P. hatschbachii*, where there was the visualization of pairing between homeologous and homologous chromosomes belonging to the two species (Souza 2017). Events related to the formation of chromosomal bridges, delayed chromosomes and irregularities in the orientation of spindle fibers gave rise to unbalanced post-meiotic products, resulting in low viability of hybrids (Lavinsky 2016; Souza 2017).

Even in the analysis of chromosomes of reduced size such as *Passiflora*, GISH allows the observation of karyotype rearrangement (Melo et al. 2017). Em híbridos triplos oriundos do cruzamento F_1 *P. coccinea* vs *P. hatschbachii* e posteriormente com *P. cincinnata* Mast., *P. tholozani* ou *P. mucronata*, hybridization of simultaneous probes demonstrated that the genomes of hybrids are composed of 9 chromosomes from the parents involved in the F_1 crossing and 9 chromosomes from the third species involved (Sachês 2018). In addition, it was also possible to observe the occurrence of recombined chromosomes. The occurrence of umbalance in chromosome contribution, recombination is an expected feature in triple hybrids (Sachês 2018) and could be associated with the pairing between homeologous chromosomes in meiosis, which favors recombination (Lavinsky 2016).

In general, caryomorphology studies of the different species are performed based on the visualization of centromerical position, chromosome length and satellite localization by means of the conventional staining with Giemsa, which allows pairing between homologous chromosome (Guerra 2002). When it comes to *Passiflora* hybrids, the occurrence of satellite more difficult due to the reduced size of the chromosomes and the similarity in the position of

the centromere (Silva 2014; Souza 2018), reducing its application to the chromosome counting (Soares-Scott et al. 2005). Although the limitations presented by conventional staining, its importance in the studies of *Passiflora* can not be disregarded, since important results, complementary to the application of molecular cytogenetics, regarding the karyotypic characteristics of hybrids and species of this genus have been reported by several authors (Viana and Souza 2012; Melo et al. 2014; Belo et al. 2015; Oliveira 2017).

The use of molecular markers in hybridization confirmation and diversity analysis of passion flowers

The use of molecular markers has been shown to be efficient in confirming interspecific hybridization in *Passiflora* and in assisting breeding programs (Belo et al. 2018; Conceição et al. 2011b; Melo et al. 2016). Researches related to passifloras have focused on obtaining hybrids by performing intra and interspecific crosses. However, obtaining hybrids faces reproductive difficulties that need to be overcome quickly and accurately (Melletti 2005; Vanderplank and Zappi 2011). In this sense, the confirmation of hybridization with the use of molecular markers has been a tool that allows to obtain rapid advances in the stages of a breeding program, as observed in recent works involving hybridization between different species of the genus *Passiflora*. The use of ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), SSR (Simple Sequence Repeats) and RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) have generated reliable data of paternity of *Passiflora* hybrids, reducing time for conducting researches involving hybridization (Oliveira et al. 2005; Junqueira et al. 2008; Santos et al. 2012).

The success in obtaining interspecific hybrids is directly related to synapse and chromosomal pairing (Lavinsky 2016). The level of homology between the individuals should allow pairing between homeologous chromosomes (Souza et al. 2003a) in order to ensure their correct segregation during anaphase. (Fachinetto and Tedesco 2009). The chromosomal homology between *P. sublancoolata* and *P. foetida* var. *foetida* made it possible to obtain interspecific hybrids, which were confirmed by SSR and RAPD markers (Santos et al. 2011). Of the four crosses involving *P. gardneri* vs. *P. alata*, *P. watsoniana* vs. *P. alata*; *P. watsoniana* vs. *P. gardneri*, and *P. gardneri* vs. *P. gibertii* were all confirmed with RAPD markers by the presence of informative bands (Conceição et al. 2011a). Bands with 240 and 280 bp were amplified for *P. sublancoolata* and *P. foetida* var. *foetida*, respectively (Santos et al. 2011). These results obtained through the use of molecular markers demonstrates the efficiency and accuracy of this technique in the confirmation of hybrids and it is extremely

important, since they are contributes to the acceleration of breeding programs (Faleiro et al. 2008). Several *Passiflora* hybrids have already been obtained and confirmed by molecular markers, as observed in table 2. Due to their dominant character and the distinction between heterozygous and homozygous individuals, SSR molecular markers have been preferred in the confirmation of hybrids. However, the use of this type of marker requires the prior knowledge of sequences species that are not yet widely known in passifloras (Litt and Luty 1989; Selkoe and Toonen 2006), being restricted to species such as *P. cincinnata*, *P. edulis*, *P. contracta*, *P. alata*, and *P. setacea* (Oliveira 2005; Cerqueira-Silva et al. 2012; Cerqueira-Silva et al. 2014, Cazé et al. 2012; Pádua et al. 2005).

Table 2 Hybrids F₁ and backcrossed of *Passiflora* confirmed by molecular markers

| Parents | Hybrids | Molecular Marker | Reference |
|---|-------------------------|------------------|------------------|
| <i>P. gibertii</i> ♀ and <i>P. gardneri</i> ♂ | <i>P.</i> 'Bella' | RAPD and SSR | Belo et al. 2018 |
| <i>P. gibertii</i> ♀ and <i>P. gardneri</i> ♂ | <i>P.</i> 'Gabriela' | RAPD and SSR | Belo et al. 2018 |
| <i>P. palmeri</i> var. <i>sublanceolata</i> ♀ vs. <i>P. foetida</i> var. <i>foetida</i> ♂ | <i>P.</i> 'Aninha' | RAPD | Santos 2008 |
| <i>P. palmeri</i> var. <i>sublanceolata</i> ♀ vs. <i>P. foetida</i> var. <i>foetida</i> ♂ | <i>P.</i> 'Priscila' | RAPD | Santos 2008 |
| <i>P. palmeri</i> var. <i>sublanceolata</i> ♀ vs. <i>P. foetida</i> var. <i>foetida</i> ♂ | <i>P.</i> 'Alva' | RAPD | Santos 2008 |
| <i>P. coccinea</i> ♀ vs. <i>P. hatschbachii</i> ♂ | HD25 | SSR | Souza 2018 |
| <i>P. vitifolia</i> ♀ vs. <i>P. hatschbachii</i> ♂ | HD26 | SSR | Souza 2017 |
| <i>P. vitifolia</i> ♀ vs. <i>P. hatschbachii</i> ♂ | HD27 | SSR | Souza 2017 |
| HD13 ♀ vs. <i>P. sublanceolata</i> ♂ and <i>P. sublanceolata</i> ♀ vs. HD13 ♂ | BC ₁ hybrids | ISSR e SSR | Melo et al. 2016 |

Large number of species constitutes an important factor in the genetic breeding of passifloras, since, the great genetic diversity is a potential source of genetic resource to be explored in obtaining great variety of ornamental cultivars (Viana et al. 2006). Plants with differentiated characteristics can be obtained through the crossing between species with

characteristics of interest, identified through analysis of genetic diversity. Molecular markers have been used satisfactorily for analysis of interspecific diversity among several species of *Passiflora* genus. In *P. morifolia* Mast., *P. suberosa* L., *P. micropetala* Mart., *P. foetida* var. *foetida*, *P. subblanceolata* and *P. coriacea* Juss. diversity analysis based on 15 RAPD primers generated the amplification of 134 polymorphic bands (Viana et al., 2010). According to Jaccard coefficient, the high diversity among *Passiflora* species allowed the assembly of a dendrogram in which species were classified into 5 distinct groups, generating results that support genetic breeding programs (Sousa et al. 2015). Unlike the results for ornamental *Passiflora* species, study of 21 commercial genotypes of yellow passion fruit (*P. edulis*) showed low genetic variability (Sousa et al. 2015). On the other hand, the comparison of these results with diversity data obtained for native *Passiflora* species (Viana et al. 2003) through RAPD markers allowed the observation of great diversity among species and their grouping in three distinct groups (Viana et al. al. 2003). For the species studied by Viana et al. (2010), grouping of species occurred in 6 distinct groups, with highest genetic distances observed between *P. coriacea* and *P. subblanceolata* (Viana et al. 2010), demonstrating the importance of these species in breeding programs.

SSR markers proved to be an efficient approach in the analysis of intraspecific diversity in the genus *Passiflora* and in the expansion of genetic breeding programs of passion fruit. Results obtained from genetic comparison of 29 accessions of *P. alata* from different locations showed that the individuals analyzed had a high degree of genetic variability, which allowed their grouping in 3 different groups, based on the SSR loci analyzed (Silva et al. 2014). This high genetic variability constitutes an essential characteristic for agronomic breeding of passion fruit, since this factor is important to promote breeding of passifloras with ornamental purpose, considering that important characteristics can be introduced in ornamental passiflowers through hybridization. In addition to identifying alleles that may confer agronomic and morphological characteristics of interest, analysis of genetic diversity in *Passiflora* has also provided important data related to the presence of resistance genes to biotic and abiotic factors, both within and among species (Paula et al. 2010; Pereira et al. 2013). RGAs (Disease Resistance Gene Analogs) makers showed high genetic diversity among 56 species of *Passiflora*, reinforcing the possibility of using these individuals in breeding programs to obtain resistant cultivars of *Passiflora* and in the introducing of these genes in plants from other genera (Oliveira 2017).

The use of molecular markers has been shown to be efficient in confirming interspecific hybridization of *Passiflora* and consequently in the success in the conduction of

plant breeding, since they provide faster and accurate information regarding inheritance when comparing to morphological evaluation, which require long observation periods and in some cases do not provide reliable information of hybridization. In addition, hybridization confirmation through the use of molecular markers is a less labor-intensive and low-cost technique when compared to the GISH technique. As regards, the information on the genetic diversity of species provided by the markers, assist in the development of a faster breeding program and help to reduce the time to obtain cultivars with desirable traits, especially for cultivars for ornamental purposes.

Comprehension of reproductive biology in *Passiflora*

Knowledge of reproductive biology of *Passiflora* species is fundamental for conducting any breeding program (Allard 1960), since pollen viability and stigma receptivity are determinant in fertilization and consequently in plant reproduction (Biondo and Battistin 2001). In addition to fertilization, pollen viability has a direct influence on genetic variability and on the formation of different allelic combinations (Souza et al. 2002), since higher is the number of viable pollen grains, greater is the probability of occurrence of differentiated allelic combinations (Biondo and Battistin 2001).

Stigma receptivity is directly related to fertilization and germination capacity of pollen tube, as well as in having success in the application of some techniques in laboratory, such as *in vitro* culture of pollen grains (Belo et al. 2015). This receptivity is quite variable from the species under study, and shows different values regarding *in vitro* germination of pollen grains for *Passiflora* species, as could be observed after *in vitro* germination of *P. sublancoolata* pollen grains. The percentage of pollen tube emission for this species was low (52.9%), when comparing to the values obtained for control experiment (*P. edulis* f. *flavicarpa*), which presented rates that reached almost 100% germination (Belo et al. 2015). These data corroborate with the results obtained for tests of *P. suberosa* *in vitro* germination (24,6%) (Cruz et al. 2008) and demonstrate that in both species *in vitro* culture presents as a laborious and low efficiency technique.

Pollen grain viability is not restricted solely to the occurrence of regular meiosis. In some species, germination capacity of pollen grain is directly influenced by abiotic factors that reduce its viability (Schifino and Dall 2002). In *P. sublancoolata*, it was observed that the maximum percentage of pollen germination for this species is related to collection period of pollen grain, with variations in germination ranging from 0 to 52%. *In vitro* germination of pollen grains collected at the early hours of the morning (7:00 a.m.) tends to reach very low

values. However, these values tend to increase until 10:00 a.m and fall again after this period (Belo et al. 2015), been necessary to observe the collection schedule to obtain satisfactory results for this species. Specific chemical dyes have been shown to be effective in pollen viability analysis. Using a solution of Alexander and fluorescein diacetate, it was verified that the viability of pollen in *P. sublancoolata* is very low, reaching values of 5 and 10%, respectively, for the two evaluated methods (Souza et al. 2004a).

Since it is a relatively simple and rapid test, the analysis of the viability of *Passiflora* pollen grains has been widely performed with alexander solution, which has been efficient in the analysis of several species of this genus. The analysis of 17 species of this genus based on the alexander solution, demonstrated satisfactory results for all species studied, since the coloration of pollen grains rate valeus higher than 90%, except for *P. pentagona* Mast, whose percentage was 78.22% (Souza et al. 2004a). However, this result is still considered satisfactory considering that it is a wild species.

In species of the genus *Passiflora*, pollen viability is the result of recombination events, which must occur regularly in meiosis. Changes in chromosome behavior during anaphase due to the abnormal behavior of spindle fibers may result in low pollen viability (Souza et al. 2003). Different strategies can be adopted by plants to increase their reproductive potential, as observed for *P. sublancoolata*. In this species, the discrepancy between the number of viable pollen grains and number of ovaries resulted in their reproductive adaptability with the adoption of facultative self-fertilization as a strategy to overcome the low pollen viability (Belo et al. 2015). In other species such as *P. edmundoi*, the occurrence of meiotic irregularities does not seem to have a negative effect on pollen viability (Souza et al. 2003).

Analysis of the development of pollen grains of *P. sublancoolata*, *P. foetida* var. *foetida* and 20 hybrids obtained from the cross between *P. sublancoolata* vs. *P. foetida* var. *foetida*, allowed to observe that variations in anther length have a direct influence on the developmental phases of male gametophytes (androsporogenesis), resulting in different meiotic stages in a single floral bud due to lack of synchronism during cell division, as well as in length of the anthers (Abreu et al. 2013). Based on the average values of anthers and flower buds, it was also observed that for both species, the stages of androgametogenesis are also differentiated (Abreu et al. 2013), however for other species such as *P. edulis* f. *flavicarpa* anther and floral bud length are not related to meiotic phase during microsporogenesis, but to microgametogenesis stages in which microspore and pollen grain are found (Souza et al. 2002).

Reproductive plasticity constituting an important adaptive strategy to ensure the survival and perpetuation of the species. For some species, cross-pollination is difficult due to the reproductive characteristics of species related to lack of compatibility and synchronism during flower opening, as observed for *P. coccinea* and *P. galbana* (Souza et al. 2004a), fact that may hamper the use of these species in breeding programs.

Fertilization rate is directly related to pollen viability at the moment of pollination, and its knowledge in breeding programs that aim hybridization among and between species is important (Souza et al. 2002). In addition to pollen grain viability, the knowledge of the opening moment of flower can also directly influence the pollination success (Souza et al. 2004b). In *P. mucronata* the flower opening was observed at the early hours of the morning, while in *P. galbana* this period lasted until following morning (Souza et al. 2004a); *P. edulis* flowers are more receptive in autumn than in summer and this receptivity is higher even before the occurrence of anthesis, with a tendency to decrease as the opening time of flower advances, with a considerable decrease 5 hours after its opening. However, although receptivity was lower in the summer, weight and length of the fruits formed, as well as the number of seeds per fruit was higher during this season. Larger and heavier fruits were obtained when pollination was conducted shortly after anthesis, between 12:00 and 1:00 p.m. (Souza et al. 2004b).

Higher germination rates at anthesis period between 7 and 9h were reported in the experiment conducted with *P. suberosa* L. pollen grain (Cruz et al. 2008). For *P. capsularis*, opening hours occur at the early hours of the morning, between 5:00 and 6:00; However, for *P. rubra* anthesis time is more prolonged, occurring between 5:30 and 7:30 am (Amorim et al. 2011), a period in which crosses for these species could present greater chances of success. This information about the time of anthesis and pollen viability support decision in breeding programs that aim to obtain progenies of these species.

The wide distribution of *Passiflora* species and its occurrence in areas with different climatic and environmental characteristics may have influenced the occurrence of species of this genus with differentiated reproductive characteristics, as a strategy for overcoming reproductive barriers. Chromosomal alterations occurring during evolutionary processes may lead difficulties in obtaining interspecific hybrids, since greater is the divergence between chromosomes of the species involved in the crossing, less is the recombination capacity between them. The difficulties of hybridization among different species of the genus *Passiflora*, beyond other factors, permeate the need to overcome challenges related to lack of synchronism in flowering, as reported Souza et al. (2004a) for *P. galbana* and *P. mucronata*.

However, growing knowledge about reproductive behavior of species can result in obtaining exotic hybrids, that can leverage their use in landscaping projects.

Potential use of *Passiflora* species and hybrids in breeding programs

Parallel to the discovery and description of new *Passiflora* species, many researches have focused on obtaining hybrids by performing intra and interspecific crosses (Souza 2017; Souza 2018; Sanchês 2018). In some cases the conduction of these techniques is linked to obtaining hybrids with differentiated characteristics to those of the parents. Induction of hybridization between plants of different species has been reported by several authors as a successful technique among several species of the genus *Passiflora*, however for some interspecific hybrids, their use in many cases presents difficulties related to incompatibilities of the species involved in the crossing (Meletti et al. 2005).

For some interspecific hybrids the possibility of survival is related to their ability to overcome reproductive barriers (Vanderplank and Zappi 2011). However, in some species of passifloras the obtaining of interspecific hybrids has been shown to be a more successful strategy than intraspecific hybridization *in vivo*. For *P. rubra* and *P. capsularis*, for example, comparison between the percentage of intra (46%) and interspecific (60%) fruiting for both species showed that interspecific crossing induced a higher fruit yield (Amorim et al. 2011). This high fruit formation index through interspecific hybridization may be associated to the great chromosome homology of species involved in the crossing due to its genetic proximity (Sanchês, 2018).

The formation of viable seeds has a direct relation with genetic compatibility and chromosomal behavior of species during meiosis (Singh 2003). The genetic proximity between species involved in the crossing is directly related to the degree of fertility of the hybrid and, consequently, its capacity for sexual reproduction (Rao and Rao 1984). The occurrence of chromosome homology between *P. subanceolata* and *P. foetida* var. *foetida*, allowed to obtain HD13 F₁ hybrid progeny named *P. 'Alva'*, *P. 'Priscilla'* and *P. 'Aninha'* that presented several different characteristics in relation to the parents, especially the parameters related to floral characteristics (Santos et al. 2012a). Of the crosses between *P. gardneri* vs. *P. alata*, *P. watsoniana* vs. *P. alata*, *P. watsoniana* vs. *P. gardneri* and *P. gardneri* vs. *P. gibertii* were obtained low number of seeds: 22, 37, 51, and 31, respectively (Conceição et al. 2011a). Genetic breeding involving interspecific crosses between *P. watsoniana*, *P. alata* and *P. gibertii* are not successful in obtaining hybrids, however, the induction of triple crossing involving *P. gardneri* may help to overcome this difficulty, since this species can facilitate the

crossing between different species (Conceição et al. 2011a). Part of the results obtained contrast with observed data for seeds formation from the crosses of *P. gibertii* vs. *P. kermesina* and *P. gibertii* vs. *P. alata*. For *P. caerulea* vs *P. edulis* f. *flavicarpa*, the amounts of seeds in the fruits were very low (Santos et al. 2012). With regard to the cross of *P. gardneri* vs. *P. cincinnata* all the seeds formed showed absence of endosperm (Conceição et al. 2011b), which may have been due to the lack of genetic compatibility among the species.

Induction of hybridization in ornamental passiflowers

Induction of backcross hybrids can be difficult by the incompatibility between the *Passiflora* species and the hybrids involved in crossing, resulting in the non-formation of fruits and seeds, as observed by Melo et al. (2016) in the backcrosses involving *P. sublancheolata* and the HD13 F₁ hybrids obtained by Santos et al. (2011) from the hybridization of *P. sublancheolata* vs. *P. foetida* var. *foetida*. Of 10 backcrosses conducted, there was no seed formation when HD13-102, HD13-104, HD13-107, HD13-115, HD13-125 and HD13-141 were used in both crossing paths (Melo et al. 2016). This result contrasts with the high seed formation values from the backcrosses between *P. sublancheolata* and the hybrids HD13-133 and HD13-141. From these crosses there were great fruits formation and expressive germination of the seeds generated, 68 and 83% respectively. Fruiting capacity and seed formation were also successful for crosses involving hybrids vs. hybrids. From HD13-133 vs. HD13-141 and HD13-141 vs. HD13-133 crosses, germination rates of 58 and 78% were observed respectively in both crosses (Conceição et al. 2011a). Demonstrating that these hybrids do not present self-incompatibility or pollen grains inviable due to the occurrence of irregular meiosis.

Success in conducting crosses between hybrids vs. hybrids of *Passiflora* is poorly reported, thus, the results observed by Conceição et al. (2011a) reinforce the potential still little studied of hybrids in the breeding of plants of the genus. Even Melo et al. (2016) not having succeeded in all backcrosses, the conduction of this technique involving HD13 (HD13-101, HD13-133, HD13-134 and HD143) and *P. sublancheolata*, in both crossing paths, gave rise to four distinct progenies HD17, HD18, HD19 and HD20, in which fruit indices ranging from 47.5 to 92.5% were observed. BC₁ plants obtained from the germination of backcross seeds originated flowers with shades of petals and sepals ranging from white, pink, violet and nuanced (white and pink), which were denominated: HD17-130, HD17-133, HD17-142, HD18-105, HD18-106, HD18-113, HD19-107, HD19-119, HD19-123, HD20-114, HD20-119 and HD20-128 (Melo et al. 2016). The occurrence of high variability in floral

characteristics is the result of distinct recombination from backcrossing (Melo et al. 2016). This result evidences the importance of conducting backcrosses as a way to favor the occurrence of recombination, to induce genes activation and the manifestation of phenotypic characteristics that may be silenced in the genotypes of the simple hybrids (F₁). In addition, the contrasting results observed by Melo et al. (2016) by conducting backcrosses involving HD13 hybrids originating from the same crossing (*P. subblanceolata* vs. *P. foetida* var. *foetida*) and *P. subblanceolata*, reinforce the need to adopt a significant sample number in backcrossing, aiming to confirm the ability to succeed in this type of crossing.

Morphological characteristics such as: flower size, variety of colors, intense coloring and foliage, are some of the most required characteristics for the market of ornamental plants. Morphoanatomic variety of passionflower species with ornamental potential makes it possible obtaining and registering a wide range of hybrids variety of this genus with peculiar characteristics that can gain space in the landscape segment. The cross between *P. gibertii* and *P. gardneri* allowed to be obtained F₁ hybrids, which were denominated HD15-101, HD15-104, HD15-106, HD15-107, HD15-108, HD15-109, HD15-110 and HD15-111, as well as the characterization and two new varieties, *P.* 'Bella' and *P.* 'Gabriela (Belo et al. 2018). The cross involving *P. coccinea* vs. *P. hatshibachii* allowed to obtain a hybrid progeny, denominated HD25, with 117 hybrids of varied morphological characteristics and with great potential for being used in the ornamental market. Presence of intermediate morphological characteristics from the parents was evidenced in most of obtained hybrids, however heterobeltiosis was also observed in individuals that presented characteristics superior to the parents. Despite the success in obtaining viable hybrids, there were absence of flowering in 10 individuals (HD25-122, HD25-135, HD25-136, HD25-139, HD25-142, HD25-143, HD25-197, HD25-197, 201, HD25-208, HD25-238) (Souza 2018), however this result does not reduce the importance and potential of these hybrids in breeding programs. The obtaining of some HD25 hybrids outstanding features allowed the designation of two new cultivars, *P.* 'Vivis' and *P.* 'Jhovi', which presented regularity in the meiosis and the possibility of being used in new crosses (Souza 2018). In contrast to these results, HD13 hybrids from the cross between *P. subblanceolata* and *P. foetida* var. *foetida* presented irregularities in meiosis related to selective chromosomal elimination originating from nuclear mechanisms present in the parents (Santos et al. 2012a).

P. hatshibachii has also been used as female and male parents in the cross involving *P. vitifolia*, being successful only in the cross where *P. vitifolia* was the female parent. The hybrids from this crossing were named HD26 and HD27. For the cross involving *P. vitifolia*

(access 481) vs. *P. hatschbachii* (access 446), the identification of progenies ranged from HD26-101 to HD26-159, on the other hand progênies from the crossing between *P. vitifolia* (access 481) vs. *P. hatschbachii* was designated HD27 and the individuals obtained from that crossing were denominated HD27-101, HD27-102, HD27-103, HD27-104, HD27-105, HD27-106, HD27-107 and HD27-108 (Souza 2017). All HD26 hybrids presented viable flowers and pollen grains (Souza 2017), which could be used for the introduction of a new variety in the ornamental plant market or to continue *Passiflora* genetic breeding program. The success in obtaining interspecific triple *Passiflora* hybrids was evidenced by using HD25 hybrids obtained by Souza (2018), which were used as female parent in the crosses involving *P. cincinnata*, *P. tholozanii* and *P. mucronata*. Triple hybrids from crosses: HD25 vs. *P. tholozanii*, HD25 vs. *P. cincinnata* and HD25 vs. *P. mucronata* were named HD28, HD29 and HD30, respectively. Flowering was observed in both HD29 and HD30, and these two cultivars were named *P. 'Vitalli'* (HD29) and *P. 'Leonel'* (HD30). Despite the success in obtaining triple hybrids having HD28 as maternal parent, they did not bloom, hampering the continuity of genetic breeding involving this hybrid (Sanchês 2018).

The growing of understanding of the chromosomal factors that govern success in obtaining *Passiflora* hybrids has enabled hybridization between species with distinct and potentially commercial characteristics. Interspecific hybridization involving *P. hatschbachii* in the cross with *P. coccinea* and *P. vitifolia* for obtaining HD25, HD26, and HD27 hybrids, demonstrate the importance and the unexplored potential of this species characteristics at desirable crosses. Furthermore, it highlights the importance of *P. hatschbachii* as a facilitator genotype for *Passiflora* backcrossing. In addition, the success in obtaining and blossoming the triple hybrids HD29 and HD30 reinforce the potential of genetic breeding in the potentialization of the ornamental plant market through the generation and introduction of several triple hybrids with peculiar characteristics able to catch the interest of consumer market.

Influence of luminosity on the morphological development of *Passiflora* hybrids and species

Light intensity has a direct effect on plants development (Canham et al. 1990), acting on morphological and physiological behavior (Frigeri 2007); these responses are variable and depends on light requirement adaptability and survival capacity of species to the environmental conditions according to their natural area of occurrence (Claussen 1996; Frigeri 2007). The knowledge of irradiance level is fundamental in indicating the best

environmental conditions to which a plant must be subjected in order to have "optimal" development indexes, since light is a limiting factor. However for some species this knowledge is still scarce, especially in relation to species occurring in the tropical regions (Frigeri 2007). Characteristics related to vegetative development such as: plant height, leaf length and width, number of internodes and flowering are highly influenced by solar irradiance and serve as efficient parameters in the evaluation of the best cultivation conditions (Dias-Filho 1997; Taiz and Zeiger 2013; Souza et al. 2018).

Form many *Passiflora* species of ornamental interest the knowledge about the influence of luminosity in the morphological behavior is scarce, difficulting cultivation (Pires et al. 2011). Despite the low number of studies related to the best level of shading for species of this genus, relevant results to elucidate the best cultivation conditions have been reported for species and hybrids. In *P. subrotunda*, high luminous intensity directly influences height and development of the aerial part, resulting in plants as main branch more developed and of greater diameter in function of high photosynthetic activity. Plants of this species cultivated in full sun and in conditions of low level of shading (25%) present a greater number of leaves in the branches (Souza et al. 2018). Increased foliage was also observed in hybrid HD13-133, originated from the cross between *P. subblanceolata* vs. *P. foetida* var. *foetida*, as luminosity index at which the hybrids were submitted also increased (Santos et al. 2012b). In *P. alata*, however, morphological development is optimized when plants are submitted to moderate shading conditions - between 25 and 50% (Freitas et al. 2012). Results partially similar to those were obtained for the HD13-133 and HD13-141 hybrids (*P. subblanceolata* vs. *P. foetida* var. *foetida*), which presented better growth when subjected to 25% shading (Santos et al. 2012b). Hybrids from this same crossing submitted to light incidence of only 25% showed more expanded leaves, probably due to the need to capture diffuse light. (Santos et al. 2012b).

In some species of plants, changes on radiation directly implies in vegetative development and survival capacity. However for some individuals, variation in light intensity can be tolerated by the function of anatomical plasticity of vegetative tissues (Aguilera et al. 2004). In many cases the condition of low solar radiation besides inducing foliar tissues expansion, reflects considerably on photosynthetic efficiency (Aguilera et al. 2004; Franco and Dillenburg 2007). The large number of species of *Passiflora* genus results in the incidence of species and hybrids with different light needs, as observed in the hybrids *P.* 'Aninha' and *P.* 'Priscilla'. Those in environments with 25 and 50% of light presented a better vegetative development. Both showed the ability to alter their leaf structures and adjust their photosynthetic apparatus according to light exposure to which they are submitted. Conditions

of high levels of shading induced in the hybrids the regulation of photosynthetic rate (Abreu et al. 2014). Inability to adapt to intense radiation conditions (full sun) may result in stress conditions and damage to photosystem I and II, as observed in *P. sublançeolata* (Pires et al. 2011). These results demonstrate that *P. 'Aninha'*, *P. 'Priscilla'* and *P. sublançeolata* present characteristics of species with high adaptability to low luminosity indexes, and can be used for interior decoration. However, unlike these species, *P. suberosa* presents high adaptability to different light indices and it can be used for ornamentation of both indoor or outdoor environments.

Different strategies can be adopted by plants in attempting to adapt to the environmental conditions to which they are submitted. In addition to adjusting photosynthetic apparatus (Abreu et al. 2014) some plants have the ability to develop thicker anatomical tissues to protect photosystem components and regulate water loss. *P. morifolia*, *P. sublançeolata* and *P. suberosa litoralis* cultivated under full sun presented palisade layer cells thicker than plants grown under shade conditions (Pires et al. 2011). This differentiation of the best developmental conditions may be a reflection of the adaptability of passion fruit to different environmental conditions, which occurs due to its wide geographic distribution and is a necessary knowledge to furthering the use of passifloras in the ornamentation of different environments.

Exposure to light promotes thickening or narrowing of the upper layer of leaf tissue (Milaneze- Gutierre 2003). Cells under direct light incidence tend to present a palisade layer with more elongated cells, while leaves under shade conditions show a narrow layer of cells (Kerbaui 2004), as observed by Pires et al. (2011) in *P. morifolia*, *P. suberosa litoralis* and *P. sublançeolata*. These adaptations in leaf structures are necessary to control the exit of water through the stomata, avoiding excessive loss of water (Kerbaui 2004). In addition, palisade parenchyma, foliar tissues such as abaxial and adaxial epidermis, lacunar parenchyma and mesophyll cells of *P. alata* are also found to present plasticity, which results into the thickening of these tissues (Freitas et al. 2012).

Photosynthetic changes, due to the light availability, result from respiratory regulation of the plants when under conditions of high levels of shading and promote changes in stomatal conductance as a function of the photosynthetic plasticity of plants (Abreu et al. 2014). In *P. suberosa litoralis*, in addition to the increase in stomatal conductance, the photosynthetic plasticity resulted into anatomical modifications and the increase of photosynthetic and respiratory rate, as it promotes the increase of the photosynthetic photon flux density (PPFD) when submitted to full sun condition (Pires et al. 2011). Confronting

these results with the values of stomatal conductance and transpiration for *Passiflora* hybrids, it was observed that not all plants respond similarly when submitted to high luminosity, since the increased light exposure promoted an increase in leaf temperature, but did not influence the increase of photosynthetic factors in hybrids. In addition to these characteristics, it was also observed that under high luminosity both hybrids tend to suffer a reduction on photosystem II activity as a result of the inefficiency of electron capture (Abreu et al. 2014). In *P. sublanceolata* there was the occurrence of photoinhibition when the plants were submitted to full sun condition, event that could compromise the integrity of chloroplasts and consequently the survival of the plants due to the high stress index in the photosynthetic apparatus (Pires et al. 2011).

Although light is a limiting factor in plant growth, it does not act isolated on its vegetative development (Marschner 1995; Gonçalves 2007; Taiz and Zeiger 2013). In *P. alata*, it was observed that the nitrogen (N) dosage initially supplied to the plants, parallel to the high luminosity index (75%), favors the increase of dry biomass due to the greater development of aerial part, resulting in plants with better vegetative development. However, increase in leaf aerial tends to reduce if the nitrogen dose supplied is greater than 122 mg N kg⁻¹ of soil (Freitas et al. 2012). The discovery of interaction between enlightenment and nutrients in *P. alata* serves as basis for a better understanding of the factors that influence photosynthetic efficiency (Malavolta et al. 1989) and subsidise the understanding of how nitrogen fertilization can contribute to vegetative development in other species of *Passiflora* genus to ensure correct cultivation and management of these species.

Different studies have demonstrated that light not only determines vegetative development but also significantly influences flowering and reproductive characteristics of passion fruit (Freitas et al. 2012, Santos et al. 2012b, Souza et al. 2018). In *P. subrotunda*, increase in flowering is directly influenced by the increase of light intensity in which the plants are submitted, being obtained greater flowering when the plants were kept in full sun or under 75% of light (Souza et al. 2018). F₁ hybrids from the cross between *P. sublanceolata* and *P. foetida* var. *foetida* also presented an increase in flowering as lightness increases (Santos et al. 2012b). These results reinforce the idea that the increasing luminosity level induces an increase in the amount of photoassimilates produced by the plants (Minotta and Pinzauti 1996), resulting in greater flowers emission in both hybrids and *P. subrotunda*. Parallel to the number of flowers, floral characteristics such as: diameter, petal length and width of sepal were also directly related to luminosity conditions, with larger flowers being observed in the more shaded environments (Souza et al. 2018).

In *Passiflora*, in addition to light, it was also observed that the type of pot used in the cultivation contributes to increase flowering, since the container influences water retention and soil moisture (Santos et al. 2012b; Souza et al. 2018). The expansion or restriction of the root system is directly related to the water availability to which the plant is subject, resulting in differentiated flowering between plants, as observed in *P. subrotunda*; the flowering in this species is favored by the lower water availability, since *P. subrotunda* cultivated in ceramic pots presents a greater intensity of flowering in detriment of the plants grown in a concrete pot, which have a water retention capacity for a longer period (Souza et al. 2018). Similar results were also obtained for hybrids originates from the crossing of *P. subblanceolata* vs. *P. foetida* var. *foetida*) when grown in ceramics pots. Plants grown in this type of vase presented greater flowering when submitted to 75% of luminosity. On the other hand, the cultivation in ceramic pots induced a greater initial vegetative development in the plants (Santos et al. 2012b). These results have extreme importance for the cultivation of these plants since for the segment of ornamental plants intense flowering is highly appreciated by consumers.

Ornamental plants, in general, are used for the decoration of environments with different conditions of shading and humidity. Thus, the knowledge of the luminous preference of each species or *Passiflora* hybrid allows the indication of the species suitable for each type of environment, facilitating both the cultivation and the management of these plants in landscape projects. In interspecific hybrids, the evaluation of the morphological characteristics, besides being an important tool to establish the phenotypic behavior of the plants when submitted to different cultivation conditions, also serves as a basis to provide predictions regarding the variability in the evaluated individuals, aiding in breeding programs (Santos et al. 2011).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank UESC, CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and CAPES (Coordination for Higher Level Personal Improvement) for the scholarship granted to the first authors;

REFERENCES

Abreu PP, Souza MM, Almeida A-AF, Lessa VF, Melo CAF (2013) Relationship between flower characteristics and androsporogenesis in wild species and interspecific hybrids of *Passiflora*. Braz J Bot 36:125-133. <http://dx.doi.org/10.1007/s40415-013-0018-1>

- Abreu PP, Souza MM, Almeida A-AF, Santos EA, Freitas, JCO, Figueiredo AL (2014) Photosynthetic responses of ornamental passion flower hybrids to varying light intensities. *Acta Physiol Plant* 36:1993-2004
- Abreu PP, Souza MM, Santos EA et al (2008) Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. *Euphytica* 166:307-315. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-008-9835-x>
- Aguilera DB, Ferreira FA, Cecon PR (2004) Crescimento de *Siegesbeckia orientalis* sob diferentes condições de luminosidade. *Planta Daninha*, 22:43-51.
- Allard RW (1960) Princípios do melhoramento genético de plantas. Blucher-USAID, São Paulo.
- Amorim JS, Souza MM, Viana AJC et al (2013) Cytogenetic, molecular and morphological characterization of *Passiflora capsularis* L. and *Passiflora rubra* L. *Plant Systematics And Evolution* 300:1147-1162. <http://dx.doi.org/10.1007/s00606-013-0952-1>
- Amorim JS, Souza MM, Viana AJC, Freitas JCO (2011) Self-, cross- and interspecific pollinations in *Passiflora capsularis* and *P. rubra*. *Revista Brasil. Bot.* 34:537-544. <http://dx.doi:10.1590/s0100-84042011000400007>
- Belo GO, Souza MM, Silva GS, Lavinsky MP (2018) Hybrids of *Passiflora P. gardneri* versus *P. gibertii*, confirmation of paternity, morphological and cytogenetic characterization. *Euphytica* 214. <http://dx.doi:10.1007/s10681-017-2021-2>
- Belo GO, Souza MM, Souza VO, Melo CAF (2015) Reproductive and cytogenetic characterization in *Passiflora sublanceolata*. *Biologia* 70:733-743. <http://dx.doi.org/10.1515/biolog-2015-0089>
- Bernacci LC, Cervi AC, Giovanni R, Borges RAX., Hering RLO, Serrano T, Santos Filho LA.F (2013) Passifloraceae in Martinelli G, Moraes MA. (Org). Livro vermelho da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 830 – 834.

Bernacci LC, Souza MM (2012) *Passiflora cacao* (Passifloraceae), a New Species from Southern Bahia, Brazil. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 22:1-7.

<http://dx.doi.org/10.3417/2010043>

Biondo E, Battistin A (2001) Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) G. Don e *Rhynchosia* Lour (Leguminosae-Faboideae), nativas na região Sul do Brasil. *Bioikos* 15:39–44.

Canham CD, Denslow JS, Platt WJ, Runkle JR, Spies TA, White PS (1990) Light regimes beneath closed canopies and tree-fall gaps in temperate and tropical forests. *Canadian Journal of Forest Research* 20: 620-631.

Cazé ALR, Kriedt RA, Beheregary LB, Bonatto SL, Freitas LB (2012) Isolation and characterization of microsatellite markers for *Passiflora contracta*. *International Journal of Molecular*, 13:11343-11348.

Cerqueira-Silva CBM, Santos ESL, Souza AM, Mori GM, Oliveira EJ, Correa RX, Souza AP (2012) Development and characterization of microsatellite markers for the wild South American *Passiflora cincinnata* (Passifloraceae). *American Journal of Botany*, 99: 170-172.

Cerqueira-Silva CBM, Santos ESL, Vieira JGP, Mori GM, Jesus ON, Corrêa RX, Souza AP (2014) New Microsatellite Markers for Wild and Commercial Species of *Passiflora* (Passifloraceae) and Cross-Amplification. *Applications in Plant Sciences* doi:10.3732/apps.1300061, 2014.

Claussen JW (1996) Acclimation abilities of three tropical rainforest seedlings to an increase in light intensity. *Forest Ecol. Management* 80:245-255.

Coelho MSE, Bortoletti KCA, Araújo FP, Melo NF (2016) Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrid and its parents. *Euphytica* 210:93-104.

Comércio FCE (2017) *AGRIANUAL: Anuário da Agricultura Brasileira*. São Paulo: FNP, Consultoria & Agroinformativos, 345-350.

Conceição LDHCS, Belo GO, Souza MM, Santos SF, Cerqueira-Silva CBM, Corrêa RX, (2011a) Confirmation of cross-fertilization using molecular markers in ornamental passion flower hybrids. *Genet Mol Res* 10:47-52.

Conceição LDHCS, Souza MM, Belo GO, Santos SF, Freitas JCO (2011b) Hybridization among wild passionflower species. *Rev Bras Bot* 34:237-240.

Cruz TV, Souza MM, Roza FA et al (2008) Germinação in vitro de grãos de pólen em *passiflora suberosa* L. para sua utilização em hibridação interespecífica. *Revista Brasileira de Fruticultura* 30:875-879.

Dias-Filho MB (1997) Physiological response of *Solanum crinitum* Lam. to contrasting light environments. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 32:789–796.

Fachinetto JM, Tedesco SB (2009) Número cromossômico, análise meiótica e estimativa da viabilidade polínica em populações de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11:110-116.

Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF, Peixoto JR (2008) Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados de pesquisa 2005-2008. *Embrapa, Cerrados* 57.

Franco AMS, Dillenburg LR (2007) Ajustes morfológicos e fisiológicos em plantas jovens de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em resposta ao sombreamento. *Hoehnea*, 34:135-144.

Freitas JCO, Almeida A-AF, Lago MF et al (2012) Características morfofisiológicas de plantas clonais de *Passiflora alata* crescidas em diferentes doses de nitrogênio e níveis de sombreamento. *Rev. Bras. Frutic.* 34:859-872.

Frigeri RBC (2007) Relação entre raiz e parte aérea de plântulas de espécies arbóreas tropicais sob diferentes níveis de radiação solar. Tesis, Universidade Estadual de Campinas.

Gonçalves CG (2007) Cultivo em Campo de *Coffea arabica* L. Cv. Obatã a pleno sol x sombreamento parcial: avaliações bioquímicas, fisiológicas e nutricionais. Tesis, Universidade de São Paulo, Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz.

Guerra M, Souza MJ (2002) Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. Funpec, São Paulo.

Hansen AK, Gilbert LE, Simpson BB, Downie SR, Cervi AC, Jansen RK (2006) Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. *Syst. Bot.* 31:138–150.

Huang S, Li R, Zhang Z (2009) The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. **Nat Genet.** 41:1275–1281.

Junqueira KP, Faleiro FG, Junqueira NTV, Bellon G, Ramos GD, Braga MF, Souza LS (2008) Confirmação de híbridos interespecíficos artificiais no gênero *Passiflora* por meio de marcadores RAPD. *Rev Bras Frutic* 30:191-196.

Kerbauy GB (2004) *Fisiologia Vegetal*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Kierzkowski D, Samardakiewicz S, Robakowski P (2007) Variation in ultrastructure of chloroplast in needles of silver fir (*Abies alba* Mill.) saplings growing under the canopies of diverse tree species. *Polish Journal of Ecology* 55:821–825.

Killip EP (1938) The American species of Passifloraceae, *Publ. Field Mus Nat Hist Bot Ser* 19:1–613

Larcher W (1986) *Ecofisiologia vegetal*. Editora Pedagógica e Universitária Ltda, São Paulo.

Lavinsky MP (2016) Análises meióticas em genitores e híbridos interespecíficos F₁ (progênie HD15) de *Passiflora* L. Dissertation, Universidade Estadual de Santa Cruz.

Litt M, Luty LA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44:398-401.

Marschner H (1995) Mineral Nutrition of higher plants. 2.ed. San Diego.

Melleti LMM, Soares-Scott MD, Bernacci LC, Passos IDS (2005) Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds) Maracujá germoplasma e melhoramento genético. Embrapa, Planaltina, 55-78.

Melo CAF (2014) Caracterização Morfológica, Citogenética e Confirmação Molecular de híbridos Interspecíficos Retrocruzados de *Passiflora* L. Thesis, Universidade Estadual de Santa Cruz.

Melo CAF, Martins MIG, Oliveira MBM, Benko-Iseppon AM, Carvalho R (2011) Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L. Plant Systematics and Evolution 293:227-235.

Melo CAF, Silva GS, Souza MM (2015a) Establishment of genomic *in situ* hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. Genet Mol Res 14:2176-2188.

Melo CAF, Souza MM, Abreu PP, Viana AJC (2014) Karyomorphology and GC-rich heterochromatin pattern in *Passiflora* (Passifloraceae) wild species from *Decaloba* and *Passiflora* subgenera. Flora 209:620-631.

Melo CAF, Souza MM, Silva GS (2017) Karyotype analysis by FISH and GISH techniques on artificial backcrossed interspecific hybrids involving *Passiflora sub lanceolata* (Killip) MacDougal (Passifloraceae). Euphytica 213:161.

Melo CAF, Souza MM, Sousa AGR, Viana AP, Santos EA (2015b) Multivariate analysis of backcross progeny of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for pre-breeding genotype selection. Genet Mol Res 14: 15376-15389.

Melo CAF, Souza MM, Viana AP, Santos EA, Souza VO, Corrêa RX (2016) Morphological characterization and genetic parameter estimation in backcrossed progenies of *Passiflora* L. for ornamental use. Sci Hortic 212:91–103.

Melo NF, Cervi AC, Guerra M (2001) Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Plant Syst. Evol.* 226:69–84.

Melo NF, Guerra M (2003) Variability of the 5S and rDNA sites in *Passiflora* L. with species with distinct base chromosome numbers. *Annals of Botany* 92:309–316.

Milaneze-Gutierrez MA, Mello JCP, Delaporte RH (2003) Efeito da intensidade luminosa sobre a morfo-anatomia foliar de *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae) e sua importância no controle de qualidade da droga vegetal. *Rev. Bras. Farm.*, 13: 23-33.

Minotta G, Pinzauti S (1996) Effects of light and soil fertility on growth, leaf chlorophyll content and nutrient use efficiency of beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings. *For. Ecol. Manag.*, 86:61- 71.

Oliveira EJ (2006) Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para a construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg). Thesis, Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Oliveira EJ, Padua JG, Zucchi MI, Camargo LEA, Fungaro MHP, Vieira MLC (2005) Development and characterization of microsatellite markers from the yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). *Mol Ecol Notes* 5:331-333.

Oliveira OLS (2017) Análises genéticas e citogenética em espécies de *Passiflora* L. existentes no Banco Ativo de Germoplasma (BAG-passifloras) da UESC. Dissertation, Universidade Estadual de Santa Cruz.

Pádua JG, Oliveira EJ, Zucchi MI, Oliveira GCX, Camargo LEA, Vieira MLC (2005) Isolation and characterization of microsatellite markers from the sweet passion fruit (*Passiflora alata* Curtis: Passifloraceae). *Molecular Ecology Notes*, 5: 863-865.

Paula MS, Fonseca MEN, Boiteux LS, Peixoto JR (2010) Caracterização genética de espécies de *Passiflora* por marcadores moleculares análogos a genes de resistência. *Rev Bras Fruticultura*, 32: 222-229.

- Peixoto M (2005) Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (eds) Maracujá germoplasma e melhoramento genético. Embrapa, Planaltina, pp 457-464.
- Pereira GS, Nunes ES, Laperuta LDC, Braga MF, Penha HA, Diniz AL et al (2013) Molecular polymorphism and linkage analysis in sweet passion fruit, an outcrossing species. *Ann Appl Biol.* 162:347-361.
- Pires MV, Almeida A-AF, Figueiredo AL, Gomes FP, Souza MM (2011) Photosynthetic characteristics of ornamental passion flowers grown under different light intensities. *Photosynthetica* 49:593-602.
- Rao SV, Rao BGS (1984) Studies on the crossability relationships of some Spinous solanums. *Theoretical and Applied Genetics* 67:419-426.
- Sanchês RCVS (2018) Análises citogenéticas em acessos de *Cucumis melo* l. e híbridos triplos de *Passiflora* L. Tesis, Universidade Estadual de Santa Cruz.
- Santos EA (2008). Melhoramento de Passifloras para Ornamentação Utilizando *Passiflora palmeri* var. *sublanceolata*, *Passiflora foetida* var. *foetida* e híbridos F₁ Ornamentais: Confirmação via RAPD, Parâmetros Genéticos e Efeitos do Sombreamento. Dissertation, Universidade Estadual de Santa Cruz.
- Santos EA, Souza MM, Abreu PP, Conceição LDCS, Araújo IS, Viana PA, Almeida A-AF, Freitas JCO (2012a) Confirmation and Characterization of interespecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. *Euphytica* 184:389-399.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10681-011-0607-7>.
- Santos EA, Souza MM, Viana PA, Almeida A-AF, Araújo IS, Freitas JCO (2012b) Development and bloom in hybrids of wild passion fruit cultivated in different types of pots and shading levels. *Sci Agric* 69:126-134.

Santos EA, Souza MM, Viana PA, Almeida A-AF, Freitas JCO, Lawinsky PR (2011) Multivariate analysis of morphological characteristics of two species of passion flower with ornamental potential and of hybrids between them. *Genetics and Molecular Research* 10:2457-2471.

Schifino, Maria Teresa Wittmann and Dall, Miguel Agnol (2002) Auto-incompatibilidade em plantas. *Ciência Rural* 32.6.

Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*, 9:615–29.

Silva GS (2017) Análises genômicas (GISH) e citogenômicas comparativas em espécies do gênero *Passiflora*. Tesis, Universidade Estadual de Santa Cruz.

Silva GS, Souza MM (2013) Genomic *in situ* hybridization in plants. *Genet Mol Res* 12:2953-2965.

Silva GS, Souza MM, Melo CAF, Urdampilleta JD, Forni-Martins ER (2018) Identification and Characterization of karyotype in *Passiflora* hybrids using FISH and GISH. *BMC Genetics* 19:19-26.

Silva MAA, Souza MM, Silva GS, Melo CAF, Corrêa RX, Araújo IS, Conceição LDHCS (2014) Analysis of transferability of microsatellite primers (SSR) in wild *Passiflora* species and intraspecific genetic diversity in *Passiflora alata*. *Genet Mol Res* 13: 5908-5918.

Singh RJ (2003) Genetic Control of Meiosis. In: *Plant Cytogenetics*. 2° ed. CRC Press LLC.
Snow N, MacDougal JM (1993) New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). *Syst. Bot.* 18:261–273.

Soares-Scott MD, Meletti LM, Bernacci LC, Passos IRS, Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF (2005) Citogenética clássica e molecular em passifloras. *Embrapa Cerrados* 213-240.

Souza AGR, Souza MM, Melo CAF, Sodr  GA (2015) ISSR markers in wild species of *Passiflora* L. (Passifloraceae) as a tool for taxon selection in ornamental breeding. *Genetics and Molecular Research* 14:18534-18545. <http://dx.doi.org/10.4238/2015.december.23.41>

Souza AC (2017) Caracteriza o morfológica, estimativa de parâmetros genéticos e análises de comportamento meiótico em híbridos interespecíficos F₁ de *Passiflora* L. Dissertation, Universidade Estadual de Santa Cruz.

Souza MM, Pereira TNS, Martins ER (2002) Microsporog nese e microgametog nese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro – amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deneger). *Ciência Agrotec* 26:1209-1217.

Souza MM, Pereira TNS, Viana AP et al. (2004b) Flower receptivity and fruit characteristics associated to time of pollination in the yellow passion fruit *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Passifloraceae). *Scientia Horticulturae* 101:373-385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2003.11.020>.

Souza MM, Pereira TNS, Viana AP, Silva LC, Sodré CP (2004a) Pollen viability and fertility in wild and cultivated *Passiflora* species (Passifloraceae). *Beitr. Biol. Pflanzen* 73:359-376.

Souza MM., Pereira TNS, Silva LC, Reis DSS, Sodré CP (2003) Karyotype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro. *Cytologia* 68:165-171.

Souza VO (2018). Análises morfológicas, genéticas e citogenéticas em híbridos interespecíficos de *Passiflora coccinea* e *P. hatschbachii*. Tesis, Universidade Estadual de Santa Cruz.

Souza VO, Souza MM, Almeida A-AF, Barroso JP (2018) Pre-breeding in *Passiflora subrotunda* Mast.: Morphological and Reproductive Characterization at Different Light Levels. *Hortscience* 53:949-957.

Stace CA, Bailey JP (1999) The value of genomic in situ hybridization (GISH) in plant taxonomic and evolutionary studies. **Systematics Association Special** 57:199-210.

Taiz L, Zeiger E (2013) *Fisiologia vegetal* 5^aed. Porto Alegre: Editora Artmed.

Ulmer T. & MacDougal J.M. (2004) *Passiflora – Passionflowers of the world*, Timber Press, Portland, pp 430.

Vanderplank J (2000) *Passion flowers*. The MIT Press, Cambridge.

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

Viana AJC, Souza MM (2012) Comparative cytogenetics between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensis*. *Plant Biology*, 14:820-827.

Viana AJC, Souza MM, Araújo IS, Corrêa RX, Ahnert D (2010) Genetic diversity in *Passiflora* species determined by morphological and molecular characteristics. *Biol Plantarum*, 54:535-538.

Viana, AP, Pereira TNS, Pereira MG et al (2003) Diversidade Genética entre Genótipos Comerciais de Maracujazeiro Amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) e entre Espécies de Passifloras Nativas Determinada por Marcadores RAPD1. *Bras. Frutic.* 25:489-493.

Vieira MLC, Barbosa LV, Mayeda LY (2004) Citogenética dos maracujazeiros. In: Lima AA, Cunha MAP. *Maracujá: Produção e Qualidade na Passicultura*. Embrapa Mandioca e Fruticultura, 47–65.

CAPÍTULO 2 Manuscrito em formato de artigo científico

DESCRIÇÃO DE HÍBRIDO F₁ DE *Passiflora* COM POTENCIAL ORNAMENTAL

Aline Pinto dos Santos¹, Margarete Magalhães Souza^{1*}, Gonçalo Santos Silva¹, Viviane de Oliveira Souza¹

¹Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Melhoramento de Plantas, Rod. Jorge Amado, Km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

* Autor correspondente (e-mail): souzomag@yaho.com.br (M.M. Souza); Phone/Fax.: +557336805055.

RESUMO

A hibridação interespecífica tem demonstrado ser uma técnica promissora na obtenção de cultivares de *Passiflora*, especialmente para aquelas com características peculiares de interesse ao mercado ornamental. No presente trabalho, híbridos interespecíficos F₁ obtidos de *P. vitifolia* vs. *P. hatschbachii* foram analisados. A confirmação de paternidade foi realizada utilizando marcadores ISSR. O DNA genômico das espécies genitoras e dos quatro supostos híbridos foi extraído e cinco *primers* ISSR foram testados. Os marcadores moleculares gerados pelos diferentes *primers* foram analisados quanto à presença ou ausência de bandas informativas para a confirmação da fecundação cruzada. O *primer* UBC811 amplificou bandas informativas espécie-específica, que segregaram nos híbridos, confirmando a hibridação. O híbrido com potencial ornamental HD26-102 denominado *P.* 'Lamepiana' foi confirmado via GISH, e demonstrou o seu caráter híbrido mediante a visualização de dois conjuntos cromossômicos distintos, um oriundo do genitor materno e outro oriundo do genitor paterno. O híbrido *P.* 'Lamepiana' foi descrito morfológica e reprodutivamente. Pétalas e sépalas de vermelho intenso e uma corona branca de vermelha são características marcantes nesse híbrido e podem servi para despertar o interesse popular pelo seu cultivo. A utilização de solução de Alexander para análise da viabilidade polínica demonstrou que *P.* 'Lamepiana' apresenta viabilidade polínica de até 78% nas primeiras horas de abertura da flor, constatando-se que o horário de coleta não afeta significativamente esse percentual. A comparação desse percentual com os valores obtidos para *P. vitifolia* (40%) demonstra que esse híbrido apresenta bom potencial reprodutivo. Testes com benzidina e peróxido de hidrogênio demonstraram que os estigmas de *P.* 'Lamepiana' e *P. vitifolia* permanecem viáveis durante a antese. A análise da viabilidade de *P.* 'Lamepiana' e sua comparação com o genitor materno, demonstrou que esse genótipo possui potencial reprodutivo. A descrição de *P.* 'Lamepiana' baseada em descritores morfológicos qualitativos e quantitativos e análises de características reprodutivas masculina e feminina mostrou que este híbrido tem potencial para ser introduzido no mercado de plantas ornamentais como uma nova cultivar.

Palavras chave: descritores morfológicos, GISH, hibridação, ISSR, maracujazeiros ornamentais, pólen e estigma.

ABSTRACT

Interspecific hybridization has been shown to be a promising technique for obtaining *Passiflora* cultivars, especially for those with characteristics peculiar to the ornamental market. In the present work, F1 interspecific hybrids obtained from *P. vitifolia* vs. *P. hatschbachii* were analyzed. Confirmation of paternity was performed using ISSR markers. The genomic DNA of the genitor species and the four alleged hybrids was extracted and five ISSR primers were tested. The molecular markers generated by the different primers were analyzed for the presence or absence of information bands to confirm cross-fertilization. The primer UBC811 amplified species-specific information bands, which secreted into the hybrids, confirming hybridization. The hybrid with ornamental potential HD26-102 named *P. 'Lamepiana'* was confirmed via GISH, and demonstrated its hybrid character through the visualization of two distinct chromosomal sets, one originating from the maternal parent and another from the paternal genitor. *P. 'Lamepiana'* hybrid was described morphologically and reproductively. Petals and sepals of deep red and a white crown of red are striking features in this hybrid and may serve to arouse popular interest in its cultivation. The use of Alexander solution for analysis of pollen viability showed that *P. 'Lamepiana'* presents pollen viability of up to 78% in the first hours of flower opening, showing that the collection schedule does not significantly affect this percentage. The comparison of this percentage with the values obtained for *P. vitifolia* (40%) shows that this hybrid has good reproductive potential. Tests with benzidine and hydrogen peroxide have shown that the stigmas of *P. 'Lamepiana'* and *P. vitifolia* remain viable during anthesis. Analysis of viability of *P. 'Lamepiana'* and its comparison with maternal genitor, showed that this genotype has reproductive potential. The description of *P. 'Lamepiana'* based on qualitative and quantitative morphological descriptors and analyzes of male and female reproductive traits showed that this hybrid has potential to be introduced into the ornamental plant market as a new cultivar.

Key words: GISH, hybridization, ISSR, morphological descriptors, ornamental passionflowers, pollen and stigma.

INTRODUÇÃO

A utilização de espécies de *Passiflora* para fins ornamentais iniciou na Europa do século XVII. Na ocasião, apenas espécies eram utilizadas para fins de decoração, sendo o primeiro híbrido oriundo do cruzamento *P. caerulea* L. vs. *P. racemosa* Brot., obtido 200 anos após o início da utilização de espécies para essa finalidade (VANDERPLANK et al., 2003; PEIXOTO, 2005). A partir da obtenção desse híbrido, denominado *P. violacea*, a indução da hibridação para obtenção de indivíduos de características marcantes, passou a ser um dos focos do melhoramento envolvendo essas espécies (PEIXOTO, 2005).

A família Passifloraceae está distribuída nas regiões tropicais, subtropicais, principalmente em países do continente africano e americano e nas regiões neotropicais, com destaque para o Brasil, é subdivida em 19 gêneros e engloba mais de 650 espécies (BERNACCI et al., 2013). Dentre os gêneros que compõem esta família, o gênero *Passiflora* é o que detém maior número de espécies, com mais de 525 espécies descritas (CERVI; IMIG, 2013).

Ao longo dos anos diversas espécies de *Passiflora* foram descobertas e descritas, especialmente no Brasil onde já foram registradas 137 espécies, sendo assim considerado um centro de diversidade desse gênero (BERNACCI et al., 2013). A distribuição das espécies descobertas no Brasil não é uniforme, uma vez que das 137 espécies descobertas no país, 32 são endêmicas do estado da Bahia, com grande ocorrência na região da Chapada Diamantina e em florestas atlânticas da região Sul do estado (NUNES; QUEIROZ, 2006).

Em função do aumento do número de pesquisas envolvendo passifloras, um grande número de espécies vêm sendo descobertas nos últimos anos, como por exemplo *P. pottiae* Cervi e Imig (CERVI; IMIG, 2013), *P. cacao* Bernacci e M. M. Souza (BERNACCI; SOUZA, 2012), *P. lorenziana* Mezzonato e Bernacci (MEZZONATO-PIRES et al., 2016), *P. gustaviana* Ocampo e Molinari (OCAMPO; MOLINARI, 2017); *P. intricata* J. MacDougal e J. Ochoa (MACDOUGAL et al., 2018a) e *P. kumandayi* M.A. Buitrago A. e Coca (MACDOUGAL et al., 2018b). O número de espécies tende a aumentar, pois muitos biomas, principalmente as florestas da América do Sul, são ainda pouco conhecidas.

As espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* possuem características peculiares, sendo a presença de uma corona filamentosa (característica mais marcante) e gavinhas as principais características botânicas descritas nessas espécies (BERNACCI et al., 2003). Dentre as características ornamentais, o formato e a coloração diferenciada de suas pétalas e sépalas, as quais são pentâmeras também constituem importantes atrativos (ABREU et al., 2009). Essas

características, atreladas à presença de uma folhagem frondosa, além da abundância e prolongamento do florescimento durante todo o ano para muitas espécies, também são parâmetros apreciados no mercado de plantas ornamentais (ABREU et al., 2009).

A ocorrência de flores de formatos e cores variadas tem despertado o interesse e a curiosidade sobre as peculiaridades que poderiam ser apresentadas em novos indivíduos caso hibridações entre essas espécies fossem induzidas. A partir dessa curiosidade, mais de 685 híbridos foram obtidos e registrados (VANDERPLANK et al., 2003; PEIXOTO, 2005; KING, 2007).

O Brasil tem se destacado na obtenção de híbridos interespecíficos e no registro de novas cultivares de *Passiflora*, como os híbridos *P.* ‘Alva’, *P.* ‘Aninha’, *P.* ‘Priscilla’ (SANTOS, et al., 2012), *P.* ‘Gabriela’ e *P.* ‘Bella’ (BELO et al., 2018), registrados na Sociedade Internacional de *Passiflora*, e os híbridos ornamentais BRS Roseflora (JUNQUEIRA et al., 2007), BRS Estrela do Cerrado (FALEIRO et al., 2007b) e BRS Rubiflora (FALEIRO et al. 2007a), já lançados no mercado de plantas ornamentais. Além dessas cultivares, híbridos triplos como *P.* ‘Vitalli’ e *P.* ‘Leonel’s’ (SANCHÊS, 2018) e híbridos retrocruzados também já foram obtidos (MELO et al., 2016). Na maioria das vezes a obtenção desses híbridos está relacionada a obtenção de plantas com características morfológicas peculiares e de coloração variada (SOUZA, 2017; BELO et al., 2018, SOUZA, 2018),

O objetivo desse trabalho foi confirmar a natureza da progênie híbrida F₁ HD26 utilizando marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) e verificar se houve a contribuição cromossômica igualitária dos genitores no híbrido ornamental *P.* ‘Lamepiana’ utilizando GISH (*Genomic in situ hybridization*), bem como descreve-lo quanto aos aspectos morfológicos e reprodutivos visando à produção de um novo híbrido ornamental.

MATERIAL E MÉTODOS

Germoplasma

Foram utilizados quatro híbridos F₁ da progênie HD26 (acessos 102, 104, 143 e 146) obtidos do cruzamento prévio entre *P. vitifolia* Kunth (acesso 481) e *P. hatschbachii* Cervi (acesso 446). As plantas foram mantidas em cultivo protegido no Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia (longitude 39 ° 10'W, latitude 14 ° 39'S, altitude 78m). As espécies foram mantidas sob condições de cultivo

protegidas, no sistema espaldeira, em casa de vegetação tipo semi-arco, com cobertura plástica de 100µm de espessura, ativada contra os raios UV.

Extração de DNA

O DNA genômico da progênie híbrida e de ambos genitores foi extraído de folhas jovens com base no protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990) com modificações (Melo et al. 2015). Amostras vegetais das seis plantas foram coletadas, armazenadas em tubos de eppendoff e mantidas em caixa de isopor contendo gelo até a realização da extração. As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e mantidas por 40 minutos em tampão de extração CTAB 2% [NaCl₂ (Sigma®); a 1,4 M; EDTA (USB) a 20 Mm; Tris-HCL (Sigma®) a 100 mM; B-Mercaptoetanol (Sigma®) 0,2%]. Solução de Clorofórmio (Merck) e álcool isoamílico (Merck) na concentração de 24:1 foi utilizado para isolamento dos ácidos nucléicos. O DNA foi resuspenso com tampão TE [Tris (Promega) a 10 mM; EDTA (USB) a 1 mM]. A quantificação do DNA genômico foi estimada por comparação com 100 ng/µL de DNA lambda (New England Biolabs) DNA em 1% de gel de agarose (Pronadisa) corado com SYBR safe (Invitrogen®).

Confirmação da hibridação via marcador ISSR

Foram testados cinco *primers* ISSR para a confirmação da hibridação (Tabela 1). Para a obtenção de amostras com um volume final de 20 µL, o preparo das reações de amplificação incluiu a adição de 10x buffer; MgCl (Vivantis®) 50 mM; dNTP (Amresco®) 10 mM; Primer 10 pmol; Taq DNA polimerase (Vivantis®) a 5u µL⁻¹ e 20 ng de DNA genômico. As amostras foram mantidas em termociclador (Eppendorf Mastercycle) por 2 horas e 30 minutos, programado de acordo com o as seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 52° C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e para a extensão final 7 minutos a 72 °C. Após a amplificação do DNA, 2 µL de azul de bromofenol foram adicionados em uma alíquota de 10 µL de DNA de cada amostra. Em seguida, as amostras de DNA foram transferidas para gel de agarose a 1% corado com SYBR e submetidas a cuba de eletroforese horizontal por 90 minutos. Transcorrido esse tempo o gel foi fotografado utilizando Locus L-PIX (Locus biotecnologia). e a presença de bandas segregantes nos híbridos, referentes aos genitores foram observadas. A determinação do tamanho das bandas utilizadas na confirmação foi realizada com o programa TotalLab TL120 (Nonlinear dynamics).

Tabela 1. Sequências de *primers* ISSR utilizados na confirmação da hibridação F₁ da progênie HD26 de *Passiflora*

| <i>Primer</i> | Sequência de oligonucleotídeos | T _m |
|---------------|--------------------------------|----------------|
| UBC807 | (5'AGAGAGAGAGAGAGAGT3') | 55,0 |
| UBC808 | (5'AGAGAGAGAGAGAGAGC3') | 56,0 |
| UBC810 | (5'GAGAGAGAGAGAGAGAT3') | 52,0 |
| UBC811 | (5'GAGAGAGAGAGAGAGAC3') | 52,0 |
| UBC812 | (5'GAGAGAGAGAGAGAGAA3') | 54,0 |

(**UBC**) Primers da Universidade de British Columbia.

(**T_m**) Temperatura de anelamento em °C

Preparação de lâminas para GISH

Pontas de raízes coletadas de estacas provenientes do híbrido HD26-102 foram lavadas com água destilada, secas em papel filtro e colocadas em frascos contendo 8HQ [8-hidroxiquinolina (Merck)] a 0,002M. O material permaneceu sob TA por 1 hora sendo posteriormente armazenadas na geladeira a $\pm 8 -10$ °C por mais 21 horas. Transcorridas 22 horas em 8HQ, as raízes foram lavadas com água destilada, fixadas em Carnoy (etanol e ácido acético glacial (Merck) [3:1], v/v; JOHANSEN, 1940) e mantidas em TA por 3 horas, sendo posteriormente armazenadas em freezer a -20°C até o uso.

No momento da preparação das lâminas, as raízes foram lavadas, sob agitação, 2 vezes em água destilada, secas com papel filtro e incubadas com 15 μ L de uma solução enzimática composta de 2% de celulase (Sigma®) e 20% pectinase (Sigma®) a 37 °C por 1 hora e 20 minutos. Após esse tempo as raízes foram novamente lavadas com água destilada e o meristema apical das raízes foi macerado em 6 μ L de ácido acético (Merck) 45% sob lupa e com o auxílio de agulhas de seringas. Após a maceração o material foi coberto com lamínula de 18 x 18 mm e o material citológico foi espalhado com o auxílio de uma agulha de ponta grossa. Utilizando-se duas folhas papel de filtro dobradas, a lamínula foi levemente pressionada com os dedos para o espalhamento dos cromossomos. A lâmina foi congelada em nitrogênio líquido por pelo menos 5 minutos, em seguida a lamínula foi removida com o auxílio de bisturi e a lâmina seca ao ar. Posteriormente, as lâminas foram observadas sob microscópio de luz. As que possuíam as melhores metáfases foram selecionadas e armazenadas a -20°C até a aplicação da GISH.

Preparação das sondas para GISH

DNA de ambos os genitores foi extraído seguindo os mesmos procedimentos realizados para obtenção das amostras necessárias para a confirmação via marcadores ISSR. Amostras de 20 µg de DNA genômico em um volume final de 200 µl foi clivada com sonicador (Qsonica – Q125) programado para 5 minutos com amplitude a 40% e pulsos alternados de 2 *seg on* e 2 *seg off* (JAUHAR; PETERSON, 2006). Finalizada a fragmentação, as amostras foram submetidas a eletroforese por 40 minutos sob uma corrente elétrica de 100 volts em gel de agarose a 1% para verificação do tamanho dos fragmentos obtidos. A comparação dos tamanhos dos fragmentos com um marcador de 100 pb demonstrou a predominância de bandas com 200 a 1000 pb

Antes da transformação em sondas, as amostras de DNA foram purificadas via precipitação através da adição 2% de acetato de sódio (Sigma) 3M e 200% do volume final de etanol. Em seguida as amostras foram armazenadas a -20°C *overnight* e no dia seguinte foram centrifugadas (Novatecnica 805 NT) por 10 minutos a uma velocidade de 14000 rpm, com posterior eliminação do sobrenatante e secagem do pelet em TA por no mínimo 1 hora. Após secagem adicionou-se água ultrapura para resuspensão do pelet. A transformação das amostras de DNA em sondas foi realizada através de *Nick translation* utilizando-se Digoxigenina-11-dUTP (Roche Diagnostics®) para marcação do DNA materno (*P. vitifolia*) e de Biotina-16-dUTP (Roche Diagnostics®) para marcação do DNA do genitor paterno (*P. hatschbachii*). A concentração final adotada foi a recomendada pelo fabricante, 1 µL do DNA fragmentado de cada genitor.

GISH

A GISH foi realizada com base no protocolo estabelecido para FISH por MELO et al. (2015). Lâminas pré-selecionadas do híbrido HD26-102 contendo boas metáfases foram colocadas em estufa a 37°C (Nova Etica, 403-5N) por no mínimo 1 hora. Em seguida foram aplicados 50 µL de RNase (Sigma®) a 1 µg/mL em tampão 2x SSC (cloreto de sódio a 0,3 M, Sigma®; citrato de sódio a 0,03 M, Sigma®) em cada lâmina, as quais em seguida foram incubadas por 1 hora em câmara úmida a 37 °C. Em seguida as lâminas foram imersas em 2x SSC em TA durante 5 minutos duas vezes; 50 µL de HCl a 10 mM foram adicionados sobre as metáfases por 5 minutos, e após a retirada do excesso, foram aplicados 50 µL de pepsina (Sigma®) [pepsina a 10 mg/mL; HCl a 10 mM (1:100 v/v)] e o material foi coberto com lamínula plástica. As lâminas foram incubadas a 37 °C em câmara úmida por 20 minutos. Após essa etapa as lâminas foram lavadas duas vezes com 2x SSC em TA por 5 min cada e

imersas em paraformaldeído (Sigma) a 4% em TA por 10 min, sendo posteriormente realizadas mais duas lavagens, de 5 min cada, com 2x SSC. A desidratação do material citológico foi realizada em etanol (Merck) 70% e 96% por 5 min. Antes da aplicação nas lâminas, a mistura de hibridação [formamida (Sigma) 100%, dextran (Sigma) 50%, 20xSSC, SDS (Biogens) 10% e sondas] foi aquecida a 75 °C por 10 min em termociclador (Eppendorf, Mastercycler) e transferida para gelo por no mínimo 5 min. Após a secagem das lâminas por 30 min em TA, foi aplicado em cada lâmina 15 µL da mistura de hibridação. O material foi coberto com lamínula de vidro de 18 x 18 mm e colocou-se as lâminas no termociclador (Techne TC-412), contendo um adaptador para lâminas, por 10 minutos para desnaturação dos cromossomos. Finalizada a desnaturação, as lâminas foram incubadas em câmara úmida e deixadas *overnight* à 37 °C.

Após a hibridação, as lâminas foram imersas em 2x SSC por 5 minutos a TA para remoção das lamínulas e transferidas para banho de Dubnoff (Quimis Q226M2) ajustado a 42 °C e imersas, duas vezes, em 2x SSC por 5 min cada, duas vezes em 0,1x SSC por 5 min cada, e duas vezes novamente em 2x SSC por 5 min cada. Finalmente, as lâminas foram mergulhadas em 4x SSC contendo 0,2% de Tween 20 (Sigma) em TA por 5 minutos. Finalizada as lavagens as lâminas foram tratadas com 50 µL de BSA (*Bovine Serum Albumin*) (Sigma) a 5% e cobertas por 10 minutos. Após os 10 minutos a lamínula plástica foi removida e o excesso de BSA 5% retirado. A detecção foi realizada aplicando em cada lâmina 20 µL da solução delectora (0,7 µL de avidina-FITC (Sigma); 0,7 µL de anti-digoxigenina-Rodamina (Sigma) e 17,6 µL de BSA 5%). O material foi coberto com lamínula plástica e incubado à 37 °C por 1 hora. Em seguida foram realizadas 3 lavagens em 4x SSC/0,2% Tween. E por último as lâminas foram passadas em 2x SSC e adicionado 15 µL de DAPI/Vectashield (Sigma), cobertas com lamínulas de vidro de 20 x 20 mm e armazenado entre 8-10 °C até a análise.

Descrição Morfológica

A descrição morfológica foi realizada no híbrido HD26-102 com base nas seguintes características quantitativas, de acordo com os descritores para *Passiflora* (MAPA, 2008; JESUS et al., 2015): diâmetro da flor (DF); diâmetro da corona (DCO); comprimento da primeira (TF1) e segunda (TF2) séries externas de filamentos da corona; comprimento da pétala (CP); largura da pétala (LP); comprimento da sépala (CS); largura da sépala (LS); comprimento do pedúnculo floral (PD); comprimento da bráctea (CBR); largura da bráctea (LBR); diâmetro do caule (DC); comprimento do entrenó (CEN); número de glândula no pecíolo (NGP); comprimento de folha (CF); largura de folha (LF); profundidade do sinus

(PSIN) e comprimento do androginóforo (CA). Para as características qualitativas os parâmetros analisados foram: coloração da pétala (COLPE); coloração da sépala (COLSE); coloração do primeiro filamento da coroa (COLPFC) e coloração do segundo filamento da coroa (COLSFC); coloração da folha (COLF) e formato de folha (FF). Os dados quantitativos foram tomados com auxílio de régua gradual e paquímetro digital e os dados qualitativos foram baseados na carta de Munsell (1977).

Caracterização reprodutiva

Viabilidade polínica

Para análise da viabilidade polínica, tanto o híbrido *P. 'Lamepiana'* quanto *P. vitifolia* (genitor materno) foram mantidos em condições de pleno sol. Nesse estudo, a falta de sincronismo do período de antese do genitor paterno (*P. hatschbachii*) com *P. vitifolia* e *P. 'Lamepiana'* impossibilitou a análise comparativa envolvendo esse genitor, uma vez que em *P. hatschbachii* a abertura da flor ocorre durante a madrugada o fechamento ocorre antes das 7h da manhã, em *P. vitifolia* esse evento tem início às 7h e as flores se apresentam completamente fechadas as 15h e em *P. 'Lamepiana'* a abertura da flor ocorre as 9h e fechamento as 13h da tarde. e *P. vitifolia*. A análise da viabilidade polínica foi realizada as 9h.

Visando avaliar a integridade da parede e do citoplasma, a análise de grãos de pólen do híbrido HD26-102 e do genitor *P. vitifolia* foi realizada através da coloração com solução de Alexander (ALEXANDER, 1969). Botões florais foram protegidos com saco de papel um dia antes da sua abertura. O pólen utilizado na análise as 9h. Após cada coleta, 15 µL da solução foram colocados sob uma lâmina de vidro e o pólen foi depositado sobre a solução e em seguida o material foi coberto com uma lamínula. Quatro lâminas do híbrido e do genitor foram analisadas. Foi realizada a contagem de 1.000 grãos de pólen por lâmina, sendo os grãos classificados em: viáveis, inviáveis (vazios, contraídos, microgrãos) ou grãos gigantes. Os grãos considerados viáveis apresentaram citoplasma íntegro e corado (citoplasma rosa), os quais foram classificados como Tipo 1 (T1) e Tipo 5 (T5). Os grãos de pólen inviáveis foram classificados como Tipo 2 (T2) com citoplasma de aparência granulada ou pulverizada, Tipo 3 (T3) com citoplasma não totalmente aderido à parede (contraídos), e Tipo 4 (T4) com tamanho muito reduzido (microgrãos).

Germinação in vitro do grão de pólen

A germinação *in vitro* dos grãos de pólen do híbrido HD26-102 e do genitor *P. vitifolia* foram realizados segundo o protocolo estabelecido por Bruckner et al. (2000) para

germinação de grãos de pólen de *Passiflora*, com algumas modificações. O preparo do meio se deu com a adição de 0.10 g L^{-1} ácido bórico (H_3BO_4) (EMSURE®, Merck); 0.3 g L^{-1} de nitrato de cálcio tetra hidratado ($\text{Ca} (\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); 0.1 g L^{-1} de nitrato de potássio (KNO_3) (EMSURE®, Merck); 0.2 g L^{-1} sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (EMSURE®, Merck) e 50 g L^{-1} de sacarose (EMSURE®, Merck), (EMSURE®, Merck). Após a preparação do meio, $20 \mu\text{L}$ da solução foram colocados sob uma lâmina de vidro, em seguida o pólen foi depositado e uma lamínula de $22 \times 22 \text{ mm}$ foi colocada sob o material. As lâminas foram mantidas em câmara úmida a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 4 horas antes de realizada a contagem. Foram considerados germinados os grãos de pólen que apresentaram tubo polínico maior que o diâmetro do grão.

Natureza do tecido de reserva do grão de pólen

A natureza do tecido de reserva dos grãos de pólen do híbrido HD26-102 e do genitor *P. vitifolia* foi determinada através da análise com reagente Lugol (JOHANSEN, 1940). Aproximadamente $15 \mu\text{L}$ da solução foi colocada em cada lâmina, sendo depositados sobre a mesma os grãos de pólen recém coletados, coberto com lamínula de $20 \times 20 \text{ mm}$ e deixado em repouso por 5 minutos antes da observação. A visualização foi realizada em microscópio de luz (Olympus CX4). Grãos de pólen que apresentaram coloração marrom ou marrom escuro foram considerados positivamente reativos quanto à presença de amido no tecido de reserva (SOUZA et al., 2004).

Receptividade do estigma

Para receptividade do estigma dois testes foram realizados no híbrido HD26-102 e no genitor *P. vitifolia*. O primeiro com peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich) 3% e o segundo com solução de benzidina (Sigma-Aldrich,) 1%. Estigmas de flores previamente protegidas foram coletados às 9h e colocadas em frascos de vidro de 6 ml contendo solução de peróxido de hidrogênio 3% para verificação da atividade de peroxidase (GALEN; PLOWRIGHT, 1987). Para confirmação da receptividade, foram observadas a formação de bolhas de ar na superfície do estigma. Para o teste com benzidina 1% a solução foi preparada diluindo-se a benzidina em etanol 60% e água destilada (DAFNI, 1992), em seguida a solução foi transferida para frascos de vidro e as anteras recém coletadas foram colocadas dentro da solução. Foram considerados positivamente reativos os estigmas que apresentaram enegrecimento completo.

RESULTADOS

Confirmação da hibridação via marcadores ISSR

Apenas o *primer* UBC811 permitiu a confirmação da hibridação interespecífica, sendo observados fragmentos espécie-específicos nos genitores que segregaram nos híbridos, conferindo o caráter heterozigoto. Uma banda com 672 pares de bases (pb) proveniente do genitor materno e duas bandas oriundas do genitor paterno, uma com 781 pb e outra com 1237 pb, permitiram a confirmação dos híbridos F₁ (Figura 1A).

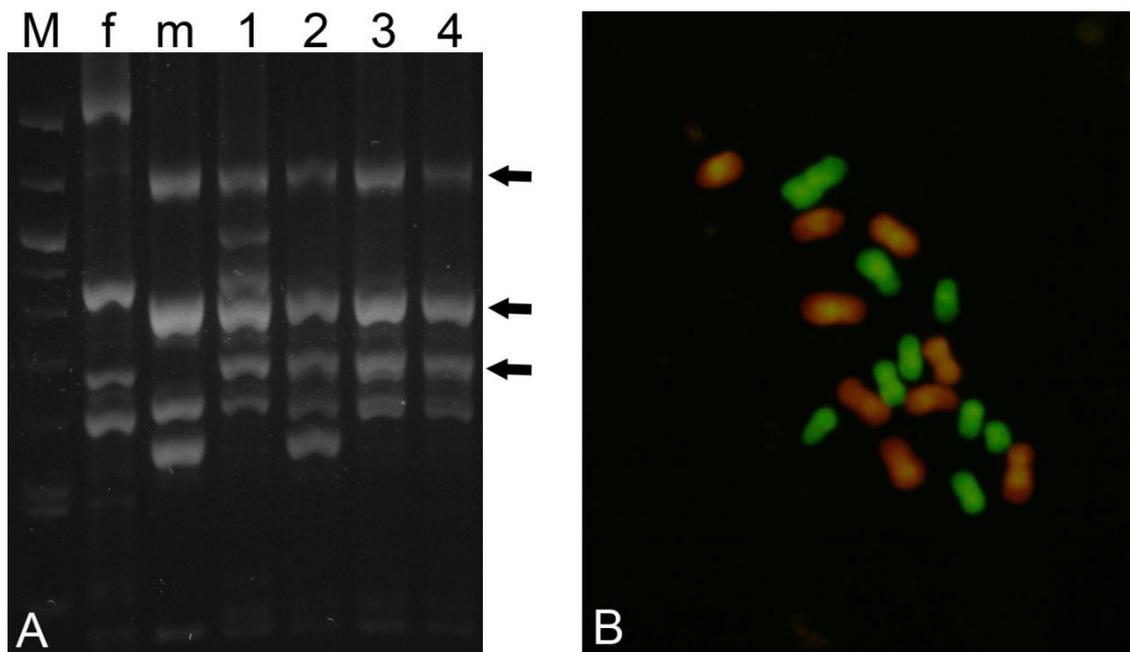


Figura 1. Confirmação de hibridação através de marcador ISSR e GISH em híbridos F₁ da progênie HD26 de *Passiflora*. (A) Produtos de amplificação gerados pelo *primer* ISSR UBC811 em genitores e híbridos de *Passiflora*; (M) marcador ladder de 100 pb; (f) *P. vitifolia* (genitor materno); (m) *P. hatschbachii* (genitor paterno); (1) Híbrido HD26-102; (2) Híbrido HD26-104; (3) Híbrido HD26-143; (4) Híbrido HD26-146. As setas indicam as bandas informativas utilizadas para a confirmação. (B) GISH em metáfase mitótica do híbrido HD26-102 ($2n = 18$).

Descrição morfológica

O cruzamento entre os genitores *P. vitifolia* vs. *P. hatschbachii* resultou na obtenção de mais de um híbrido. Entretanto, todos apresentaram características florais e vegetativas similares, sendo considerados como parte de um mesmo grupo. O híbrido HD26-102 apresentou características com potencial ornamental e maior intensidade florescimento que o destacou dos demais híbridos, sendo denominado *P.* 'Lamepiana'.

P. 'Lamepiana' - Apresenta caule cilíndrico variando entre 0,77 a 1,7 cm de diâmetro e entrenós que variam de 3,0 a 8,7 cm de comprimento. O formato foliar predominante é o trilobado, entretanto esse híbrido também apresenta folhas bilobadas e inteiras em alguns ramos (Figura 2). O comprimento foliar varia de 11,5 a 18,4 cm e sua coloração apresenta variações nos tons de verdes, podendo se apresentar mais escuros ou claros (4/6 5GY, 4/8 5GY e 5/8 5GY). Os sinus foliares podem apresentar-se profundos (7,0 cm) ou rasos (4,0 cm) e a base do pecíolo possui de 1 a 3 glândulas. Em condições de pleno sol o florescimento ocorre durante todo o ano, com período de maior intensidade entre os meses de abril a junho e de setembro a novembro. Semelhante na coloração ao genitor materno (*P. vitifolia*) (Figura 3A) e contrastando com o genitor paterno (Figura 3B) a flor de *P. 'Lamepiana'* é pentâmera e apresenta pétalas e sépalas em vermelho intenso, semelhantes tanto na coloração quanto no formato na face adaxial (Figura 3C) e coloração vermelha clara na face abaxial, nessa face as sépalas possuem ainda uma nervura central esverdeada que as diferenciam das pétalas (Figura 3D). As flores apresentam diâmetro que variaram de 9,0 a 10,6 cm, com pétalas de 4,1 a 4,8 cm e sépalas de 3,8 a 4,6 cm. A largura das pétalas varia de 0,8 a 1,0 cm, com valores semelhantes para as sépalas, 0,9 a 1,1 cm. O botão floral varia de 2,0 a 2,4 cm (Figura 3E). Os primeiros filamentos da coroa são estruturas alongadas que variam de 2,0 a 3,2 cm e apresentam base de coloração branca que se tornam rosadas a um terço do seu comprimento e que se intensificam na sua extremidade. O conjunto dessas estruturas conferem à flor a presença de uma coroa que varia de 4,0 a 7,0 cm. Diferente dos primeiros filamentos, as estruturas do segundo filamento apresentam tamanho reduzido, entre 0,3 e 0,6 cm e coloração predominantemente branca (Figura 3F). O pedúnculo floral apresenta comprimento entre 6,0 a 12,1 cm, no qual estão presas três brácteas que variam de 1,9 a 3,6 cm de comprimento e de 0,8 a 1,8 cm de largura. O androginóforo pode se apresentar de tamanho reduzido (0,8 cm) ou alongado (2,4 cm). Na estrutura reprodutiva masculina, o estilete tem a presença de antocianina, apresentando-se branco com manchas vermelhas, o estigma possui coloração verde clara, o filete caracteriza-se por ser verde com a ocorrência suave de antocianina na coloração vermelha na sua extremidade, o pólen apresenta coloração amarela intensa.

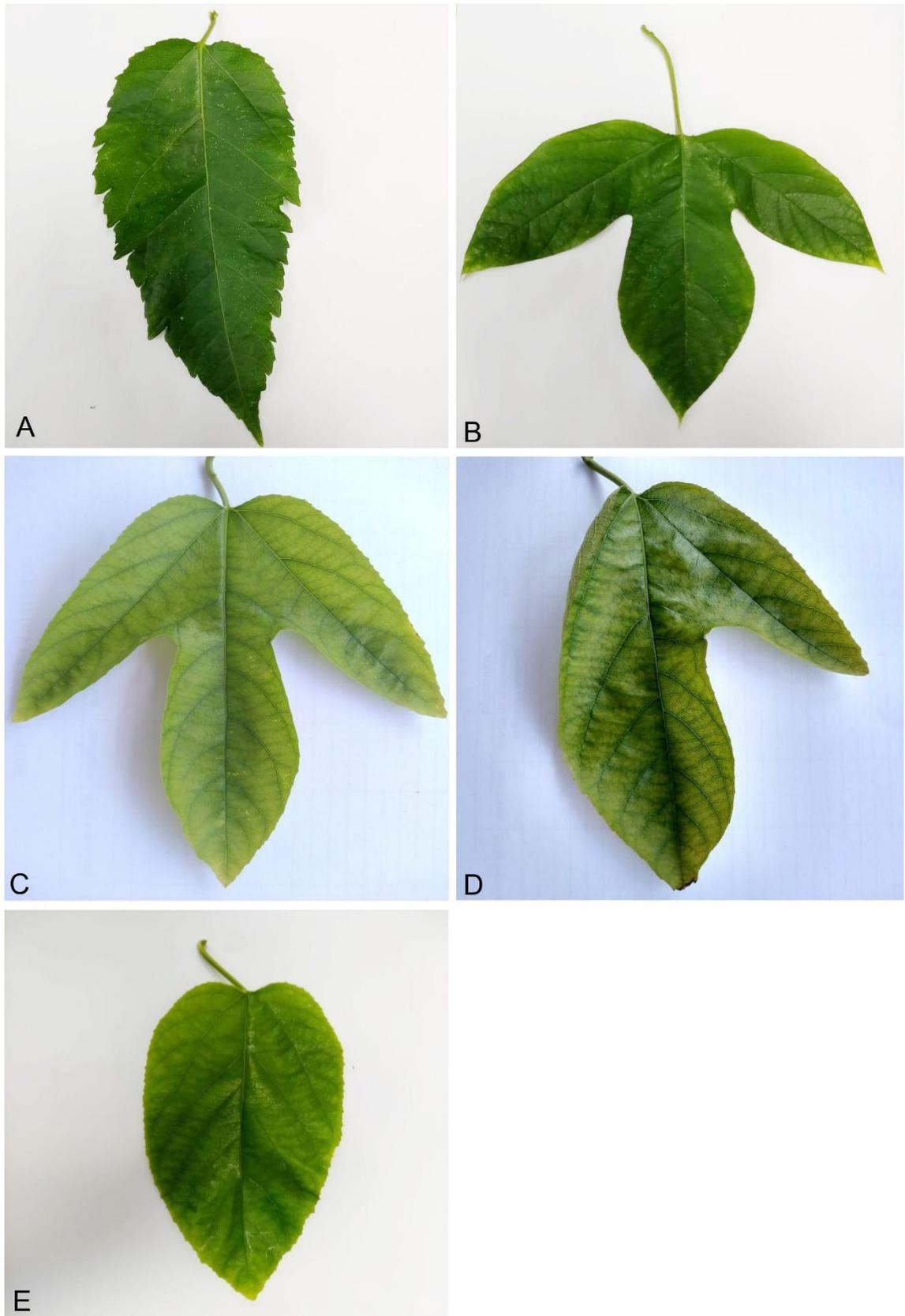


Figura 2. Morfologia foliar dos genitores e do híbrido *Passiflora* 'Lamepiana'. (A) Folha de *P. hatschbachii*; (B) folha de *P. vitifolia*; (C) folha trilobada de *P. 'Lamepiana'*; (D) folha bilobada de *P. 'Lamepiana'*, (E) folha inteira de *P. 'Lamepiana'*.

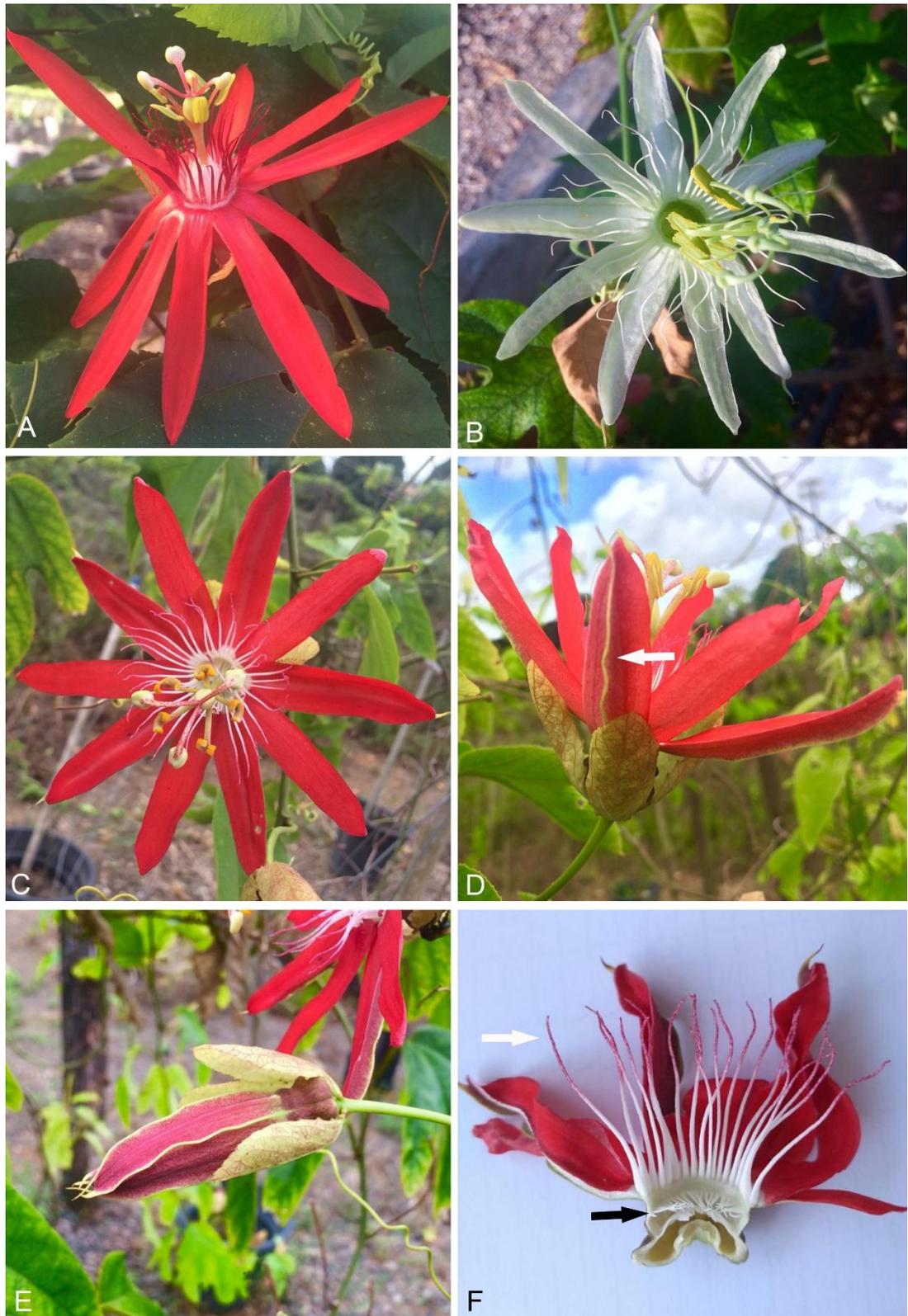


Figura 3. Características florais dos genitores e do híbrido *Passiflora* 'Lamepiana'. (A) *P. vitifolia*; (B) *P. hatschbachii*; (C) Detalhes das pétalas e das sépalas de *P.* 'Lamepiana'; (D) Face abaxial evidenciando a presença da nervura central esverdeada nas sépalas (seta) de *P.* 'Lamepiana'; (E) Botão floral de *P.* 'Lamepiana'; (F) Corte longitudinal evidenciando o primeiro filamento da coroa (seta branca) e o segundo filamento da coroa (seta preta) em *P.* 'Lamepiana'.

GISH

A GISH permitiu a visualização de 18 cromossomos ($2n = 18$) em *P. 'Lamepiana'*, sendo observados 9 cromossomos de origem materna (*P. vitifolia*), marcados de vermelho (Rodamina) e 9 cromossomos de origem paterna (*P. hatschbachii*), marcados de verde (FITC), confirmando a natureza híbrida de *P. 'Lamepiana'* (Figura 1B).

Viabilidade polínica

Foram observados grãos de pólen viáveis e inviáveis no genitor *P. vitifolia* e no híbrido *P. 'Lamepiana'* (Figura 4). Em *P. 'Lamepiana'* a porcentagem média de grãos de pólen viáveis (T1) às 9h foi 78%. Para *P. vitifolia* o valor obtido foi de 26% para o mesmo horário. Para o percentual de grãos de pólen inviáveis T2, um valor mais alto foi obtido para *P. vitifolia* que para *P. 'Lamepiana'*. A porcentagem de grãos de pólen T3 foi reduzida tanto no híbrido quanto na espécie. Para ambos os genótipos a porcentagem de grãos de pólen T4 não foi significativa. Por outro lado, o percentual de grãos de pólen T5 para *P. vitifolia* foi significativamente maior (31,65%) quando comparado com *P. 'Lamepiana'* (0,675%). A presença de grãos vazios foi bastante reduzida, não sendo realizada sua contagem (Tabela 2).

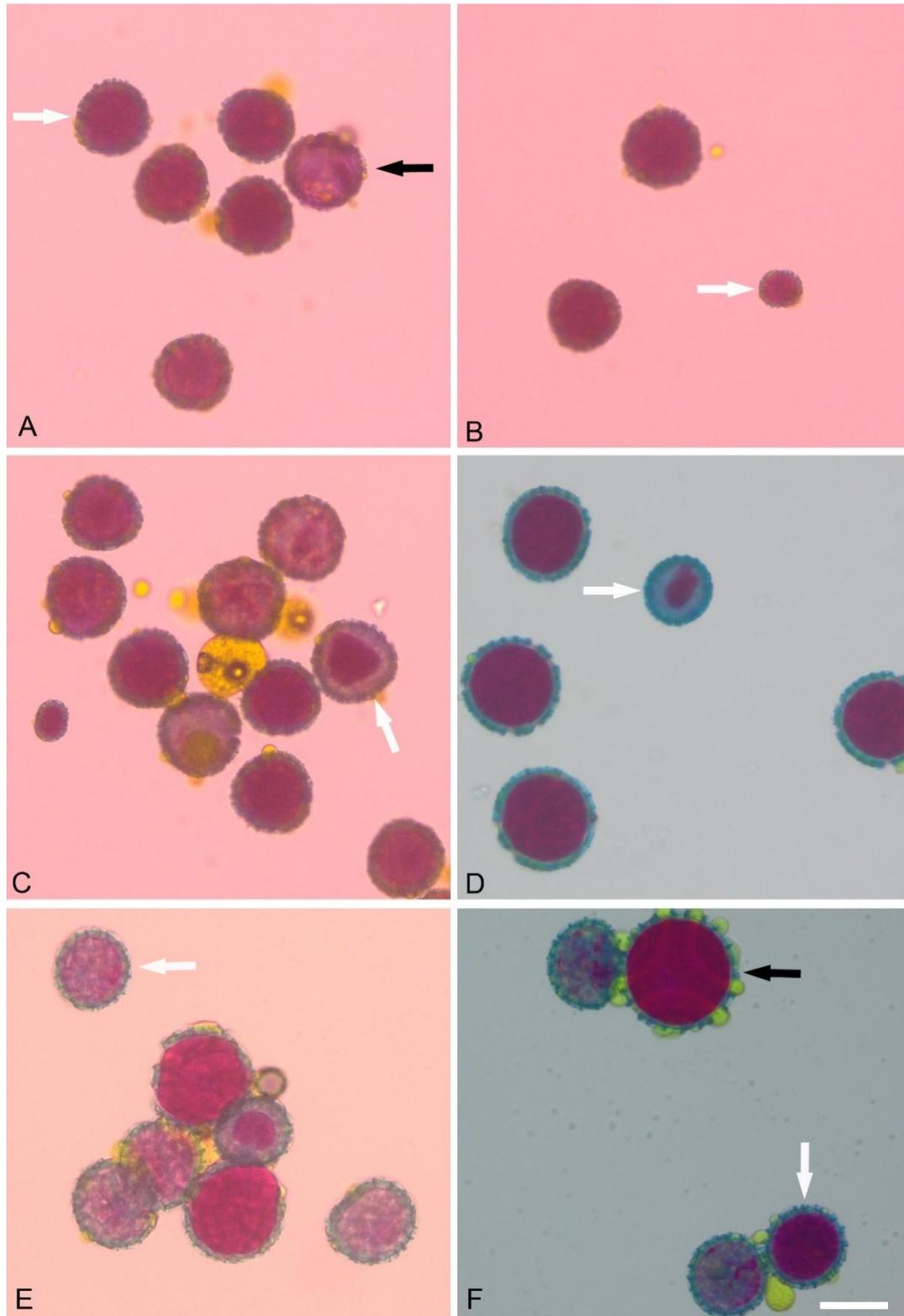


Figura 4. Grãos de pólen de *Passiflora vitifolia* e do híbrido *P.* 'Lamepiana' corados com solução de Alexander. (A) Grão de pólen viável de *P.* 'Lamepiana' apresentando reação positiva a Solução de Alexander (seta branca) e grão de pólen pulverizado (seta preta); (B) Grãos de pólen do tipo microgrão em *P.* 'Lamepiana'; (C) Grão de pólen do tipo contraído em *P.* 'Lamepiana' (seta); (D) Grão de pólen do tipo contraído em *P.* *vitifolia* (seta); (E) Grão de pólen pulverizado em *P.* *vitifolia* (seta); (F) Grão de pólen inviável do tipo gigante (seta sólida) e do tipo viável (seta branca) em *P.* *vitifolia*. Barra = 50 μ m.

Tabela 2. Valores de percentuais médios de grãos de pólen dos tipos T1, T2, T3, T4 e T5 em *Passiflora vitifolia* e no híbrido *P. 'Lamepiana'* corados com Solução de Alexander

| Média (%) dos tipos de grãos de pólen | | | | | |
|---------------------------------------|--------|--------|-------|-------|-------|
| Genótipo | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 |
| <i>P. 'Lamepiana'</i> | 77,775 | 15,05 | 5,95 | 0,55 | 0,675 |
| <i>P. vitifolia</i> | 26,35 | 31,125 | 9,725 | 1,075 | 31,65 |

(T1) grão de pólen viável; (T2) grão de pólen pulverizado; (T3) grão de pólen contraído; (T4) microgrão; (T5) grão de pólen gigante.

O teste de Tukey (Tabela 3) em função do genótipo demonstra que para a coloração com Solução de Alexander, a porcentagem de grãos de pólen T1 é significativamente maior para *P. 'Lamepiana'* quando comparado com *P. vitifolia*, contrastando com os resultados obtidos para os grãos de pólen inviáveis T2 uma vez que a ocorrência de grãos de pólen desse tipo foi significativamente menor em *P. 'Lamepiana'*. Para os grãos de pólen T3 e T5 a ocorrência de grãos de ambos os tipos foi maior para *P. vitifolia* quando comparado com *P. 'Lamepiana'*

Tabela 3. Teste Tukey para grão de pólen em *Passiflora vitifolia* e no híbrido *P. 'Lamepiana'* corados com Solução de Alexander.

| Teste Tukey dos tipos de grãos de pólen | | | | |
|---|----------|----------|----------|----------|
| Genótipo | T1 | T2 | T3 | T5 |
| <i>P. 'Lamepiana'</i> | 688.33 A | 197.17 B | 102.75 B | 6.58 B |
| <i>P. vitifolia</i> | 248.08 B | 357.42 A | 207.50 A | 182.00 A |

(T1) grão viável; (T2) grão pulverizado; (T3) grão contraído; (T5) grão gigante. Médias seguidas de letras diferentes diferem significativamente pelo teste Tukey em nível de 5% de significância.

Teste de germinação *in vitro* de grãos de pólen

Tanto *P. vitifolia* quanto *P. 'Lamepiana'* apresentaram germinação *in vitro* dos grãos de pólen (Figura 5) Entretanto, para ambos os genótipos a porcentagem de emissão do tubo polínico foi baixa. Para *P. vitifolia* a germinação ocorreu em 29,6% dos grãos de pólen, enquanto que para *P. 'Lamepiana'* a porcentagem observada foi ainda mais reduzida, 17,2%.

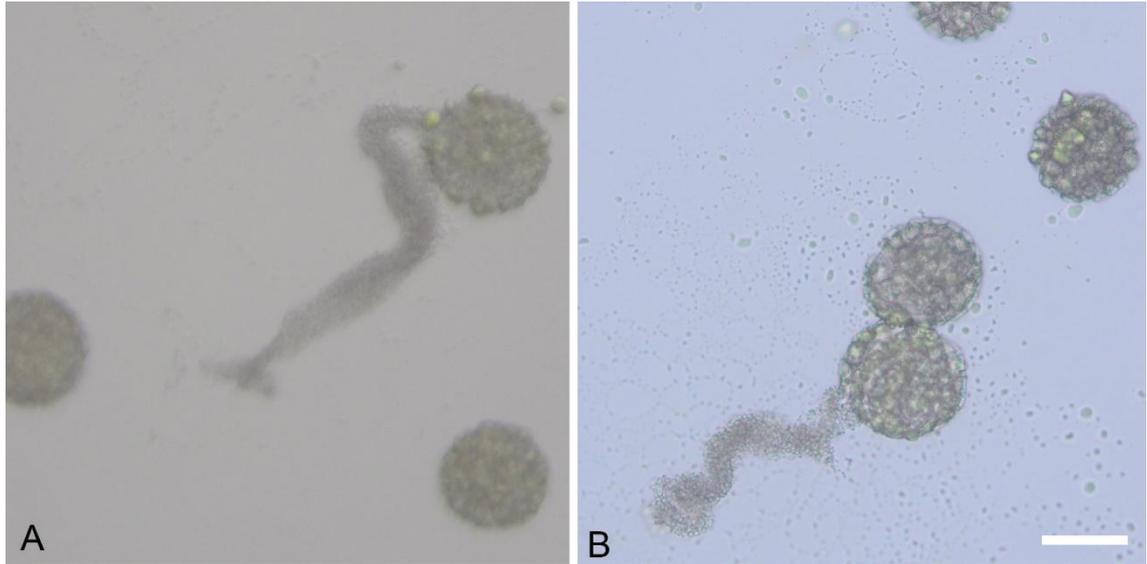


Figura 5. Germinação *in vitro* e emissão do tubo polínico em *Passiflora*. (A) Híbrido *P. 'Lamepiana'*; (B) *P. vitifolia*. Barra = 50 µm.

Tipo de tecido de reserva dos grãos de pólen de *P. 'Lamepiana'* e *P. vitifolia*

Os grãos de pólen de *P. 'Lamepiana'* e *P. vitifolia* coraram positivamente com Lugol e apresentaram coloração marrom, demonstrando assim a natureza amilácea do tecido de reserva de ambos os genótipos (Figura 6).

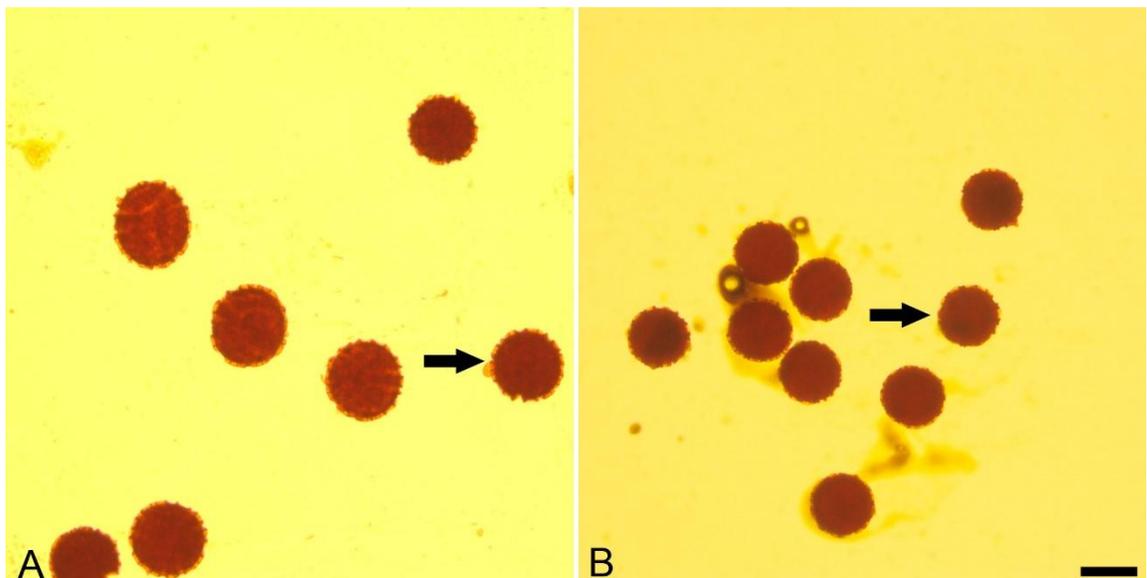


Figura 6. Teste com lugol em grãos de pólen em *Passiflora*: (A) grão de pólen amiláceo de *P. vitifolia* reativo ao Lugol; (B) grão de pólen do híbrido *P. 'Lamepiana'* mostrando reação positiva ao Lugol. Barra = 50 µm.

Receptividade do estigma

Tanto o teste com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% quanto o teste com benzidina revelaram que o estigma de *P. 'Lamepiana'* e *P. 'vitifolia'* são viáveis as 9h da manhã. Houve a imediata formação de bolhas de ar em volta do estigma de ambos os genótipos quando os mesmos foram imersos em H_2O_2 (Figura 7 A e B), confirmando a sua receptividade. No teste com benzidina essa receptividade também foi confirmada, uma vez que o contato do estigma com a solução promoveu o escurecimento gradual das estruturas e seu completo enegrecimento foi observado 25 minutos depois de imerso na substância (Figura 7 C e D).

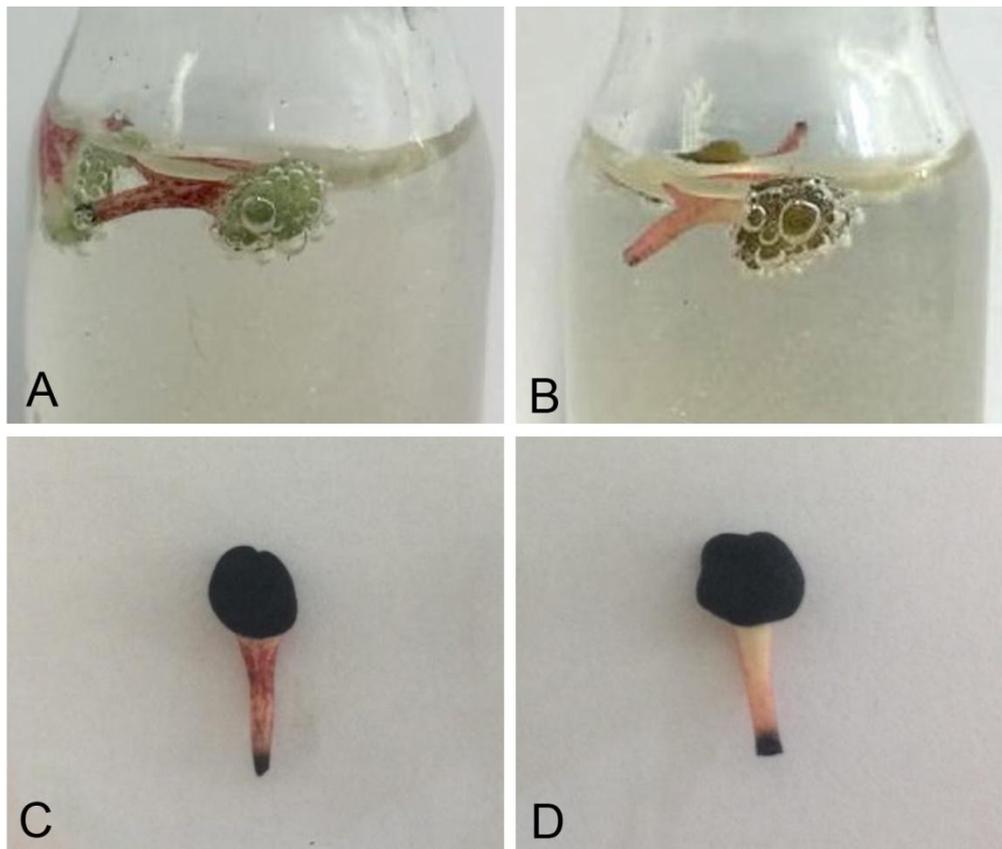


Figura 7. Teste de viabilidade do estigma de *Passiflora vitifolia* e do híbrido *P. 'Lamepiana'*. **(A)** Reação positiva do estigma de *P. 'Lamepiana'* ao peróxido de hidrogênio 3%; **(B)** Reação positiva do estigma de *P. vitifolia* ao peróxido de hidrogênio 3%; **(C)** Estigma de *P. 'Lamepiana'* apresentando reação positiva (enegrecimento) a benzidina; **(D)** Estigma de *P. vitifolia* apresentando reação positiva (enegrecimento) a benzidina.

DISCUSSÃO

Confirmação da hibridação via marcadores ISSR e GISH

Em híbridos interespecíficos, a amplificação de uma única banda espécie-específica referente a cada genitor já representa resultado satisfatório, assim como observado para

marcadores do tipo RAPD e SSR na confirmação de híbridos ornamentais oriundos do cruzamento *P. gardneri* Mast. vs. *P. gibertii* NE Brown (CONCEIÇÃO et al., 2011), *P. sublaceolata* Killip vs. *P. foetida* L. (SANTOS et al., 2012) e *P. gardneri* vs. *P. gibertii* (BELO et al., 2018). Híbridos de *Paspalum* spp. também foram confirmados mediante a utilização desse marcador (ARAKAKI et al., 2017). Além disso, marcadores moleculares ISSR também têm se mostrado eficientes na confirmação de retrocruzamentos envolvendo passifloras (MELO et al., 2016). Marcadores moleculares também possuem a vantagem de serem de baixo custo e de possibilitar alta reprodutibilidade. Além disso geram um grande número de informações de forma rápida referentes a marcadores multilocus tanto em espécies conhecidas, quanto em espécies pouco conhecidas (ZIETKIEWICZ et al., 1994; BARTH et al., 2002; BORNET; BRANCHARD, 2011),

A confirmação da hibridação cruzada via GISH tem se mostrado uma abordagem molecular eficiente (SILVA; SOUZA, 2013) quando utilizado sonda e DNA de bloqueio. Para a confirmação da hibridação de *P. 'Lamepiana'* a aplicação da técnica envolvendo o uso simultâneo de duas sondas, resultou na distinção de 9 cromossomos corados de vermelho herdados de *P. vitifolia* e de 9 cromossomos corados de verde referentes a *P. hatschbachii*. Entretanto, uma melhor diferenciação dos conjuntos cromossômicos só foi possível mediante o aumento da concentração da sonda referente ao genitor paterno (*P. hatschbachii*). Ajustes semelhantes utilizando-se sonda-bloqueio também são necessários para uma melhor distinção dos diferentes conjuntos cromossômicos (SILVA et al., 2018).

Um número cada vez maior de híbridos de *Passiflora* tem sido confirmado com a GISH, como por exemplo, os híbridos oriundos do cruzamento *P. edulis* Sims vs. *P. cincinnata* Mast. (COELHO et al., 2016) e do cruzamento envolvendo *P. gardneri* vs. *P. gibertii* (SILVA et al., 2018). Além de híbridos simples, a confirmação de híbridos retrocruzados também tem sido relatada com o uso da GISH (MELO et al., 2016).

Descrição morfológica

A partir das características florais marcantes, como a coloração das pétalas e sépalas de vermelho intenso, e do potencial de grande aceitação no mercado de plantas ornamentais, o híbrido *P. 'Lamepiana'* se apresenta com um genótipo promissor para composição de jardins. Florescimento intenso e contínuo também constituem características importantes no segmento paisagístico e contribuem para a aceitação popular dessa possível cultivar de *Passiflora* ornamental. Assim como *P. 'Lamepiana'*, diversos híbridos de *Passiflora* com potencial de aceitação no mercado de plantas ornamentais têm sido obtidos através da hibridação, como

por exemplo os híbridos *P.* ‘aninha’, *P.* ‘Priscilla’ e *P.* ‘alva’, os quais apresentaram uma grande variedade de formato e tamanho diferenciados de flores que variaram em tons de branco e rosa na tonalidade das pétalas e sépalas (SANTOS et al., 2012).

Cores diferenciadas e formatos florais exóticos são atrativos importantes para despertar o interesse do mercado por plantas ornamentais. Na busca por plantas com características incomuns, essas variações tendem a aumentar a apreciação e o interesse pelo cultivo de determinadas variedades que podem ser obtidas através da hibridação. Hibridações bem-sucedidas com a geração de plantas de coloração intensa como os híbridos *P.* ‘Gabriela’ e *P.* ‘Bella’ oriundos do cruzamento *P. gardneri* vs. *P. gibertii* (BELO et al., 2018) demonstram o potencial ainda pouco explorado da hibridação interespecífica como forma de gerar indivíduos com características recombinantes oriundas dos seus genitores.

A ocorrência de folhas com diferentes formatos em *P.* ‘Lamepiana’ resulta da variabilidade genética nesse híbrido oriunda da combinação alélica entre os diferentes genitores, sendo esta uma característica de grande importância no melhoramento genético. Híbridos HD25 oriundos do cruzamento *P. coccinea* vs. *P. hatschbachii* também apresentaram dimorfismo foliar (SOUZA, 2018).

Para registro de novas cultivares, a descrição morfológica é uma etapa crucial, uma vez que resulta na seleção e descrição dos melhores genótipos tanto para lançamento no mercado quanto utilização na continuidade de programas de melhoramento genético (RADMANN; OLIVEIRA, 2003). No mercado de plantas ornamentais, diversos híbridos de *Passiflora* com características morfológicas marcantes têm sido obtidos (FALEIRO et al., 2007a, JUNQUEIRA et al., 2007, SANTOS et al., 2012; BELO et al., 2018). Atrativos como flores de coloração intensa e uma corona bicolor como apresentada pelos híbridos *P.* ‘Jhovis’, *P.* ‘Vivis’ (SOUZA, 2018) e *P.* ‘Lamepiana’ podem despertar o interesse da população pelo cultivo dessas plantas. Além disso, a ocorrência em *P.* ‘Lamepiana’ de mais de um pico de florescimento durante o ano e a exibição de uma folhagem frondosa também pode servir para promover a sua utilização na composição de jardins e pérgolas. Outros híbridos como *P.* ‘Gabriela’ e *P.* ‘Aninha’ também apresentaram essa mesma característica (BELO et al., 2018).

Caracterização reprodutiva

A obtenção de híbridos viáveis é um importante fator em programas de melhoramento genético, sendo a compatibilidade genética um pré-requisito fundamental na hibridação entre diferentes espécies (BRUCKNER et al., 1995). A obtenção de híbridos férteis e que

apresentem grãos de pólen viáveis permite a transmissão de caracteres herdáveis às gerações futuras, possibilitando avanços no melhoramento genético e na obtenção de novas cultivares (BRITO, 2010). Entretanto, o cruzamento entre diferentes espécies pode resultar na geração de híbridos interespecíficos que apresentam grãos de pólen inviáveis ou baixa viabilidade polínica, em função das irregularidades meiótica, que ocorrem devido à falta de homeologia cromossômica (LOPES, 2006).

Problemas relacionados à biologia reprodutiva, como a baixa viabilidade do pólen e a macho esterilidade podem surgir como consequência de irregularidades na meiose dos híbridos oriundos da hibridação entre diferentes espécies (OLIVEIRA; RUGGIERO, 1998; LAVINSCKY, 2016), uma vez que o grão de pólen viável é resultado de um processo meiótico regular. Em *P. 'Lamepiana'* a observação da viabilidade do pólen via coloração com solução de Alexander chegou a 77% quando a coleta do pólen foi realizada logo após a antese. Esse valor contrasta com o percentual obtido para germinação *in vitro* do grão de pólen, uma vez que o híbrido apresentou apenas 17,2% de emissão do tubo polínico. O baixo percentual de emissão de tubo polínico pode ter ocorrido em função natureza híbrida da planta ou da composição do meio de cultura ao qual os grãos foram submetidos. Testes de germinação de grãos de pólen *in vitro*, conduzido com 16 espécies de *Passiflora* demonstraram um percentual de germinação abaixo de 50% para a maioria dos genótipos estudados (9 espécies) (MORERA et al., 2018).

Viabilidade acima de 70% é um valor considerado satisfatório em *Passiflora* (SOUZA et al., 2002) e indica a ocorrência de meiose regular nas plantas (DEFANI-SCOARIZE et al., 1996). Comparando-se o percentual de viabilidade do pólen do híbrido *P. 'Lamepiana'* com o percentual apresentado com o genitor materno (*P. vitifolia*), observou-se que a espécie apresentou percentual bastante reduzido (menor que 40%) de grãos de pólen. Esses resultados contrastam com os resultados obtidos por Souza (2017) para a mesma espécie (69,08%). Variações nos percentuais de viabilidade não são raros em algumas espécies e podem ter relação direta com a variação de umidade e temperatura diárias (FRANZON et al., 2005).

Assim como observado em *P. vitifolia*, *P. edulis* também apresentou percentual reduzido para geminação *in vitro* (32,92%) (SOARES et al., 2013). Uma anáfase não sincronizada pode resultar na ocorrência de grãos pólen inviáveis em função do desbalanço no número cromossômico (SOUZA et al., 2002; DAMASCENO JUNIOR et al., 2010). Para germinação *in vitro* do pólen de *P. vitifolia*, o percentual atingido também foi baixo (29,6%), assim como demonstrado por Souza (2017).

. Diferenças no percentual de germinação podem ocorrer em função da diversidade genética ou em função das características e da composição do meio de cultura (SOARES et al., 2013). Para algumas espécies, o meio de cultura sólido favorece a germinação (CHAGAS et al., 2007), uma vez que os meios sólidos favorecem a manutenção da umidade relativa, do nível de oxigenação do meio e a incorporação de açúcar (STANLEY; LINSKENS, 1974). Por outro lado, alguns ensaios apontam que por não apresentarem resistência física, os meios líquidos são ideais para o desenvolvimento do tubo polínico (LUZA; POLITO, 1985).

A ocorrência de grãos de pólen pulverizados (T2) também foi contrastante para ambos os genótipos, sendo no geral duas vezes maior em *P. vitifolia* que no híbrido *P. 'Lamepiana'*, fato que pode ser resultado da formação de grãos de pólen anucleados como consequência de meioses irregulares (TWELL, 1995), ou por fatores bióticos e abióticos que atuam após a formação do grão de pólen (ABREU, 2008). Uma porcentagem considerável de grãos de pólen pulverizados (15,95%) também foi observada em *P. palmeri* var. *sublanceolata* (ABREU, 2008).

Em *P. gardneri* e *P. gibertii* a ocorrência de grãos pulverizados não foi observada, entretanto, híbridos oriundos do cruzamento entre essas duas espécies apresentaram ocorrência de até 42,3% desse tipo de grão (LAVINSKY, 2017). Para grãos de pólen contraídos (T3), tanto *P. 'Lamepiana'* quanto *P. vitifolia* apresentaram percentuais crescentes em função do avanço no horário de coleta. A formação de grãos de pólen contraídos em *Passiflora* ocorre na androgametogênese desencadeada por mutações gênicas que afetam o produto pós-meiótico (SOUZA et al., 2004; SOUZA et al., 2008).

A ocorrência de grãos de pólen do tipo T4 (microgrão) se mostrou reduzida e praticamente constante em ambos os genótipos, entretanto comparando-se esse tipo de grão com os grãos do tipo gigante, observa-se que em *P. vitifolia* a sua ocorrência apresenta percentuais consideráveis (31,65%), apresentando redução à medida que o horário de coleta dos grãos pólen avança. Para o híbrido *P. 'Lamepiana'* a ocorrência de grãos de pólen do tipo gigante (T5), considerado anômalo, foi menor que 1%. A formação desse tipo de grão de pólen pode estar diretamente relacionada à manutenção do caráter diploide dessas células através da ocorrência de díades e tríades (LAVINSCKY, 2016). Percentuais que variaram de 2,55 a 17,67% para grãos gigantes também foram relatados para outros híbridos HD26, oriundos do cruzamento *P. vitifolia* vs. *P. hatschabchii* (SOUZA, 2017).

A reação positiva dos grãos de pólen de *P. vitifolia* e de *P. 'Lamepiana'* ao Lugol, confirma a natureza amilácea do tecido de reserva e o uso potencial de ambos os genótipos em diferentes cruzamentos para obtenção de outras cultivares, uma vez que o

desenvolvimento do tubo polínico e a fertilização são favorecidas em espécies que possuem esse tipo de reserva (SOUZA et al. 2004).

Os estigmas de ambos os genótipos reagiram positivamente ao peróxido de hidrogênio 3% e à benzidina, demonstrando estarem receptivos logo após a abertura das flores, resultados semelhantes também foram observados para *P. alata* Curtis e *P. cincinnata* Mast. (LAWINSCKY, 2010).

CONCLUSÕES

O marcador molecular ISSR confirmou de forma rápida a natureza híbrida das plantas HD26. Ambos os genitores contribuíram de forma igualitária para formação do cariótipo de *P. 'Lamepiana'*, assim como observado na GISH. As características florais de *P. 'Lamepiana'* confere a esse híbrido o potencial de seu lançamento como uma possível cultivar no mercado de plantas ornamentais. Além disso, a alta viabilidade polínica e a receptividade do estigma desse híbrido possibilitam a sua utilização na continuação de programas de melhoramento que visam a produção de híbridos ornamentais triplos ou retrocruzados.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à UESC, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro à pesquisa; FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelas bolsas concedidas ao primeiro autor; CNPq pela bolsa concedida ao segundo autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P. P. **Análises em *Passiflora palmeri*, *Passiflora foetida* e híbridos F₁ ornamentais: Relações citogenéticas e caracterização fisiológica.** Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2008.

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

- ALEXANDER, M. P. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. **StainTech.**, v. 44, n. 3, p. 117-122, 1969.
- ARAKAKI, J.; MATTA, F. D. P.; FAVERO, A.; GUSMAO, M.; VIGNA, B. Obtenção de híbridos de *Paspalum* spp. e certificação da hibridação com marcadores SSR e ISSR. **In Embrapa Pecuária Sudeste-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 9., 2017, Foz do Iguaçu, PR. Melhoramento de plantas: projetando o futuro. Maringá, PR: SBMP, 2017.
- BARTH, S.; MELCHINGER, A. E.; LÜBBERSTEDT, T. H. Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 3, p. 495-505, 2002.
- BELO, G. O.; SOUZA, M. M.; SILVA, G. S.; LAVINSCKY, M. P. Hybrids of *Passiflora*: *P. gardneri* versus *P. gibertii*, confirmation of paternity, morphological and cytogenetic characterization. **Euphytica**, v. 214, n. 1, p. 2, 2018.
- 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, Gustavo; MORAES, Miguel Avila. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 2013.
- BERNACCI, L. C.; SOUZA, M. M. *Passiflora cacao* (Passifloraceae), a new species from Southern Bahia, Brazil. **Novon**, p. 1-7, 2012.
- BERNACCI, L.C.; VITTA, F.A.; BAKKER, Y.V. Passifloraceae. In: WANDERLEY M.G.L., SHEPPERD G.J., MELHEM T.S., GIULIETTI A.M., KIRIZAWA M. (Eds.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**, RiMa/FAPESP, São Paulo, v. 3, p.247-274, 2003.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant molecular biology reporter**, v. 19, n. 3, p. 209-215, 2001.
- BRITO, A. C.; SOUZA, J. D.; REBOUÇAS, T. N. H.; AMARAL, C. L. F. Propriedades do pólen e do estigma de *Ocimum basilicum* L. (cultivar Maria Bonita) para aumentar a eficiência de cruzamentos em programas de melhoramento. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 208-214, 2010.
- BRUCKNER, C. H. viabilidade do pólen de maracujazeiro sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Ceres**, v. 47, n. 273, p. 523-531, 2000.
- BRUCKNER, C. H.; CASALI, V. W. D.; DE MORAES, C. F.; REGAZZI, A. J.; SILVA, E. A. M. Self-incompatibility in passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). **Acta Horticulturae**. v. 370, n. 1, p. 45-52, 1995.
- CERVI, A. C.; IMIG, D. C. A new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso do Sul, Brazil. 2013.

- CHEN, F.; YUAN, W.; SHI, X.; YE, Y. Evaluation of pollen viability, stigma receptivity and fertilization success in *Lagerstroemia indica* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 46, p. 6460-6467, 2013.
- CHAGAS, E. A.; BARBOSA, W.; SAITO, A.; PIO, R.; CHAGAS, P. C. *In vitro* germination of *Pyrus calleryana* Decne. pollen: adjusting a protocol. In: **X International Pear Symposium 800**. p. 515-520. 2007
- COELHO, M. D. S. E.; ANDRADE B., K. C.; ARAÚJO, F. P.; MELO, N. F. Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims × *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrid and its parents. **Euphytica**, v. 210, n. 1, p. 93-104, 2016.
- CONCEIÇÃO, L. D. H. C. S.; SOUZA, M. M.; BELO, G. D. O.; SANTOS, S. F. D.; FREITAS, J. C. O. D. Hybridization among wild passionflower species. **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, n. 2, p. 237-240, 2011.
- DAFNI, A. **Pollination ecology – a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1992.
- DAMASCENO JUNIOR, P. C.; PEREIRA, T. N. S.; NETO, M. F. PEREIRA, M. G. Meiotic behavior of *Carica papaya* and *Vasconcellea monoica*. **Caryologia**, v. 63, p. 229-236, 2010.
- DEFANI-SCOARIZE, M. A. Meiotic behavior of inbred lines of maize (*Zea mays* L.). **Nucleus**, v. 39, p. 10-18, 1996.
- DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; SOARES-SCOTT, M. D.; SOUZA, L. S.; CASTIGLIONI, G. L. BRS Rubiflora: Híbrido de *Passiflora* para uso como planta ornamental. **Ornamental Horticulture**, v. 13, p. 473-475, 2007a.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; BORGES, R. D. S.; PEIXOTO, J. R.; SILVA, D. G. P. BRS Estrela do Cerrado: híbrido de *Passiflora* para uso como planta ornamental. **Embrapa Cerrados-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E)**, 2007b.
- FRANZON, R. C.; CORRÊA, E. R.; RASEIRA, M. C. B. *In vitro* pollen germination of feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 5, n. 2, 2005.
- GALEN, C.; PLOWRIGHT, R. C. Testing the accuracy of using peroxidase activity to indicate stigma receptivity. **Canadian Journal of Botany**, v. 65, n. 1, p. 107-111, 1987.
- ISSHIKI, S.; IWATA, N.; KHAN, M. M. R. ISSR variations in eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. **Scientia Horticulturae**, v. 117, n. 3, p. 186-190, 2008.

- JAUHAR, P. P.; PETERSON, T. S. Cytological analyses of hybrids and derivatives of hybrids between durum wheat and *Thinopyrum bessarabicum*, using multicolour fluorescent GISH. **Plant breeding**, v. 125, n. 1, p. 19-26, 2006.
- JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J.; SOARES, T.L.; FALEIRO, G.F. **Aplicação de descritores morfoagronômicos utilizados em ensaios de DHE de cultivares de maracujazeiro-azedo (*P. edulis* Sims)**. Manual Prático, EMBRAPA, Brasília – DF, 2015.
- JOHANSEN, D. A. Plant microtechnique Mc. **Graw-Hill Book Co. Inc. New York and London. 511pp**, 1940.
- JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BRAGA, M. F.; LIMA, C. A.; DE FARIA VAZ, C.; VILLANOVA, A. C. C. BRS Roseflora: Híbrido de Passiflora para uso em paisagismo. **Ornamental Horticulture**, v. 13, p. 476-478, 2007.
- KING, L. A. Newly-Registered Cultivars. **Passiflora**, v. 17, p. 1-37, 2007.
- LAVINSCKY, M. P. **Análises meióticas em genitores e híbridos interespecíficos F1 (Progênie HD15) de Passiflora L.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2016.
- LOPES, M.; MATTA, F. D. P.; VIGNA, B. Confirmação de hibridação em cruzamentos de Paspalum spp. com marcadores SSR e ISSR. In **Embrapa Pecuária Sudeste-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA CIENTÍFICA DA EMBRAPA SÃO CARLOS, 10., 2018, São Carlos, SP. Anais... São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação; Embrapa Pecuária Sudeste, 2018.
- LOPES, E. F. **Avaliação do comportamento meiótico de milho-pipoca (*zea mays* L.) Durante o processo de endogamia.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade estadual de Maringá, Maringá, Paraná, 2006.
- LUZA, J. G.; POLITO, V. S. In vitro germination and storage of English walnut pollen. **Scientia Horticulturae**, v. 27, n. 3-4, p. 303-316, 1985.
- MACDOUGAL, J. M.; OCHOA, J.; KROSNICK, S. E. *Passiflora intricata*, an apetalous new species from the Dominican Republic in Supersection Auriculatae (Passifloraceae). **Phytotaxa**, v. 367, n. 3, p. 291-296, 2018a.
- MACDOUGAL, J. M.; COCA, L. F. *Passiflora kumandayi* (Passifloraceae), a new species from the Colombian Andes in a new section within subgenus Decaloba. **Phytotaxa**, v. 344, n. 1, p. 13-23, 2018b.
- MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de Passiflora.** 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 15 janeiro de 2018.

- MELO, C. A. F.; SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Establishment of the genomic in situ hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 1, p. 2176-2188, 2015.
- MELO, C. A. F.; SOUZA, M. M.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SOUZA, V. O.; CORRÊA, R. X. Morphological characterization and genetic parameter estimation in backcrossed progenies of *Passiflora* L. for ornamental use. **Scientia Horticulturae**, v. 212, p. 91-103, 2016.
- MEZZONATO-PIRES, A. C.; GONCALVES-ESTEVEZ, V.; BERNACCI, L.; C. A new species of *Passiflora* subgenus *Astrophea* (Passifloraceae) from the Brazilian Amazon. **Phytotaxa**, v. 288, n. 1, p. 77-84, 2016.
- MORERA, M.; COSTA, A.; FALEIRO, F.; CARLOSAMA, A.; CARRANZA, C. Maracujá: dos recursos genéticos ao desenvolvimento tecnológico. **Embrapa Cerrados-Livro técnico (INFOTECA-E)** 2018.
- MUNSELL, COLOR CHARTS. Munsell color charts for plant tissues. New York, 1997.
- NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus**, v. 6, n. 3, p. 194-226, 2006.
- OCAMPO PÉREZ, J. A.; MOLINARI, M. *Passiflora gustaviana*, a new species of *Passiflora* (Supersection Laurifolia) from Colombia revealed by multivariate analysis. **Systematic Botany**, v. 42, n. 4, p. 848-858, 2017.
- OLIVEIRA, J. C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. **Simpósio Brasileiro sobre a cultura do maracujazeiro**, v. 5, n. 19989, p. 291-310, 1998.
- PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005.
- RADMANN, E.B.; OLIVEIRA, R.P. Caracterização de cultivares apirênicas de citros de mesa por meio de descritores morfológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p. 1123-1129, 2003.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.
- SANCHÊS, R. C. V. S. **Análises citogenéticas em acessos de *Cucumis melo* l. e híbridos triplos de *Passiflora* L.** Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2018.
- SANTOS, E. A.; SOUZA, M. M.; ABREU, P. P.; ARAÚJO, I. S.; VIANA, A. P.; DE ALMEIDA, A. A. F.; DE OLIVEIRA FREITAS, J. C. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**, v. 184, n. 3, p. 389-399, 2012.

SCHWARZACHER, T.; HESLOP-HARRISON, P. Practical in situ hybridization. BIOS Scientific. 2000.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. Pollen: Biology. **Biochemistry, management**, p. 33-36, 1974.

SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Genomic in situ hybridization in plants. **Genet Mol Res**, v. 12, n. 3, p. 2953-65, 2013.

SILVA, G. S.; SOUZA, M. M.; DE MELO, C. A. F.; URDAMPILLETA, J. D.; FORNI-MARTINS, E. R. Identification and characterization of karyotype in *Passiflora* hybrids using FISH and GISH. **BMC genetics**, v. 19, n. 1, p. 26, 2018.

SOARES, T. L.; JESUS, O. N. D.; SANTOS-SEREJO, J. A. D.; OLIVEIRA, E. J. D. In vitro pollen germination and pollen viability in passion fruit (*Passiflora* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 4, p. 1116-1126, 2013.

SOUZA, A. C. **Caracterização morfológica, estimativa de parâmetros genéticos e análises de comportamento meiótico em híbridos interespecíficos F₁ de *Passiflora* L.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2017.

SOUZA, V. O. **Análises morfológicas, genéticas e citogenéticas em híbridos interespecíficos de *Passiflora coccinea* e *P. hatschbachii*.** Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2018.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. S.; VIANA, A. P.; SILVA, L. C.; SUDRE, C. P. Pollen viability and fertility in wild and cultivated *Passiflora* species (Passifloraceae). **Beitr. Biol. Pfl**, v. 73, n. 3, p. 359-376, 2004.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIANA, A. P.; PEREIRA, M. G.; DO AMARAL JÚNIOR, A. T.; MADUREIRA, H. C. Flower receptivity and fruit characteristics associated to time of pollination in the yellow passion fruit *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener (Passifloraceae). **Scientia Horticulturae**, v. 101, n. 4, p. 373-385, 2004.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M.L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 247-258, 2008.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.

TWELL, D. Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: vegetative cell ablation blocks generative cell migration. **Protoplasma**, v. 187, n. 1-4, p. 144-154, 1995.

VANDERPLANK, J.; BLANCO, E. G.; FEUILLET, C.; FRANK, A.; KING, L.; KUGLER, E.; SKIMINA, T. The international *Passiflora* register 2003. **Passiflora Society International**, v. 1, p. 1-36, 2003.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

CAPÍTULO 3 Manuscrito em formato de artigo científico

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS VEGETATIVAS E FLORAIS EM HÍBRIDOS F₁ DE *Passiflora vitifolia* vs. *Passiflora hatschbachii* SUBMETIDOS A DIFERENTES NÍVEIS DE LUZ

Aline Pinto dos Santos¹, Margarete Magalhães Souza^{1*}, Gonçalo Santos Silva¹, Pedro Paulo Amorim Pereira¹, Thâmara Moura Lima²

¹Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Melhoramento de Plantas (LAMEP), Rod. Jorge Amado, Km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

²Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Departamento de Ciências Biológicas, Rod. Jorge Amado, Km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

*Autor correspondente: e-mail: souzamagg@yahoo.com.br (M.M. Souza); Fone/Fax.: +557336805055.

RESUMO

Plantas submetidas a diferentes níveis de luz podem apresentar desenvolvimento morfológico diferenciado em função da plasticidade fenotípica das espécies a essas variações. O objetivo desse trabalho foi avaliar as respostas vegetativas e florais em híbridos da progênie HD26, obtidos do cruzamento *Passiflora vitifolia* vs. *P. hatschbachii*, submetidos a diferentes níveis de luz. Foram utilizados quatro genótipos híbridos (HD26-102, HD26-104, HD26-143 e HD26-146) sob a incidência de 20%, 50%, 70% de luz e a pleno sol. A plasticidade fenotípica dos genótipos em função da luz não foi igualitária para as características vegetativas e florais analisadas. Para características como comprimento do entrenó, diâmetro do caule e comprimento de folha, em todos os híbridos exceto no HD26-143, foram observados maiores valores quando submetidos a 20, 50 e 70% de luz. O ambiente a pleno sol ocasionou maior largura de folha, profundidade do sinus e área foliar nos híbridos HD26-102, HD26-143 e HD26-146. Nos ambientes com 20% e 70% de luz, apenas o número de glândulas no pecíolo

foi favorecido nos híbridos HD26-102, HD26-104 e HD26-143. Para as características florais referentes ao diâmetro da flor e da coroa foram maiores em HD26-143 nos ambientes com 50%, 70% de luz e pleno sol. Em contrapartida o híbrido HD26-146 teve essas mesmas características favorecidas no ambiente com 20% de luz. A obtenção de flores com peças florais mais largas foi observada no híbrido HD26-104 sob 20% e 50% de luz e no híbrido HD-146 nos ambientes com maior intensidade luminosa (50%, 70% e pleno sol). Para as características qualitativas florais não houve influência dos níveis de radiação solar. Entretanto, para coloração da folha tons de verde mais escuro foram observados no ambiente com 20% de luz. Apesar da pouca influência dos diferentes ambientes no desenvolvimento dos híbridos, a condição de pleno sol é mais indicada para o cultivo de qualquer um desses genótipos, uma vez que maior número de flores e prolongamento do período de florescimento foi observado nesse ambiente.

Palavras-chave: Componentes principais, desenvolvimento morfológico, florescimento, maracujazeiros, plantas ornamentais.

ABSTRACT

The plants submitted to different levels of light can be morphologically differentiated as a function of the phenotypic plasticity of the species to these variations. The objective of this work was to evaluate vegetative and floral responses in hybrids of progeny HD26, from crossing *Passiflora vitifolia* vs. *P. hatschbachii*, submitted to different levels of light. Four hybrid genotypes (HD26-102, HD26-104, HD26-143 and HD26-146) were submitted under the incidence of 20%, 50%, 70% light and in full sun. Phenotypic plasticity of the genotypes as a function of light was not egalitarian for the vegetative and floral characteristics analyzed. For traits such as length of the stem, stem diameter and leaf length, in all hybrids except HD26-143, higher values were observed when submitted to 20, 50 and 70% light. Unshaded environment (full sun) caused greater leaf width, sinus depth and leaf area in hybrids HD26-102, HD26-143 and HD26-146. In the environments with 20% and 70% of light, only the number of glands in the petiole was favored in the hybrids HD26-102, HD26-104 and HD26-143. For floral characteristics regarding flower and crown diameter were higher in HD26-143 in environments with 50%, 70% of light and full sun. For the qualitative floral characteristics there was no influence of solar radiation levels. However, for leaf coloration darker green tones were observed in the environment with 20% of light. Despite the low influence of the different environments on the development of hybrids, the full sun condition is more suitable for the cultivation of any of these genotypes, since a greater number of flowers and prolongation of the flowering period was observed in this environment.

Key words: flowering, main components, morphological development, ornamental plants, passion fruit.

INTRODUÇÃO

A família Passifloraceae pertencente à ordem Malphigiales (MILWARD-DE-AZEVEDO; BAUMGRATZ et al., 2004) e apresenta cerca de 650 espécies distribuídas em 19 gêneros (BERNACCI et al., 2013), das quais, grande parte encontra-se inserida dentro do gênero *Passiflora*. O grande número de espécies pertencentes a esse gênero, com mais de 500 já descritas, justifica a sua classificação como o gênero mais importante que compõe a família Passifloraceae (CERVI; IMIG, 2013). A ampla distribuição geográfica do gênero *Passiflora* (BERNACCI et al., 2013) resulta na ocorrência de espécies sujeitas a diferentes condições edafoclimáticas, algumas adaptadas às condições de climas subtropicais como em países das Américas, outras às regiões neotropicais e subtropicais, com destaque para o Brasil, onde ocorre grande variedade de espécies, e considerado centro de diversidade desse gênero (BERNACCI et al., 2008; BERNACCI et al., 2013).

As passifloras são arbustos herbáceos ou lenhosos de características singulares, como a presença de uma corona filamentosa, de estipulas e de gavinhas que auxiliam na sustentação (FEUILLET; MACDOUGAL, 2004), sendo estes os principais descritores botânicos das espécies pertencentes ao gênero *Passiflora*.

A presença de flores pentâmeras com pétalas e sépalas alternas, hermafroditas, de coloração variada (do branco ao vermelho intenso), com a ocorrência de folhas simples e alternas, inteiras ou fendidas, de bordas lisas ou serrilhadas e que apresentam glândulas na base do pecíolo também constituem características importantes desse gênero (CERVI, 1997; NUNES; QUEIROZ, 2006).

O fruto é do tipo baga (WANDERLEY et al., 2003) ou cápsulas (VANDERPLANK, 2000), de tamanho variável, com presença interna de um tecido mucilaginoso, o qual recobre e protege as sementes (BERNACCI et al., 2008; NUNES; QUEIROZ, 2007). Alguns frutos são comestíveis e produzidos comercialmente, como os frutos de *Passiflora edulis* Sims e *P. alata* Curtis, outros são comercializados localmente como a *P. quadrangulares*, ou ainda aqueles utilizados apenas para fins ornamentais, como *P. coccinea* Aubl (BERNACCI et al., 2005).

A beleza das passifloráceas sempre foi um atrativo e desde 1625, tanto *P. caerulea* Linn. quanto *P. incarnata* L. já são produzidas para fins ornamentais na Europa (CERVI, 1997). Por volta de 1819 o primeiro híbrido interespecífico (*P. 'Violacea'*) envolvendo *P. racemosa* Brot. vs. *P. caerulea* foi obtido por Thomas Milne, e a partir desse híbrido o melhoramento genético das passifloráceas foi impulsionado, sendo obtidos diversos híbridos

desse gênero (KING, 2011). Além da hibridação, pesquisas envolvendo a descoberta e descrição de novas espécies também têm obtido grandes avanços, resultando na constante adição de novas espécies à lista de passifloras conhecidas (BERNACCI; SOUZA, 2012; MORALES et al., 2016).

Pesquisas envolvendo passifloras ornamentais têm demonstrado o seu potencial de utilização no mercado paisagístico, entretanto, esse segmento ainda é pouco explorado (PEIXOTO, 2005). No entanto, o grande número de espécies adaptadas as mais diversificadas condições climáticas possibilitam a utilização das passifloráceas para composição de jardins externos e internos, ornamentação de pérgolas, cercas vivas e até o seu cultivo em vaso (VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004). Nas Américas e na Europa algumas espécies já são exploradas a nível comercial (ULMER; MACDOUGAL, 2004; VANDERPLANK, 2000).

Um dos fatores que influenciam a utilização incipiente das passifloras para fins ornamentais deriva da falta de conhecimento da população sobre o potencial paisagístico e sobre as condições de cultivo dessas plantas. A falta de conhecimento relacionado a disponibilidade de luz, a submissão de plantas às condições de incidência solar abaixo ou acima da requerida pode afetar diretamente a taxa fotossintética das plantas, resultando em plantas com desenvolvimento anormal (CHAZDON et al., 1996) e irregularidade no florescimento, uma vez que em plantas ornamentais a disponibilidade luminosa pode afetar a frequência e a quantidade de botões florais (SOUZA et al., 2018). Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos diferentes níveis de luz nas características vegetativas e florais em híbridos interespecíficos F₁ oriundos do cruzamento *Passiflora vitifolia* Kunth. vs. *P. hatschbachii* Cervi.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi conduzido entre os meses de fevereiro a dezembro de 2018, na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, Bahia, 39° 10'W; 14° 39'S; 78 m. O prolongamento no período de avaliação dos híbridos ocorreu em função da falta regularidade no período de florescimento entre os híbridos. Foram utilizados quatro híbridos (HD26-102, HD26-104, HD26-143 e HD26-146) oriundos do cruzamento *P. vitifolia* vs. *P. hatschbachii*, os quais vêm sendo mantidos no Banco Ativo de Germoplasma (BAG-Passifloras) da UESC.

Os híbridos avaliados foram selecionados por apresentarem flores de coloração e florescimento intenso, uma vez que as características florais são parâmetros determinantes no agronegócio de plantas ornamentais.

Para obtenção das repetições, estacas de aproximadamente 20 cm e contendo três gemas laterais foram confeccionadas da parte mediana dos ramos de uma planta matriz de cada genótipo. Visando evitar o efeito guarda-chuva e a formação de dreno, em cada estaca foi mantido um par de folhas reduzidas a um terço de sua área original. Para aumentar a superfície de contato do tecido vegetativo das estacas com o meio de enraizamento (areia lavada), um corte em bisel foi realizado na base das estacas. Depois de seccionadas, aplicou-se ácido indol-3-butílico (AIB) na concentração de 2 g kg^{-1} na base das estacas e, em seguida, as mesmas foram estaqueadas imediatamente (para evitar perda de água pelos tecidos cambiais) em sacos de polietileno preto, com capacidade de 1,5 L, contendo areia lavada, previamente autoclavada.

As estacas foram imediatamente irrigadas após o estaqueamento e as irrigações subsequentes foram realizadas duas vezes ao dia (uma pela manhã e outra no final da tarde) até a ocorrência do enraizamento.

As estacas foram mantidas em condição de sombra por três meses até o seu enraizamento. Nesse período foram realizadas mensalmente adubações foliar do tipo meia-força (metade da concentração normal de NPK 4-14-8), visando acelerar a formação das raízes. Quinze dias antes da transferência das estacas para vasos plásticos, o solo argilo-arenoso previamente peneirado foi tratado com Furadan, para eliminação de possíveis nematoides. O tratamento consistiu na aplicação de 8,0 gramas do nematicida para cada 11 L de solo. Após a homogeneização do Furadan com o solo, os vasos foram cobertos com plástico e mantidos em repouso por 15 dias para ação do nematicida.

Transcorrida a emissão de folhas novas, 90 dias após o estaqueamento, as plantas já enraizadas foram transferidas para vasos de plástico com capacidade para 15 L. Em seguida, as plantas foram transferidas para ambientes com sombreamento artificial e a pleno sol. Para obtenção dos diferentes níveis de sombreamento, foram utilizados sombrites com malhas que proporcionaram 20, 50 e 70% de luz.

As malhas foram fixadas em armações de madeira e concreto com dimensões de $5 \times 5 \times 2 \text{ m}^3$ sob os quais os vasos plásticos contendo as mudas foram alocados. Visando a condução e o suporte das mudas, foram fixados fios de arame nos vasos em formato triangular. Após o desenvolvimento das plantas, esse suporte foi substituído por fios de arames presos a 1,40 cm

de altura do solo. A adubação mensal foi realizada com 38,33 mg de MAP purificado, 41,38 mg de cloreto de potássio, 99,53 mg de ureia e 111,1 mg de sulfato de manganês.

Delineamento experimental e análise dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 4, com quatro repetições, correspondente a quatro genótipos e três níveis de sombreamento e pleno sol (controle).

Para os dados quantitativos vegetativos e florais, a partir do conjunto de variáveis analisadas foi elaborada a matriz de dissimilaridade com base na distância Euclidiana, seguido do agrupamento dos dados pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (SNEATH; SOKAL, 1973). Para as características qualitativas a matriz de dissimilaridade foi estabelecida tomando como base o método de Cole-Rogers (COLE-ROGERS et al., 1997).

A análise de componentes principais (ACP) tem por finalidade a redução de dados, por meio de combinações lineares das variáveis originais (HOTELLING, 1933), sendo possível correlacionar o comportamento das variáveis analisadas com os tratamentos em estudo. Para proceder com a análise, inicialmente os dados foram padronizados para média zero e variância unitária. Posteriormente foi elaborado o gráfico biplot. Esta representação gráfica mostra os dois primeiros componentes responsáveis pela maior quantidade de variância total dos dados. Além disso, foram elaborados gráficos que apresentaram o peso e a contribuição significativa das variáveis dentro de cada componente representativo para explicar a maior variância acumulada. A análise foi realizada no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2017), com utilização do pacote *factoextra* (KASSAMBARA; MUNDT, 2016).

Visando facilitar a correlação entre os diferentes genótipos, os níveis de luz e as características analisadas, bem como a interpretação das análises multivariadas, os híbridos foram categorizados (Tabela 2).

Tabela 2. Categorização dos genótipos da progênie de híbridos F₁ HD26 de *Passiflora* e dos tratamentos utilizados para análise dos dados através da ACP.

| Categoria | Genótipo/Tratamento | Categoria | Genótipo/Tratamento |
|------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|
| G1S1 | HD26-102 sob pleno sol | G3S1 | HD26-143 sob pleno sol |
| G1S2 | HD26-102 sob 70% de luz | G3S2 | HD26-143 sob 70% de luz |
| G1S3 | HD26-102 sob 50% de luz | G3S3 | HD26-143 sob 50% de luz |
| G1S4 | HD26-102 sob 20% de luz | G3S4 | HD26-143 sob 20% de luz |
| G2S1 | HD26-104 sob pleno sol | G4S1 | HD26-146 sob pleno sol |
| G2S2 | HD26-104 sob 70% de luz | G4S2 | HD26-146 sob 70% de luz |
| G2S3 | HD26-104 sob 50% de luz | G4S3 | HD26-146 sob 50% de luz |
| G2S4 | HD26-104 sob 20% de luz | G4S4 | HD26-146 sob 20% de luz |

(G1) HD26-102; (G2) HD26-104; (G3) HD26-143; (G4) HD26-146. (S1) pleno sol; (S2) 70% de luz; (S3) 50% de luz; (S4) 20% de luz.

Caracterização morfológica

A avaliação das características morfológicas dos híbridos foi realizada mediante a adoção de 19 descritores morfológicos quantitativos, dos quais 12 são relativos a características florais e sete são referentes às características vegetativas (Tabela 1). A análise qualitativa dos híbridos foi realizada com base em sete características florais e em quatro características vegetativas, totalizando 11 descritores qualitativos. Os 30 descritores morfológicos adotados foram baseados na lista oficial de descritores para *Passiflora* ornamental (MAPA, 2008) e alguns ausentes no MAPA, foram baseados no manual prático da EMBRAPA para *Passiflora* (JESUS et al., 2015).

Tabela 1. Descritores morfológicos qualitativos e quantitativos analisados na progênie de híbridos F₁ HD26 de *Passiflora*

| Descritores Morfológicos Quantitativos | |
|---|--------------------------------------|
| Florais | Vegetativos |
| Diâmetro da flor (DF) | Comprimento da folha (CF) |
| Diâmetro da coroa (DCO) | Largura da folha (LF) |
| Largura da pétala (LPE) | Área foliar (AF) |
| Largura da sépala (LSE) | Diâmetro do caule (DC) |
| Comprimento da pétala (CPE) | Comprimento do entrenó (CEN) |
| Comprimento da sépala (CSE) | Número de glândulas no pecíolo (NGP) |
| Largura da bráctea (LBR) | Profundidade dos sinus (PSIN) |
| Comprimento da bráctea (CBR) | |
| Tamanho dos primeiros filamentos da coroa (TF1) | |
| Tamanho do segundo filamento da coroa (TF2) | |
| Comprimento do pedúnculo floral (CPED) | |
| Comprimento do androginóforo (CA) | |

| Descritores Morfológicos Qualitativos | |
|--|---|
| Florais | Vegetativas |
| Coloração predominante das pétalas (COLPP) | Coloração predominante das folhas (COLP) |
| Coloração predominante das sépalas (COLPS) | Forma do limbo foliar (FLF) |
| Coloração da primeira linha de filamentos da coroa (COLF1) | Divisão do limbo foliar (DLF) |
| Coloração da segunda linha de filamentos da coroa (COLF2) | Profundidade do sinus no limbo foliar (PLF) |
| | Antocianina no androginóforo (AA) |
| | Antocianina no filete (AF) |
| | Antocianina no estilete (AE) |

As avaliações florais quantitativas foram realizadas à medida que as plantas emitiam flores, entre os meses de abril a dezembro de 2018. Para as características vegetativas quantitativas as avaliações ocorreram no final de novembro de 2018. Ambas as avaliações foram realizadas com auxílio de régua e paquímetro digital. A caracterização da coloração das flores e das folhas foi realizada com base na carta de Munsell (1977) para tecidos vegetais.

RESULTADOS

Características vegetativas quantitativas

A análise de componentes principais (ACP) revelou que os dois primeiros componentes principais (CPs) foram responsáveis por 69,5% da variação total, sobre os quatro híbridos avaliados quanto aos diferentes níveis de luz, em que o primeiro componente (CP1) foi responsável por 49,7% da variação e o segundo componente (CP2), por 19,8% da variação (Figura 1). Os respectivos componentes foram selecionados como significativos por apresentarem autovalores superiores a 1 (JOHNSON; WICHERN, 2004).

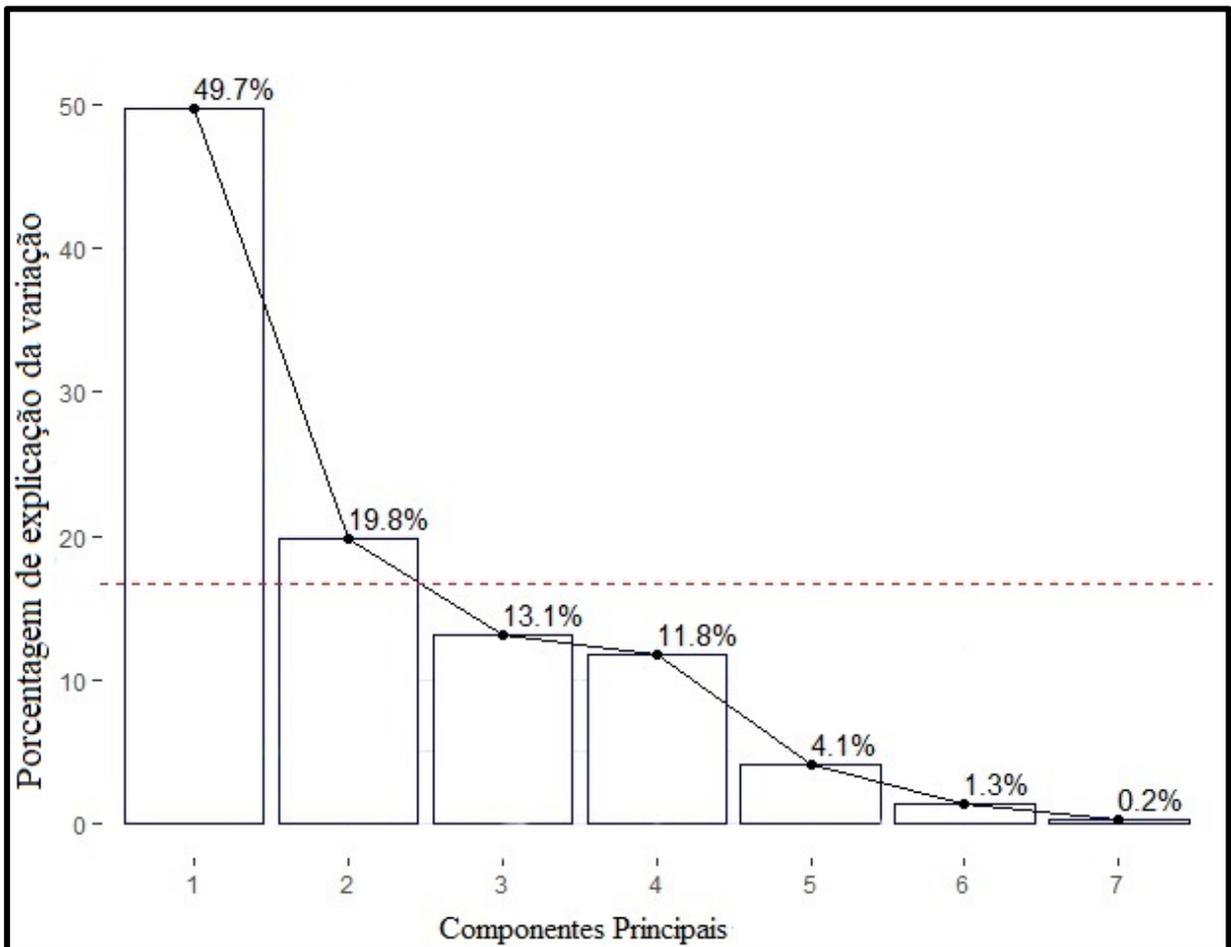


Figura 1. Representação da contribuição de cada componente para explicar a variação dos dados na progênie de híbridos F₁ HD26 de *Passiflora*. Componentes acima da linha vermelha são considerados significativos.

A ACP demonstrou que as características vegetativas quantitativas de todos os quatro híbridos apresentaram variações diferenciadas nos quatro ambientes (Figura 2). O híbrido G1 demonstrou sofrer influência de todos os níveis de luz testados (20%, 50%, 70% e pleno sol). Para esse híbrido, o cultivo nas condições S1 está associado à área foliar AF, LF e PSIN. Já

para condição S3 ocorre associação ao DC, CF e CE, ao passo que para condição de 20% de luz nenhuma característica vegetativa foi favorecida (Figura 2). O híbrido G3 respondeu de forma semelhante ao G1, para as características vegetativas relacionadas à AF, LF e PSIN nas condições S3, S2 e S1 (Figura 2). O híbrido G2 na condição S4 está associado ao CEN, DC e CF. Por outro lado, para esse mesmo híbrido não houve o favorecimento de nenhuma das características analisadas nas condições S3 e S1 (Figura 2). Foi observado para o híbrido G4 que nos ambientes S4, S3 e S2 houve associação com o CEN, DC e CF. Em contrapartida AF, LF e PSIN foram associados às condições S1 (Figura 2).

Para características de importância ornamental, a citar DC e CF, o híbrido G4 apresentou melhores resultados em condições com algum nível de sombreamento. Para os híbridos G1 e G2 as melhores condições para o desenvolvimento dessas características foram ambientes com S3 e S4, respectivamente. Em contrapartida, o genótipo G3 não demonstrou valores significativos inerentes a essas características. O híbrido G4 sob as condições S4 não emitiu flores durante o período de avaliação, não sendo em função disso representado quanto as características florais. Apesar da expressividade do NGP de acordo com o gráfico Biplot, essa variável demonstrou um isolamento em relação às outras características e a concentração de diferentes genótipos em torno de si, fato que pode ter ocorrido em função da maior influência do genótipo em detrimento às condições de luz para essa variável.

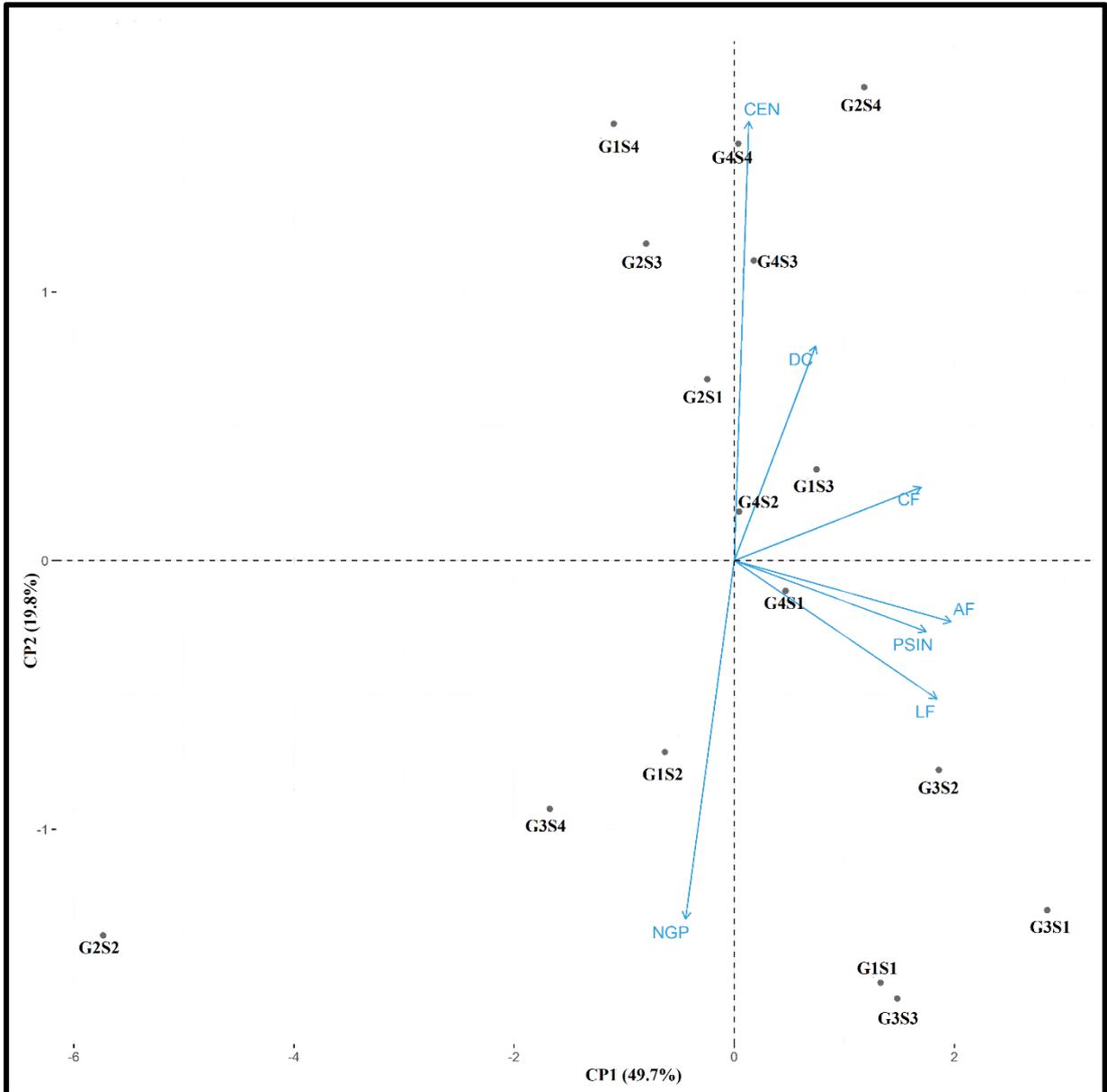


Figura 2. Gráfico Biplot segundo as variações das características vegetativas quantitativas na progênie de híbridos F₁ HD26 de *Passiflora*. (CP1) componente principal 1; (CP2) componente principal 2; (CF) comprimento de folha; (LF) largura da folha; (AF) área foliar; (DC) diâmetro do caule; (CEN) comprimento do entrenó; (PSIN) profundidade dos sinus; (NGP) número de glândulas no pecíolo; (G1) HD26-102; (G2) HD26-104; (G3) HD26-143; (G4) HD26-146; (S1) pleno sol; (S2) 70% de luz; (S3) 50% de luz; (S4) 20% de luz.

Em relação aos dois componentes principais significativos para explicar a variação dos dados (Figura 3), observa-se que para o primeiro componente (CP1), as variáveis AF, LF, PSIN e CF agregadas apresentaram contribuição significativa na construção do referido componente (Figura 3A). Por outro lado, para o segundo componente (CP2) as variáveis significativas foram o CEN e NGP (Figura 3B). Neste sentido, as variáveis significativas do

primeiro componente principal, o qual explica maior parte da variação, apresenta maior contribuição na discriminação dos diferentes híbridos combinados em condições de luz distintas.

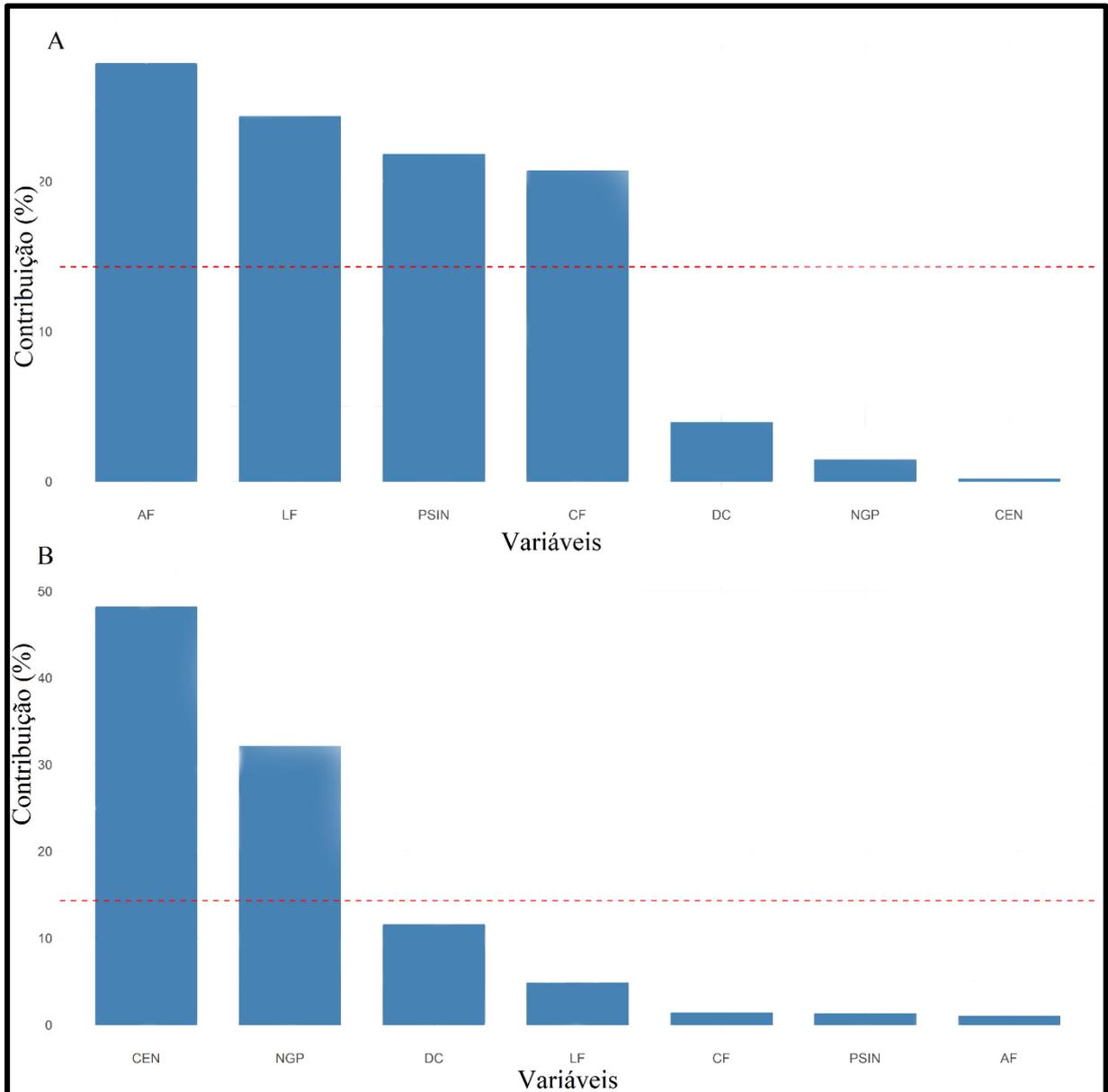


Figura 3. Componentes principais responsáveis pelas variações das características quantitativas vegetativas na progênie de híbridos F₁ HD26 de *Passiflora*: **(A)** Coeficiente de ponderação (contribuição) de cada variável para o primeiro componente principal (**CP1**); **(B)** Coeficiente de ponderação (contribuição) para o segundo componente principal (**CP2**). Variáveis com contribuição acima da linha vermelha são significativas* dentro do componente; *Autovetor > 0,7. **(CF)** comprimento de folha; **(LF)** largura da folha; **(AF)** área foliar; **(DC)** diâmetro do caule; CEN = comprimento do entrenó; **(NGP)** número de glândulas no pecíolo; **(PSIN)** profundidade dos sinus.

De um modo geral observou-se um desenvolvimento vegetativo semelhante para o híbrido G3 sob as S3, S2 e S1, bem como para o híbrido G1 sob a condição S1, resultando no agrupamento desses genótipos sob essas condições. Em relação aos outros híbridos analisados, o desenvolvimento indiferenciado sob as condições de luz avaliadas resultou na formação de um único grupo englobando esses indivíduos (Figura 4). O isolamento do híbrido G2 sob a condição S2 ocorreu em função do não desenvolvimento desse indivíduo nessa condição (Figura 4).

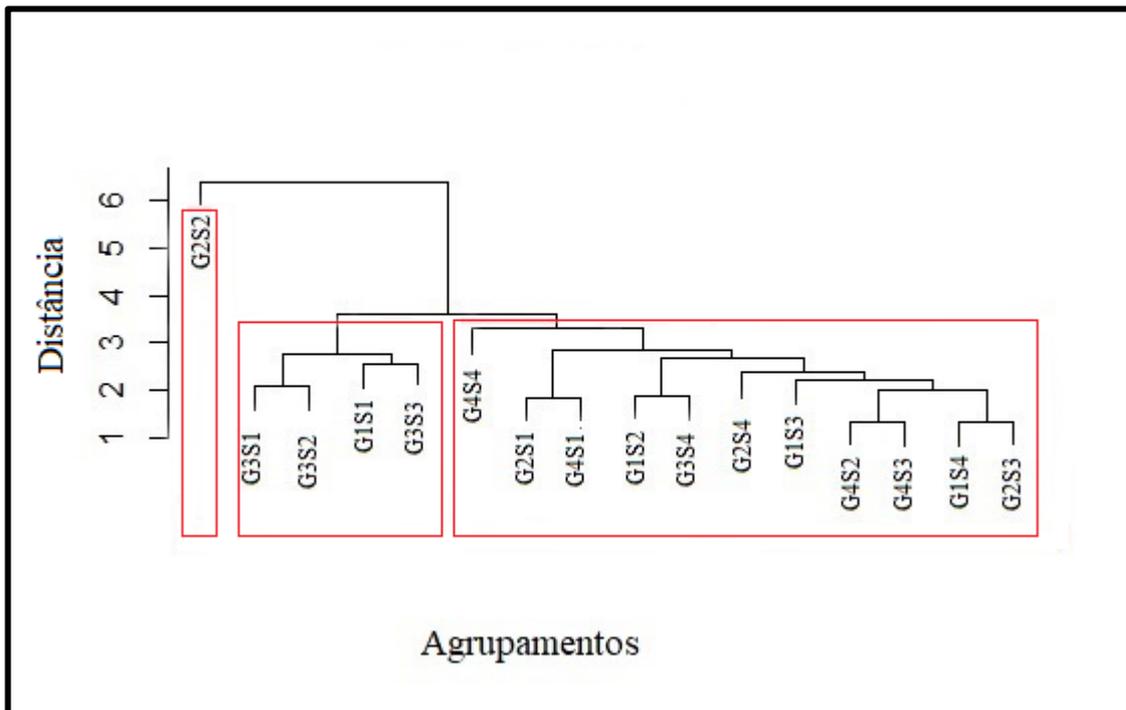


Figura 4. Dendrograma do agrupamento em função das características vegetativas quantitativas dos genótipos submetidos a diferentes níveis de luz na progênie de híbridos F₁ HD26 de *Passiflora*. (**G1**) HD26-102; (**G2**) HD26-104; (**G3**) HD26-143; (**G4**) HD26-146; (**S1**) pleno sol; (**S2**) 70% de luz; (**S3**) 50% de luz; (**S4**) 20% de luz.

Características florais quantitativas

A análise de componentes principais para características quantitativas florais revelou que os quatro primeiros componentes principais (CPs) foram responsáveis por 90,3% da variação total, sobre os quatro híbridos avaliados quanto aos diferentes níveis de luz. O primeiro componente (CP1) foi responsável por 46,5 % da variação, o segundo componente (CP2) representou 23,1% da variação, o terceiro componente (CP3) correspondeu a 11,0% da variação e o quarto componente (CP4) a 9,7% da variação (Figura 5). Os respectivos

componentes foram selecionados como significativos por apresentarem autovalores superiores a 1 (JOHNSON; WICHERN, 2004).

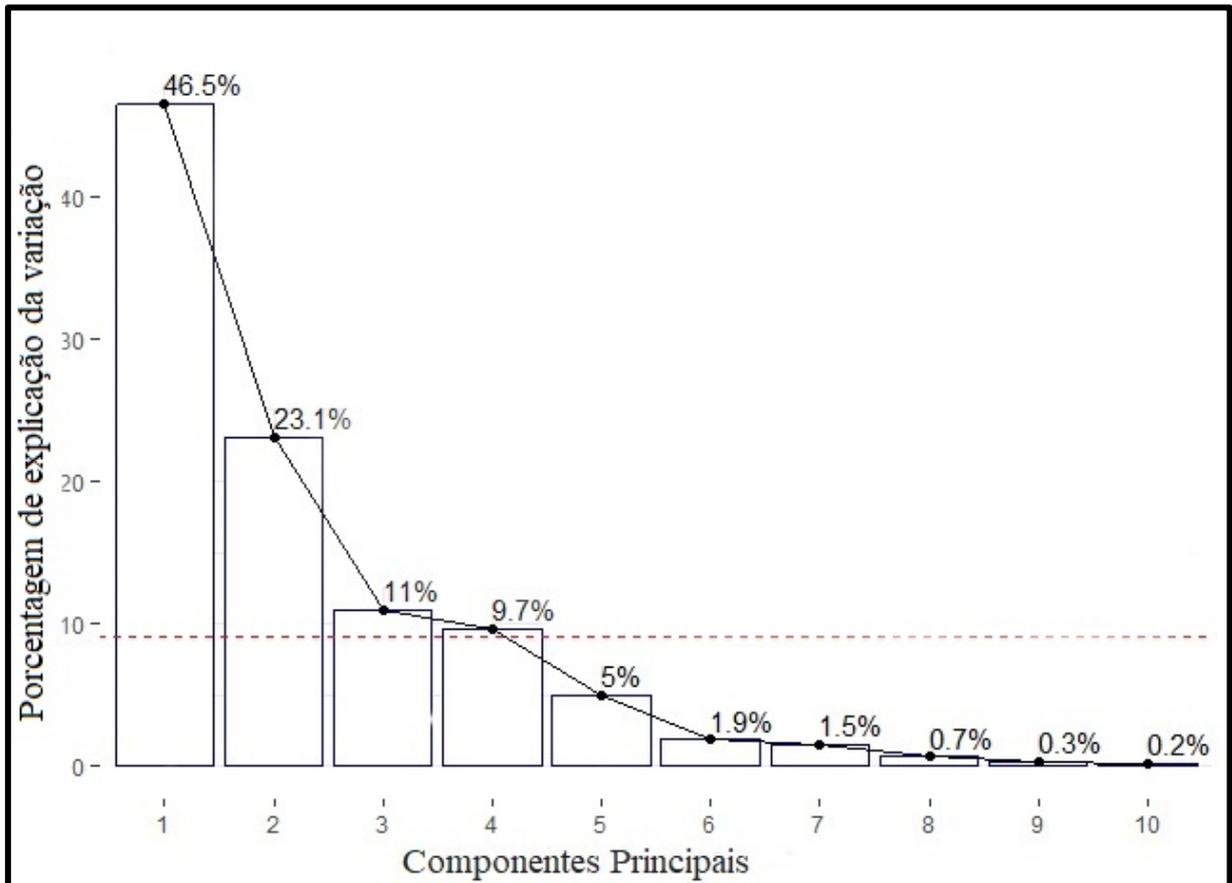


Figura 5. Representação da contribuição de cada componente para explicar a variação dos dados na progênie de híbridos F₁ HD26 de *Passiflora*. Componentes acima da linha vermelha são considerados significativos

O padrão dos dados florais a partir da ACP demonstrou que no híbrido G1 o TF2 não sofreu influência direta do nível de luz, uma vez que essa característica está associada as condições S3, S2 ou S1 (Figura 6).

De forma geral, o híbrido G2 submetido a S2 ou S1 não apresentou associação com as características florais. Entretanto, quando o nível de luz foi reduzido, como nas condições S4 e S3, houve associação desse genótipo com LPE, LSE, LBR e CA (Figura 6).

Para o híbrido G3, características como CPE, CSE, CBR, DF, DCO, TF1 e CPED apresentaram associação com às condições S3, S2 e S1 (Figura 6). Para o híbrido G4, observa-se desenvolvimento semelhante ao híbrido G3 quanto à condição de luz, para LBR, CA, LPE e LSE (Figura 6).

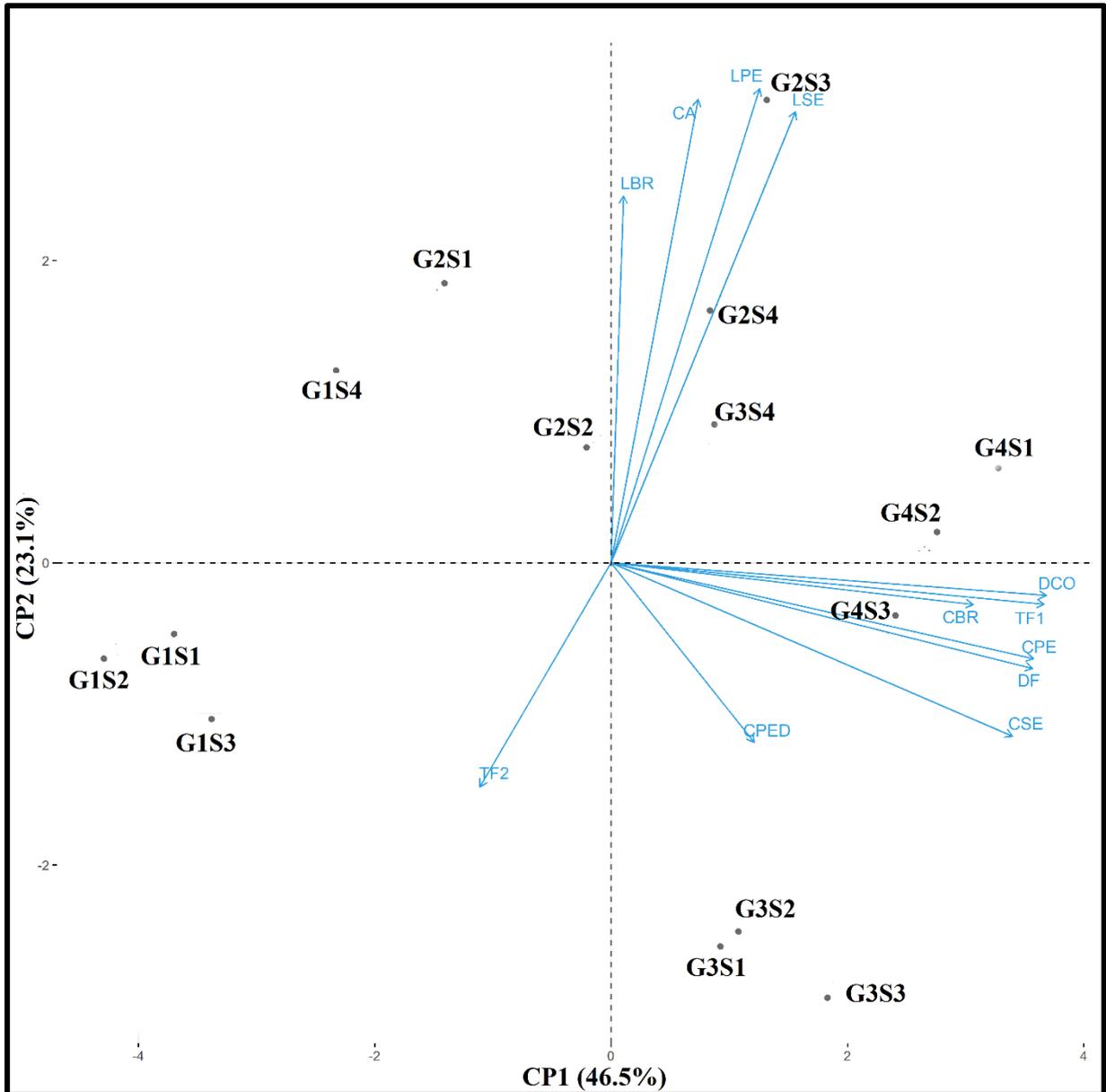


Figura 6. Gráfico Biplot segundo as variações das características florais quantitativas na progênie de híbridos F₁ HD26 de *Passiflora*. (CP1) componente principal 1; (CP2) componente principal 2; (DF) diâmetro da flor; (DCO) diâmetro da coroa; (LPE) largura da pétala; (LSE) largura de sépala; (CPE) comprimento da pétala; (CSE) comprimento de sépala; (LBR) largura de bráctea; (CBR) comprimento da bráctea; (TF1) tamanho dos primeiros filamentos da coroa; (TF2) tamanho do segundo filamento da coroa; (CPED) comprimento do pedúnculo floral; (CA) comprimento do androginóforo; (G1) HD26-102; (G2) HD26-104; (G3) HD26-143; (G4) HD26-146; (S1) pleno sol; (S2) 70% de luz; (S3) 50% de luz; (S4) 20% de luz.

Em relação aos quatro CPs significativos para explicar as variações florais (Figura 7), o primeiro componente (CP1) foi responsável aproximadamente 50% da variação. Dos 12

caracteres florais quantitativos avaliados, seis variáveis apresentaram maior interação genótipo x ambiente. Sendo as variáveis relativas à CBR, CSE, DF, CPE, TF1 e DCO, na ordem crescente, as que mais sofreram influência dos diferentes níveis de luz e, conseqüentemente, foram as características que mais contribuíram para as variações observadas (Figura 7A). Para o segundo componente principal (CP2) a variação foi justificada pelas características LBR, LSE, CA e LPE (Figura 7B). Para o terceiro componente (CP3), a variação foi oriunda do CA, e do TF2, além do CPED (Figura 7C). No quarto componente (CP4) as características responsáveis pela variação relacionaram-se ao TF2, ao CBR e a LBR (Figura 7D). A representatividade repetida das características CA, CBR e TF2 nos diferentes componentes, demonstra a importância desses caracteres nas variações observadas.

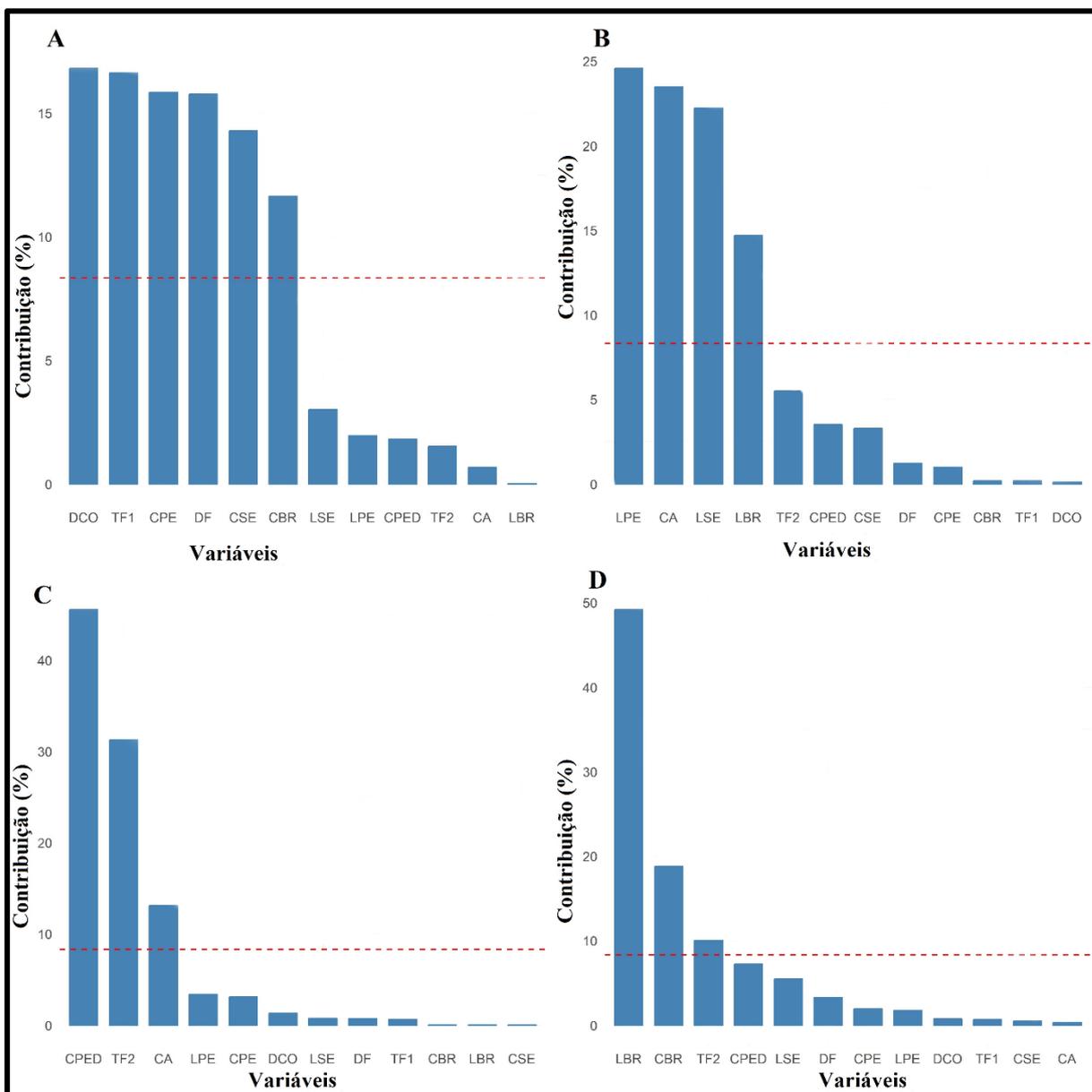


Figura 7. Componentes principais responsáveis pelas variações das características quantitativas florais na progênie de híbridos F₁ HD26 de *Passiflora*. (A) Coeficiente de ponderação (contribuição) de cada variável para o primeiro componente principal (CP1); (B). Coeficiente de ponderação (contribuição) para o segundo componente principal (CP2). (C) Coeficiente de ponderação (contribuição) para o terceiro componente principal (CP3). (D) Coeficiente de ponderação (contribuição) para o quarto componente principal (CP4). Variáveis com contribuição acima da linha vermelha são significativas* dentro do componente; *Autovetor > 0,7. (DCO) diâmetro da coroa; (CPED) comprimento do pedúnculo; (CA) comprimento do androginóforo; (CPE) comprimento de pétala; (CSE) comprimento de sépala; (DF) diâmetro da flor; (CPE) comprimento de pétala; (CSE) comprimento de sépala; (CBR) comprimento da bráctea; (LBR) largura da bráctea; (TF1) tamanho dos primeiros filamentos da coroa; (TF2) tamanho do segundo filamento da coroa.

O agrupamento dos diferentes genótipos, com base nos diferentes níveis de luz, demonstrou que os quatros híbridos estão distribuídos em dois grupos distintos. Um grupo

formado exclusivamente pelo híbrido G1, independentemente do nível de luz e um grupo formado pelos híbrdos G2, G3 e G4 nas diferentes condições de luz (Figura 8).

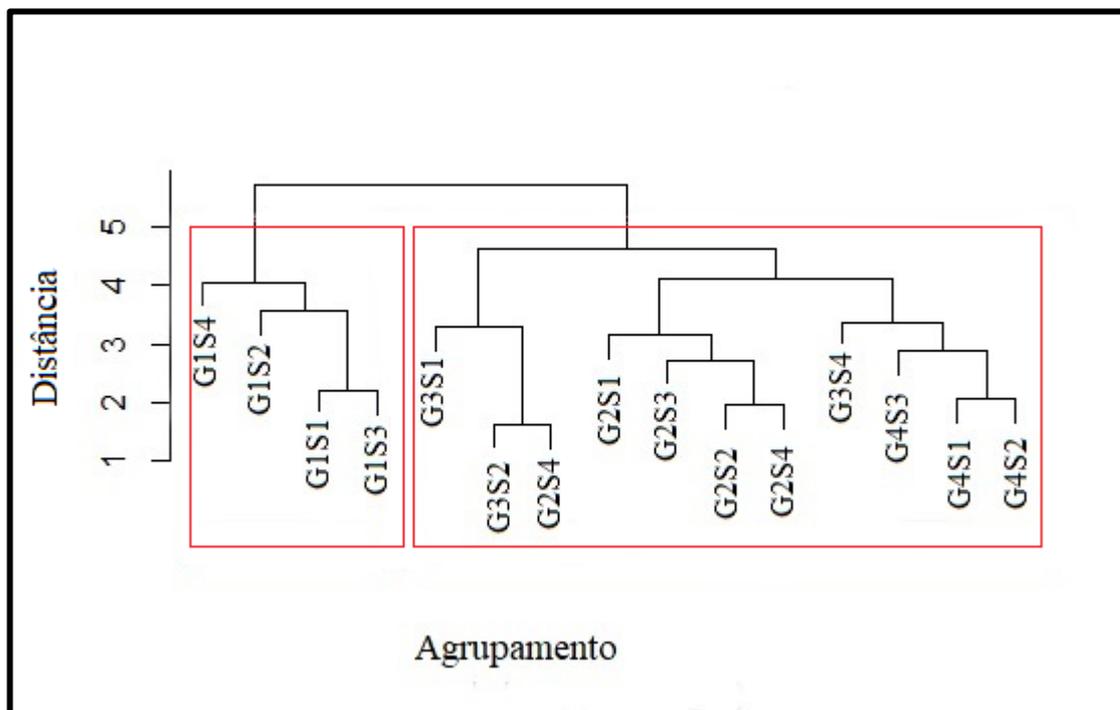


Figura 8. Dendrograma dos agrupamentos dos genótipos em função das características florais quantitativas submetidos a diferentes condições de luz na progênie de híbrdos F₁ HD26 de *Passiflora*. (**G1**) HD26-102; (**G2**) HD26-104; (**G3**) HD26-143; (**G4**) HD26-146; (**S1**) pleno sol; (**S2**) 70% de luz; (**S3**) 50% de luz; (**S4**) 20% de luz.

Características qualitativas

Picos de florescimento foram observados entre os meses de abril a junho, setembro a novembro e de meados de dezembro a meados de janeiro, principalmente em dias com longo período de estiagem. Apesar disso, o florescimento em ambiente a pleno sol foi o único que ocorreu durante todo o ano. Em ambientes com ocorrência de sombreamento foi observada uma redução expressiva da emissão de botões florais entre meados de novembro a dezembro.

Os híbrdos apresentaram antese diurna, com horário de abertura das flores entre 8h30 min e 13h da tarde. O início do fechamento floral, assim como a abertura, também foi irregular, ocorrendo entre 12h e 15h da tarde. Os caracteres qualitativos relacionados à flor não variaram entre os genótipos. Os primeiros filamentos da coroa apresentam base de coloração branca que se tornam rosadas a um terço do seu comprimento e que se intensificam na extremidade, contrastando com a coloração branca do segundo filamento. Diferente das características florais qualitativas que apresentarem variação irrelevantes em função da luz as características qualitativas referentes à coloração de folha foram diferenciadas entre os

ambientes. Nos ambientes com níveis de luz de 50%, 70% e 100% as folhas de todos os genótipos se apresentaram mais claras, variando em sua grande maioria entre 5GY 4/8, 5GY 5/8, 5GY 5/6, 5GY 7/10 segundo a carta de Munsell (1977). Entretanto, no ambiente com apenas 20% de luz a coloração das folhas variou entre 7.5GY 3/4, 7.5GY 4/4, 7.5GY 4/6 e 7.5GY 4/8. Apesar da variação na coloração das folhas, essa característica não foi determinante para que as plantas analisadas fossem agrupadas distintamente (Figura 9).

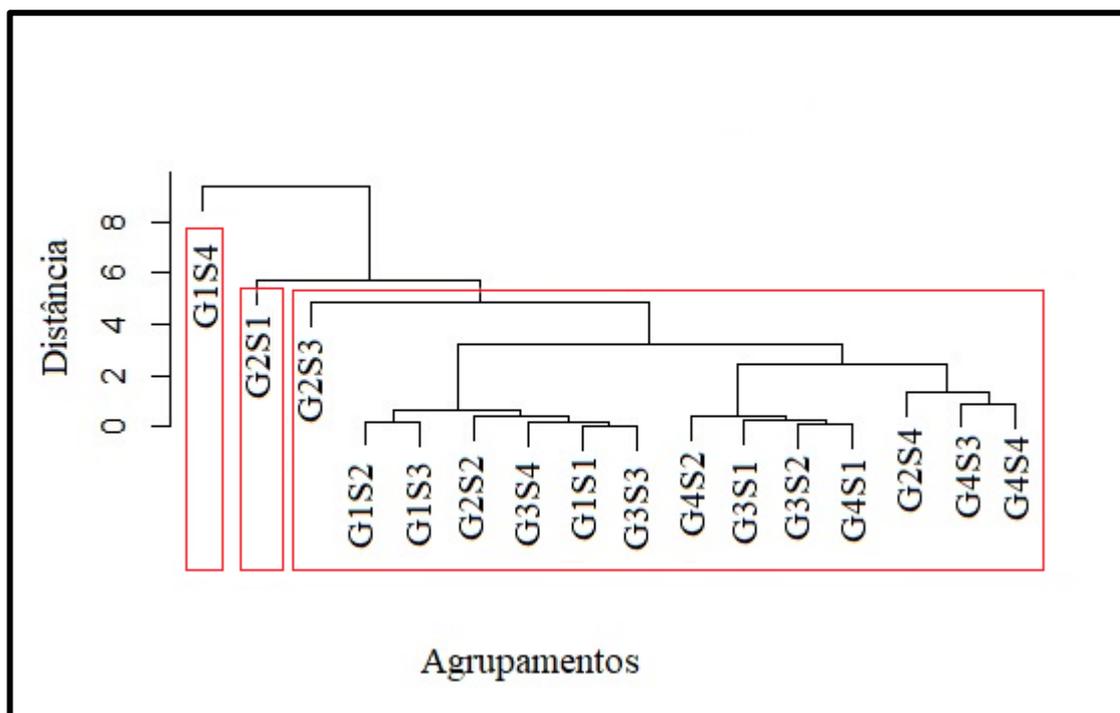


Figura 9. Dendrograma do agrupamento dos genótipos em função das características qualitativas florais e vegetativas submetidos a diferentes condições de luz na progênie de híbridos F₁ HD26 de *Passiflora*. (G1) HD26-102; (G2) HD26-104; (G3) HD26-143; (G4) HD26-146; (S1) 100% de luz (pleno sol); (S2) 70% de luz; (S3) 50% de luz; (S4) 20% de luz.

DISCUSSÃO

As plantas tendem a responder com modificações anatômicas e fisiológicas às mudanças de acordo com níveis de luz aos quais são submetidas (GIVNISH, 1988). Alterações no nível de incidência luminosa resultam principalmente em modificações nas estruturas foliares, arquitetura do caule, acúmulo de biomassa (FRIGERI, 2007) e na taxa fotossintética (GIVNISH, 1988). Nos híbridos HD26, a submissão a diferentes níveis de luz resultou em variações morfológicas diferenciadas nas características florais e vegetativas desses híbridos. Alterações como estas têm sido reportadas em várias espécies de plantas, como resultado da plasticidade fenotípica (YANG et al., 2014).

De forma geral, a plasticidade fenotípica é definida por diversos pesquisadores como a capacidade de um mesmo genótipo apresentar variações nas características morfológicas em função da sua submissão a diferentes condições ambientais (SHLICHTING, 1986; GRATANI, 2014). Plantas submetidas a ambientes com baixos níveis de radiação solar, por exemplo, tendem a apresentar maiores dimensões foliares na tentativa de aumentar o aproveitamento da luz incidente (ALMEIDA et al., 2005). Entretanto, nesse estudo, para os híbridos HD26-102, HD20-143 e HD26-146, a largura de folha, área foliar e profundidade do sinus estavam associadas aos ambientes com taxas de radiação solar moderada a máxima (50-100%). Em algumas espécies a expansão foliar em ambientes com baixa luminosidade é uma adaptação para captação da luz difusa (YANG et al., 2014, MELO JÚNIOR et al., 2017).

Além da expansão dos tecidos foliares, o alongamento do entrenó para muitas espécies, também se mostra responsivo ao índice de luz, servindo como parâmetro na inferência da plasticidade morfológica e anatômica das plantas (SOUZA et al., 2018). A ocorrência de estiolamento em função da deficiência luminosa é uma característica reportada com frequência em trabalhos envolvendo modificações morfofisiológicas em plantas (BERRY; KRESS, 1991). Para algumas espécies de plantas, a ocorrência de entrenós mais alongados pode ser observada em função da restrição luminosa, resultando em plantas com maior comprimento em altura e menos ramos laterais (SALES et al., 2009). Para o híbrido HD26-146, essa característica parece não estar relacionada ao nível de luz, uma vez que o comprimento do entrenó foi associado tanto no ambiente com 20% de luz, quanto no ambiente com luz intensa (70%).

O híbrido HD26-102 demonstrou tendência a ter maior comprimento em altura quando cultivado em condições moderadas de luz (50%). Resultados semelhantes foram obtidos em outros híbridos e em espécies de *Passiflora* cultivadas sobre condições de 50% e 75% de luz (SANTOS et al., 2012). Em *P. subrotunda* Mast. maior comprimento de entrenó foi obtido em ambiente com alta intensidade luminosa (SOUZA et al., 2018). Por outro lado, para obtenção de plantas com maior comprimento em altura, o híbrido HD26-104 deve ser cultivado sobre intensidade luminosa reduzida (20% de luz). Da mesma forma, outras espécies de maracujazeiro também demonstram apresentar maior alongamento do entrenó em ambientes com 20 % de luz (ZANELLA et al., 2006).

Plantas cultivadas em ambientes poucos iluminados tendem a se desenvolver verticalmente em busca de luz e investir fotoassimilados no crescimento em altura em detrimento à produção de ramos laterais (SALES et al., 2009). Para os híbridos HD26-102 e HD26-143 o maior diâmetro do caule nos ambientes com 50 e 70% corrobora os resultados

obtidos para outros híbridos (SANTOS et al., 2012) e espécies de *Passiflora* (PIRES et al., 2012) e podem ser explicados pelo maior armazenamento de reservas (carboidratos) no tecido cambial das plantas (PAIVA et al., 2003).

Além de respostas nas características quantitativas, alterações nas características qualitativas também podem ser observadas em plantas como consequência da maior ou menor disponibilidade luminosa. O aumento na produção de moléculas de clorofila é uma característica comum em muitas plantas submetidas a baixos níveis de luz, sendo considerada uma estratégia de potencialização da captura da luz difusa e manutenção da taxa fotossintética (TAIZ; ZEIGER, 2013). Mudanças de jequitibá-rosa (*Cariniana legalis* Mart Kuntze) e macacaporanga (*Aniba parviflora* Meisn), por exemplo, apresentaram maiores taxas de clorofila a e b quando submetidas a ambientes menos iluminados (REGO; POSSAMAI, 2006; FELSEMBURGH et al., 2016). Resultados semelhantes foram observados em macieiras (Maxi Gala e Fuji kiku) em função da redução da radiação fotossinteticamente ativa (VILVERT et al., 2018). Esse aumento no número de moléculas de clorofila, geralmente resulta em aumento na intensidade da coloração verde nas folhas (TAIZ; ZEIGER, 2013), o que pode ter sido a razão para a ocorrência de folhas mais escuras nos híbridos HD26 submetidos a ambientes menos iluminados (20% de luz) analisados nesse estudo.

Com relação às características florais, as melhores condições de cultivo variaram em função da característica e do híbrido avaliado. Para as características largura da pétala e largura da sépala o híbrido HD26-146 mostrou-se não responsivo a ambientes com 50%, 70% de luz ou pleno sol, podendo ser cultivado em qualquer um desses ambientes quando for desejada a obtenção de flores com essas peças florais mais largas e com maiores dimensões. Contrastando com esse resultado, o híbrido HD26-104 apresentou elementos florais mais largos quando submetidos a níveis de luz de 20% e 50%. No entanto, para todas as outras características avaliadas nesse híbrido o índice de luz pareceu não atuar de forma efetiva. Para o híbrido HD26-143, quando se deseja obter flores com maior diâmetro e maior corona, valores não significativos podem ser obtidos em ambientes mais iluminados.

Uma corona com segundo filamento maior também pode ser obtida para o híbrido HD26-102 quando submetido às mesmas condições do híbrido HD26-143. Em *P. sobrotunda*, essas características demonstram apresentar maior uniformidade, pois para essa espécie, flores maiores e aumento na taxa de florescimento foram obtidos em ambientes com níveis de luz que variam de 25 a 50%. (SOUZA et al., 2018). A pouca influência ambiental em alguns parâmetros florais resulta da alta taxa de herdabilidade dessas características em função da sua determinação por poucos genes e caracteriza-se como uma característica importante na seleção

(MELO et al., 2016) e descrição morfológica de diferentes genótipos (BENTO et al., 2007), uma vez que são expressas independente das condições ambientais (FREITAS et al., 2016). Diferente das características vegetativas, as quais possuem grande influência ambiental e pouca herdabilidade, as características florais são parâmetros confiáveis e recomendáveis para seleção de genótipos de interesse ornamental (BELO, 2010; MELO, et al., 2016; SANTOS et al., 2011).

Híbridos HD13 de *Passiflora* apresentaram maior intensidade de florescimento em ambiente com 70% de luz (SANTOS et al., 2012). Para os híbridos HD26 condição de pleno sol promoveram o desenvolvimento antecipado e o florescimento em todos os indivíduos, ao passo que para muitos indivíduos submetidos a condições de sombreamento, não houve florescimento e foi observada a ocorrência de retardo no desenvolvimento vegetativo dessas plantas. Maior intensidade de florescimento para esses híbridos também foi observada nos meses mais quentes (entre os meses de abril a junho, de setembro a novembro e de meados de dezembro a meados de janeiro), demonstrando a importância da luz no florescimento. Em híbridos F₁ oriundos do cruzamento *P. subblanceolata* (Killip) J.M vs. *P. foetida* var. *foetida* L. a luz também foi determinante no florescimento. Para o híbrido BRS Platina a precocidade no florescimento foi obtida em ambientes com 50% de luz (ROMANO et al., 2013).

As características florais qualitativas não apresentaram variações em função do índice de luz, corroborando os resultados obtidos para *P. subrotundra* Mast. (SOUZA et al., 2018). A pouca influência das condições ambientais nas características qualitativas das plantas, resulta da ação de um número limitado de genes, os quais sofrem pouca influência de características inerentes ao ambiente (SILVA, 2005), em função herança gênica (LAWINSCKY, 2010).

CONCLUSÕES

Os híbridos HD26 não sofrem influência igualitária nas características vegetativas e florais quando submetidos a diferentes índices de luminosidade.

Para maioria das características morfológicas analisadas houve melhor desenvolvimento vegetativo dos híbridos cultivados em ambiente a pleno sol. Dessa forma, para fins ornamentais, esses híbridos devem ser preferencialmente cultivados em ambientes externos. Maior intensidade, precocidade e regularidade no florescimento também são

favorecidas em ambientes com nível máximo de iluminação. Para todos os genótipos, as diferenças na intensidade luminosa não afetam as características florais qualitativas.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à UESC, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro à pesquisa; FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelas bolsas concedidas ao primeiro autor; CNPq pela bolsa concedida ao segundo autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA Z. S. M.; SOARES, A. M.; CASTRO, E. M.; VIEIRA, C. V.; BORDIGNON G. E. (Alterações morfológicas e alocação de biomassa em plantas jovens de espécies florestais sob diferentes condições de sombreamento. **Ciência rural**, v. 35, p.62-68, n. 1, 2005.

AGUIAR, F. F. A.; KANASHIRO, S.; TAVARES, A. R.; NASCIMENTO, T. D. R. Crescimento de mudas de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.), submetidas a cinco níveis de sombreamento. **Revista Ceres**, v. 58, p. 729-734, n. 6, 2011.

ANJOS, A. B.; FREITAS, G. A.; SILVA, R. R.; NOGUEIRA, A. M.; FARIA, Á. J. G. Desenvolvimento inicial de mudas de *Plathymenia foliolosa* Benth. Sob influência de sombreamento. **Gaia Scientia**, v. 12, p. 134-143, n. 2, 2018.

BENTO, C. S.; SUDRE, C. P.; RODRIGUES, R.; RIVA, E. M.; PEREIRA, M. G. Descritores qualitativos e multicategóricos na estimativa da variabilidade fenotípica entre acessos de pimentas. **Scientia Agraria**, v. 8, p. 149-156, 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, Gustavo; MORAES, Miguel Avila. Livro vermelho da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 830-834, 2013.

BERNACCI, L. C.; SOARES-SCOTT, M. D.; JUNQUEIRA, N. T. V.; PASSOS, I. R. S.; MELETTI, L. M. M. *Passiflora edulis* SIMS: The correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 2, p. 566-576, 2008.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; PASSOS, I. D. S.; JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**, v. 1, p. 559-586, 2005.

BERNACCI, L.C.; SOUZA, M. M. *Passiflora cacao* (Passifloraceae), a new species from Southern Bahia, Brazil. **Novon** (Saint Louis, Mo.), v. 22, p. 1-7, 2012.

BERRY, F.; KRESS, W. J. **Heliconia: an identification guide**. Washington: Smithsonian Institution Press 334p.-illus., col. illus. ISBN, 1991.

CERVI, A C. **Passifloraceae do Brasil: estudo do gênero Passiflora L., subgênero Passiflora**. Cyanus, 1997.

CERVI, A. C.; IMIG, D. C. A new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso do Sul, Brazil. V. 103, p. 46-50, 2013.

CHAZDON, R.L.; PEARCY, R.W.; LEE, D.W.; FETCHER, N. Photosynthetic responses of tropical forest plants to contrasting light environments. In: MULKEY, S.S.; CHAZDON, R.L.; SMITH, A.P. (Eds.) **Tropical Forest Plant Ecophysiology**. New York: Chapman and Hall, p. 5-55, 1996.

COLE-RODGERS, P.; SMITH, D. W.; BOSLAND, P. W. A novel statistical approach to analyze genetic resource evaluations using *Capsicum* as an example. **Crop Science**, v. 37, p. 1000 - 1002, 1997.

FELSEMBURGH, C. A. A.; SANTOS, K. J.; CAMARGO, P. B.; CARMO, J. B.; TRIBUZY, E. S. Respostas ecofisiológicas de *Aniba parviflora* ao sombreamento. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 87, p. 201-210, 2016.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. A new infrageneric classification of *Passiflora*. **Passiflora**, v. 14, p.1-4, 2004.

FREITAS, J. C. O.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; PAIVA, C. L.; SILVA, F. H. D. L.; AMARAL, A. T.; DIAS, V. M. Resistance to *Fusarium solani* and characterization of hybrids from the cross between *P. mucronata* and *P. edulis*. **Euphytica**, v. 208, n. 3, p. 493-507, 2016.

FRIGERI, R. B. C. **Relação entre raiz e parte aérea de plântulas de espécies arbóreas tropicais sob diferentes níveis de radiação solar**. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, 2007.

GIVNISH, T. J. Adaptation to sun and shade: a whole-plant perspective. **Functional Plant Biology**, v. 15, n. 2, p. 63-92, 1988.

GRATANI, L. Plant phenotypic plasticity in response to environmental factors. **Advances in botany**, v. 2014, p. 1-17, 2014.

HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. **Journal of educational psychology**, v. 24, n. 6, p. 417, 1933.

JESUS, O. N.; OLIVEIRA, E. J.; SOARES, T. L.; FALEIRO, F. G. **Aplicação de descritores morfoagronômicos utilizados em ensaios de DHE de cultivares de maracujazeiro-doce, ornamental, medicinal incluindo espécies silvestres e híbridos interespecíficos: manual prático**. 47 p., Brasília, DF: Embrapa, 2015.

JOHNSON, R. A.; WICHERN, D. W. Multivariate analysis. **Encyclopedia of Statistical Sciences**, v. 8, 2004.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. **R package version**, v. 1, n. 3, 2016.

KING, L. A. Newly-Registered Cultivars to: Winter 2011. **Passiflora**, 1, 16-23, 2011.

LAWINSCKY, P. R. **Caracterização morfológica, reprodutiva e fenológica de *Passiflora alata* CURTIS e *Passiflora cincinnata* MAST**. 2010. 146f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus – Bahia, 2010.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2008. Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de *Passiflora*. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em janeiro de 2019.

MELO, C. A. F.; SOUZA, M. M.; VIANA, A. P.; SANTOS, E. A.; SOUZA, V. O.; CORRÊA, R. X. Morphological characterization and genetic parameter estimation in backcrossed progenies of *Passiflora* L. for ornamental use. **Scientia Horticulturae**, v. 212, p. 91-103, 2016.

MELO JÚNIOR, J. C. F. D.; SILVA, M. M. D.; AMORIM, M. W.; TUSSOLINI, E. G. R. Structural adaptations of seven shade shrubs in species of Tropical Rain Forest. **Hoehnea**, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2017.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; BAUMGRATZ, J. F. A. *Passiflora* L. subgênero Decaloba (DC.) Rchb. (Passifloraceae) na região sudeste do Brasil. **Rodriguésia**, v. 55, n. 85, p. 17-54, 2004.

MORALES, M. M. B.; AGUIRRE-MORALES, C.; CARDENAS, J. *Passiflora creuicaetanae* a new species of *Passiflora* L. supersection Tacsonia (Passifloraceae) from Colombia. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 267-274, 2016.

MUNSELL, COLOR CHARTS. Munsell color charts for plant tissues. New York, 1997

NUNES, T. S., QUEIROZ, L. P. Uma nova espécie de *Passiflora* L. (Passifloraceae) para o Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, Belo Horizonte, v. 21, n. 2, p. 499-502, 2007.

NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P. Flora da Bahia: Passifloraceae. **Sitientibus**, v. 6, n.3, p. 194-226, 2006.

PAIVA, C. L.; GUIMARÃES, R. J.; SOUZA, C. A. S. Influência de diferentes níveis de sombreamento sobre o crescimento de mudas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 134-140, 2003.

PEIXOTO, M. Problemas e perspectivas do maracujá ornamental. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds) **Maracujá germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 458-462, 2005.

PIRES, M. V.; ALMEIDA, A-A. F.; FIGEIREDO, A. L; GOMES, F. P.; SOUZA, M. M. Germination and seedling growth of ornamental species of *Passiflora* under artificial shade. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 34, p.67-75, 2012.

R CORE TEAM R. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2017. URL <https://www.R-project.org/>

REGO, G. M.; POSSAMAI, E. Efeito do Sombreamento sobre o Teor de Clorofila e Crescimento Inicial do Jequitibá-rosa. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 53, p. 179, 2006.

ROMANO, M. R.; SANTOS, D. S.; AMORIM, E. P.; CORDEIRO, Z. J. M. Características morfoagronômicas da BRS Platina sob níveis de sombreamento. In: **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: REUNIÃO INTERNACIONAL ACORBAT, 20., 2013, Fortaleza. Acorbat: 40 anos compartilhando ciência e tecnologia. Fortaleza: Instituto Frutal: Acorbat Internacional, 2013.

SALES, J. F., PINTO, J. E. B. P.; FERRI, P. H.; SILVA, F. G.; OLIVEIRA, C. B. A.; BOTREL, P. P. Influência do nível de irradiância no crescimento, produção e composição química do óleo essencial de hortelã-do-campo (*Hyptis marrubioides* Epl.). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 389-396, 2009.

SANTOS, E. A.; SOUZA, M. M.; VIANA, A. P.; ALMEIDA, A. A. F. D.; ARAÚJO, I. S.; FREITAS, J. C. D. O. Development and bloom in hybrids of wild passion fruit cultivated in different types of pots and shading levels. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 2, p. 126-134, 2012.

SCHLICHTING, C. D. The evolution of phenotypic plasticity in plants. **Annual review of ecology and systematics**, v. 17, n. 1, p. 667-693, 1986.

SILVA, H. T. Descritores mínimos indicados para caracterizar cultivares/variedades de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Embrapa Arroz e Feijão-Documentos (INFOTECA-E)**, 2005.

SOUZA, V. O.; SOUZA, M. M.; ALMEIDA, A. A. F.; BARROSO, J. P.; VIANA, A. P.; MELO, C. A. F. Pre-breeding in *Passiflora subrotunda* Mast.: Morphological and Reproductive Characterization at Different Light Levels. **HortScience**, v. 53, n. 7, p. 949-957, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal (p. 918). **Porto Alegre: Artmed**, 2013.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J.M. **Passiflora- Passionflowers of the world**. Portland: Timber Press. p.430, 2004.

VANDERPLANK J. **Passion Flowers**. The MIT Press, Cambridge. 2000.

VILVERT, J. C.; COLDEBELLA, M. C.; AMARANTE, C. V. T.; FREITAS, D. C. L.; LIMA, L. D.; SCHUERNE, I. D. Efeito do sombreamento causado por telas antigranizo sobre o teor de clorofilas em folhas de macieiras 'Maxi Gala' e 'Fuji Kiku'. **ANAIS DA 14ª MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA-CONGREGA URCAMP-2017**, p. 68-69, 2018.

YANG, S. J.; SUN, M.; ZHANG, Y. J.; COCHARD, H.; CAO, K. F. Strong leaf morphological, anatomical, and physiological responses of a subtropical woody bamboo (*Sinarundinaria nitida*) to contrasting light environments. **Plant Ecology**, v. 215, n. 1, p. 97-109, 2014.

ZANELLA, F.; SONCELA, R.; LIMA, A. L. S. Formação de mudas de maracujazeiro amarelo sob níveis de sombreamento em Ji-Paraná/RO. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 5, p. 880-884, 2006.

CAPÍTULO 4 Manuscrito em formato de artigo científico

ANALISE CITOGENÉTICA EM HÍBRIDOS F₁ DE *Passiflora*

Aline Pinto dos Santos¹, Margarete Magalhães Souza^{1*}, Gonçalo Santos Silva¹, Rita de Cássia Teixeira Moreira¹

¹Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Melhoramento de Plantas, Rod. Jorge Amado, Km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

*Autor correspondente: e-mail: souzamagg@yahoo.com.br (M.M. Souza); Phone/Fax.: +557336805055.

RESUMO

Estudos citogenéticos comparativos entre híbridos e seus genitores é uma importante etapa no entendimento da organização cariotípica. Este estudo teve como objetivo confirmar a hibridação interespecífica em quatro híbridos oriundos do cruzamento entre *P. vitifolia* Kunth vs. *P. hatschbachii* Cervi, e caracterizar o cariótipo tanto dos híbridos quanto dos seus genitores utilizando técnicas de citogenética convencional. A coloração convencional com Giemsa foi usada para análise cariotípica, o bandamento CMA₃/DAPI foi adotado para identificar regiões heterocromáticas base específicas e a GISH foi utilizada para a confirmação da hibridação. A coloração cromossômica com Giemsa, o estudo cariomorfológico comparativo entre as espécies genitoras e os híbridos demonstrou o caráter diploide desses genótipos, $2n = 18$, e a ocorrência predominante de cromossomos metacêntricos em todos os genótipos. Foram observadas variações no comprimento cromossômico médio entre os genótipos com efeito significativo pela ANOVA. A localização de satélites nos cromossomos pela coloração convencional não foi precisa, contudo a partir da dupla coloração CMA₃/DAPI foi possível determinar a ocorrência de dois pares de satélites tanto nos genitores quanto nos híbridos. Mediante GISH, foi possível a diferenciação genômica com a utilização simultânea das sondas dos genitores na progênie híbrida F₁, permitindo a distinção de dois lotes cromossômicos nos híbridos, confirmando o caráter híbrido das plantas, sendo essa ferramenta confiável e segura para confirmação da hibridação.

Nesse contexto, a coloração com CMA₃/DAPI e a aplicação GISH além de permitirem a confirmação da hibridação, também demonstraram ausência de alterações cromossômica e a estabilidade citogenética dos híbridos.

Palavras-Chave: bandamento CMA₃/DAPI, cariomorfologia, coloração convencional, GISH, híbridos interespecíficos.

ABSTRACT

Comparative cytogenetic studies between the hybrids and their parents are an important step in the understanding karyotype organization. This study aimed to confirm interspecific hybridization in hybrids from the cross between *P. vitifolia* Kunth and *P. hatschbachii* Cervi and characterize the karyotype of the hybrids and their parents using conventional cytogenetic techniques. Conventional staining with Giemsa was used for karyotypic analysis, CMA3 / DAPI banding was adopted to identify specific heterochromatic regions and GISH was used for confirming hybridization. Through chromosome staining with Giemsa, the comparative cariomorphological study between the genitor species and the hybrids demonstrated the diploid character of these genotypes, $2n = 18$, and the predominant occurrence of metacentric chromosomes in all genotypes. Significant variations in the mean chromosome size were observed among different genotypes by ANOVA test. The location of satellites on the chromosomes by conventional staining was not accurate, however, with the double CMA3 / DAPI staining, it was possible to determine the occurrence of two satellite pairs in both the parents and the hybrids. From GISH, genomic differentiation was possible with the simultaneous use of the probes of the parents in the F1 hybrid progeny, allowing the distinction of two chromosome sets in the hybrids, thus confirming the hybrid character of the plants, being this reliable and safe tool for confirmation of the hybridization. In this context, the staining with CMA3 / DAPI and the GISH application, besides confirming hybridization, also demonstrated the absence of chromosomal alterations and cytogenetic stability in the hybrids.

Key-words: cariomorphology, CMA₃/DAPI banding, conventional staining, GISH, interspecific hybrids.

INTRODUÇÃO

Dentre os gêneros que compõem a família Passifloraceae, o gênero *Passiflora* é considerado o mais importante por englobar uma grande variedade de espécies (CERVI; IMIG, 2013), com ampla distribuição geográfica nas regiões neotropicais (ULMER; MACDOUGAL, 2004). O amplo número de espécies dentro desse gênero resulta em plantas que apresentam formato e coloração floral diversificadas e que têm despertado o interesse crescente do segmento ornamental (ABREU et al., 2009), o qual vislumbra a utilização de passifloras para decoração de ambientes internos e externos.

No Brasil, o uso de passifloras para ornamentação ainda é incipiente, entretanto, em alguns países da Ásia, Europa e nos Estados Unidos, a sua utilização para fins ornamentais já vem sendo relatada há alguns anos (RUSHING, 2003; ULMER; MACDOUGAL, 2004; VANDERPLANK, 2000). Além da utilização de espécies, a obtenção e utilização de híbridos de *Passiflora* vêm ganhando cada vez mais incentivo através da ampliação de Programas de Melhoramento, que visam à indução da hibridação interespecífica. Ao longo dos últimos 10 anos, diversos cruzamentos envolvendo passifloras já foram realizados, a citar os cruzamentos envolvendo *P. mucronata* Lam., *P. setacea* D.C., *P. coccinea* Aubl., *P. alata* Curtis, *P. caerulea* L., *P. edulis* Sims., *P. glandulosa* Cav. e *P. galbana* Mast. (FALEIRO et al., 2008). Alguns cruzamentos resultaram em híbridos ornamentais promissores, como o híbrido BRS Estrela-do-Cerrado (*P. coccinea* vs. *P. setacea*) (FALEIRO et al., 2007a) e os híbridos retrocruzados BRS Roseflora (*[P. coccinea* vs. *P. setacea]* vs. *P. setacea*) (JUNQUEIRA et al., 2007) e BRS Rubiflora (*[P. coccinea* vs. *P. setacea]* x *P. coccinea*) (FALEIRO et al., 2007b). Além desses híbridos outras cultivares híbridas como *P.* ‘Aninha’, *P.* ‘Priscilla’, *P.* ‘Alva’ (SANTOS et al., 2012), *P.* ‘Bella’, *P.* ‘Gabriela’ (BELO et al., 2018), *P.* ‘Leonel’s e *P.* ‘Vitalli’ (SANCHÊS, 2018), também são relatados como híbridos ornamentais promissores.

Paralela à descoberta de novas espécies e a obtenção de híbridos, a investigação das características cariotípicas das passifloras têm recebido um importante enfoque para o entendimento de padrões cromossômicos e evolutivos (VIANA; SOUZA, 2012). Técnicas clássicas de citogenética, como a coloração convencional, possibilitam o conhecimento morfológico e numérico dos cromossomos, tanto em espécies quanto em híbridos (MELO, et al., 2011). Estudos citogenéticos em passifloras relatam a característica diplóide dessas espécies, com a ocorrência de indivíduos $2n=12$, $2n=18$, $2n=22$ e $2n=24$ (MELO et al., 2001; SOUZA et al., 2008). Estas variações estão relacionadas aos subgêneros aos quais cada

espécie é pertencente (MELO et al. 2001; SOUZA et al. 2008) e encontram na citogenética o suporte para o entendimento dos processos evolutivos sofridos pelas passifloras (HANSEN et al., 2006; MELO et al., 2001).

Em híbridos, a aplicação de citogenética clássica permite a caracterização cariomorfológica comparativa aos pais, além de auxiliar na confirmação da natureza híbrida dos indivíduos (ORTOLONI et al., 2007; COELHO et al., 2016). Regiões heterocromáticas, ricas em GC, que em *Passiflora* colocaliza com os satélites (constrições secundárias) e podem ser diferenciadas com fluorocromos CMA₃ (cromomicina A₃) e DAPI (4', 6- diamidino-2-fenilindole) demonstrando regiões de ocorrência da heterocromatina constitutiva e de constrição secundária (MELO et al., 2014).

A GISH (Genomic *in situ* hybridization) em *Passiflora* possibilita a comparação cromossômica entre diferentes espécies, entre diferentes indivíduos e entre híbridos inter e intraespecíficos. Além disso, a aplicação de GISH têm permitido a confirmação confiável da paternidade em híbridos (COELHO et al., 2016; MELO et al., 2017; SILVA et al., 2018), sejam estes naturais ou artificiais (SILVA; SOUZA, 2013). Paralela à confirmação da hibridação, a visualização de recombinações cromossômicas em híbridos retrocruzados também se constitui uma análise cariotípica importante possibilitado pela GISH (MELO et al., 2015).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização cariomorfológica e aplicar a bandamento CMA₃/DAPI para verificar as regiões ricas em GC referentes à satélites e realizar a confirmação da hibridação de híbridos F₁ de *Passiflora* através de GISH.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As espécies genitoras *P. vitifolia* Kunt. (acesso 481) e *P. hatschbachii* Cervi (acesso 446) e quatro híbridos cuja progênie foi denominada HD26 (HD26-102, HD26-104, HD20-143 e HD26-146) foram analisados. As plantas genitoras foram mantidas em cultivo protegido no mantido no Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia (longitude 39 ° 10'W, latitude 14 ° 39'S, altitude 78m), no sistema espaldeira, em casa de vegetação tipo semi-arco, com cobertura plástica de 100µm de espessura, ativada contra os raios UV. Os híbridos foram mantidos a campo também no sistema de espaldeira.

Preparo das Lâminas

Com auxílio de pinça, radículas proveniente de estacas foram coletadas de pré-tratadas com solução antimitótica de 8-hidroxiquinolina (Merck®) a 0,002 M por 1 hora em temperatura ambiente (TA) e por mais 21 horas em geladeira (8-10 °C), lavadas com água destilada durante 5 min, fixadas em Carnoy (etanol:ácido acético glacial, 3:1 (v/v), (Merck®) (JOHANSEN, 1940) durante 3 horas em TA e estocadas a -20 °C até a preparação das lâminas. As raízes foram lavadas em água destilada durante 5 min por 2x e incubadas em 50 µL de solução enzimática contendo celulase a 2% (Sigma®) e pectinase a 20% (Sigma®) por 1 hora e 20 min a 37 °C. As raízes foram lavadas com água destilada e maceradas com o auxílio de agulhas em 15 µL de ácido acético glacial a 45% (Merck®). O material citológico foi coberto com lamínula de vidro (18 x 18 mm), espalhado com auxílio de agulha de ponta grossa e pressionado levemente com os dedos entre papel filtro para espalhamento dos cromossomos. As lamínulas foram removidas após congelamento em nitrogênio líquido e as lâminas secas ao ar. Após secagem as lâminas foram armazenadas a -20°C até coloração com Giemsa, aplicação do CMA₃/DAPI e realização da GISH.

Coloração com Giemsa e análise cariomorfológica

A coloração das lâminas foi realizada com base no protocolo proposto por Guerra e Souza (2002), com modificações. O material foi corado com Giemsa 4% (Merck®) por 40 min, lavado em água destilada e seco ao ar. A montagem foi realizada com lamínula 20 x 20 mm em meio Neomount (Merck®).

Cinco metáfases de cada genótipo foram utilizadas para a obtenção dos dados cariomorfológicos. Valores absolutos foram obtidos para o comprimento do braço curto (BC), braço longo (BL) e satélites (SAT), sendo adicionado o comprimento dos satélites ao comprimento do braço cromossômico correspondente. Foram calculados a razão entre braços ($r = BL/BC$) e o comprimento total dos cromossomos ($CT = BL + BC + SAT$).

Para realização da análise estatística, foram calculadas as médias dos 18 cromossomos das cinco metáfases de cada genótipo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias entre os genótipos em relação ao comprimento total dos cromossomos foram comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Foi utilizado o software Sisvar versão 5.0 (FERREIRA, 2003).

Coloração com Fluorocromos CMA₃ e DAPI

Lâminas envelhecidas por no mínimo três dias foram submetidas à dupla coloração CMA₃/ (DAPI de acordo com o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002)). Foram aplicados 15 µL de CMA₃ (0,25 mg/ml) sobre cada lâmina e o material foi coberto com lamínula de vidro. As lâminas permaneceram por 1 hora em câmara úmida a 37 °C. Um jato de água destilada foi aplicado sobre cada lâmina para remoção da lamínula e as lâminas foram secas com bomba de ar. Após secagem foram aplicados, em cada lâmina, 15 µL de DAPI (0.5 mg/ml). O material foi coberto com lamínula de vidro e mantido em caixa escura por 30 min. As lamínulas foram removidas com um jato de água destilada e as lâminas secas com bomba de ar. A montagem das lâminas foi realizada com a aplicação de 15 µL glicerol/MacIlvaine (1:1 v/v) e coberta com lamínula 20 x 20 mm. As lâminas foram envelhecidas no escuro por mais três dias antes da análise microscópica.

Extração e fragmentação do DNA para GISH

A extração do DNA genômico de *P. vitifolia* e *P. hatschbachii* seguiu o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990), com algumas modificações (MELO et al., 2015). Folhas jovens, coletadas em duplicata, foram maceradas em nitrogênio líquido e colocadas em tampão de extração CTAB 2% [NaCl a 1,5 M (Sigma®); EDTA (USB) a 20 mM; Tris-HCl (Sigma®) a 100 mM; B-Mercaptoetanol (Sigma®) a 0,2%]. Os ácidos nucleicos foram isolados com solução clorofórmio:álcool isoamílico (Merck) (24:1) e a ressuspensão do DNA foi realizada em tampão TE [Tris (Promega) a 10 mM; EDTA a 1 mM]. A concentração do DNA genômico extraído foi inferida com base na comparação com 100 ng de DNA lambda (New England Biolabs) em eletroforese em gel de agarose 1% (Pronadisa), corado com SYBR safe (Invitrogen®). Aproximadamente 30 µg de DNA genômico dos genitores em um volume final de 1000 µL foram fragmentados com o auxílio de um sonicador (Qsonica, Q125), com a programação para a amplitude 40%, 2 segundos *on* e 2 segundos *off* por 5 minutos (JAUHAR; PETERSON, 2006). O tamanho dos fragmentos foi verificado em gel de agarose 2% utilizando como parâmetro o marcador ladder 100 pb (NEB, new england biolabs). Foi realizada a purificação do DNA fragmentado com 10% do volume final de acetato de sódio a 3 M e 200% do volume final de etanol. O material foi colocado a -20 °C *overnight* e, no dia seguinte, centrifugado por 10 min a 14.000 rpm para a eliminação do sobrenadante e posterior secagem em TA por no mínimo 1 hora. Para ressuspensão do pellet foram adicionados 120 µL de água ultrapura no tubo, em seguida a amostra foi armazenada a ± 8° C e no dia seguinte armazenadas -20 °C até a confecção das sondas.

Preparação das sondas para GISH

O DNA genômico de *P. vitifolia* foi marcado com Digoxigenina-11-dUTP (Roche Diagnostics®) e o DNA genômico de *P. hatschbachii* foi marcado com Biotina-16-dUTP (Roche Diagnostics®). A marcação das sondas foi realizada via *Nick Translation* na concentração final de 1 µg de DNA clivado, seguindo o protocolo proposto pelo fabricante. As amostras foram colocadas em termociclador programado para 90 minutos de amplificação. Foram adicionados em cada amostra 2 µL de acetato de sódio (10% do total da reação) (Sigma®) e 40 µL de etanol 100% (o dobro do total da reação) (Sigma®) para a purificação das sondas. O material foi armazenado *overnight* - 20 °C e no dia seguinte centrifugado por 10 min a uma velocidade de 13.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet seco a TA por no mínimo 1 hora. A ressuspensão do pellet foi realizada adicionando-se ao todo 30 µL de água ultrapura. O material foi mantido na geladeira ± 8 °C por 24 horas e posteriormente armazenado no freezer (- 20 °C) até o uso.

Aplicação da GISH

Para a GISH, lâminas foram tratadas seguindo o protocolo proposto por Schwarzacher e Heslop-Harrison (2000), com modificações propostas por Melo et al., (2015). Lâminas contendo metáfases completas e com bom padrão de condensação foram selecionadas e secas em estufa a 37 °C (Nova Etica, 403-5N) durante 1 hora. Foram aplicados 50 µl de solução de RNase (Sigma®) sobre cada lâmina, o material foi coberto com lamínula plástica e encubado por 1 hora a 37 °C em câmara úmida pré-aquecida. Seguiram-se duas lavagens em 2x SSC (cloreto de sódio [Sigma®] a 0,3 M; citrato de sódio [Sigma®] a 0,03 M) em TA por 5 min cada, sob agitação - todas etapas de lavagem mencionadas abaixo foram realizadas em uma plataforma agitadora a 120 rpm (Biomixer, Mos-1). 50 µl de HCl (ácido clorídrico - Vetec) 10 mM foi adicionado sobre cada lâmina, o material foi coberto com lâmina plástica e colocado em repouso por 5 min. Removido o excesso de HCl, foi adicionado 50 µl de solução de pepsina (Sigma®) (pepsina a 10 mg/mL; HCl a 10 mM [1:100 v/v]) em cada lâmina e coberto com lamínula plástica. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 min a 37 °C e lavadas em 2x SSC em TA, duas vezes, por 5 min cada. Posteriormente, as lâminas foram imersas em paraformaldeído (Sigma®) a 4% em TA por 10 min e lavadas duas vezes em 2x SSC por 5 min cada. As lâminas foram consecutivamente desidratadas com etanol (Merck) 70% e etanol 96% por 5 min cada e secas em TA por pelo menos 30 min. Após secagem foi aplicada a mistura de hibridação sobre as lâminas. Para cada lâmina o mix de hibridação foi composto por: 7,5 µl de formamida 100% (Sigma), 3,0 µl de dextran 50% (Sigma), 1,5 µl de

20x SSC, 0,2 µl de SDS (*Sodium dodecyl sulfate*) (Bioagency), e 1,4 µl de cada sonda. Previamente à aplicação nas lâminas, o mix de hibridação foi aquecido a 75 °C por 10 min em termociclador (Eppendorf, Mastercycler) e imediatamente resfriado em gelo por 5 min. O material citológico contendo a mistura de hibridação foi desnaturado em termociclador (Techne, TC412) com adaptador para lâminas a 75 °C por 10 min e incubadas *overnight* a 37 °C em câmara úmida. Após a hibridação as lâminas foram imersas em 2x SSC em TA por 5 min para a remoção das lamínulas. Foram realizados em banhos pós-hibridação: dois banhos em 2x SSC a 42 °C por 5 min cada, dois banhos em 0,1x SSC a 42 °C por 5 min cada e mais dois banhos em 2x SSC 42 °C por 5 min cada. Posteriormente, as lâminas foram lavadas uma vez em 4x SSC/Tween 20 a 0,2% (Sigma®) em TA por 5 min e tratadas com 50 µl de BSA (*bovine serum albumin*) (Sigma®) a 5%. Para detecção, foi aplicado em cada lâmina 20 µl de uma solução contendo 0,7 µl de avidina-FITC (Vector), 0,7 µL de anti-digoxigenina-Rodamina (Roche®) e 18,6 µL BSA 5%. As lâminas contendo os anticorpos de detecção foram incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37 °C. Três banhos de 5 min cada foram realizados com 4x SSC/Tween 20 a 0,2% para retirada do excesso de anticorpos. Para finalizar, as lâminas foram rapidamente imersas em 2x SSC e contracoradas com DAPI/Vectashield® (H-1200). As lâminas foram cobertas com lamínulas de vidro de 20 x 20 mm e estocadas no escuro a ± 8 - 10 °C para posterior análise.

Fotodocumentação

As metáfases coradas com Giemsa foram fotografadas utilizando microscópio de luz (Olympus BX41) equipado com câmera digital de 5M Olympus DP25 pelo software DP2-BSW. As metáfases coradas com CMA₃/DAPI foram fotografadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX41). Para visualização do DAPI foi utilizado o filtro U-MWU (330-385 nm de excitação/400 nm de emissão de corte dicróico/>420 nm) e para visualização do CMA₃ foi utilizado o filtro U-MWB (450-480 nm de excitação/500 nm de emissão de corte dicróico/>515 nm). Na GISH, as metáfases foram fotografadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BX41) equipado com uma câmera digital Olympus DP25 de 5M e pelo software DP2-BSW. As hibridações detectadas com avidina-FITC foram visualizadas com o uso do filtro U-MWB (450-480 nm de excitação/500 nm de emissão de corte dicróico/>515 nm) e as hibridações detectadas com anti-digoxigenina-rodamina foram visualizadas com o filtro U-MWG (510-550 nm de excitação/ 570 nm de emissão de corte dicróico / > 590 nm). A confecção das pranchas e sobreposições CMA₃/DAPI e FITC/rodamina foram realizadas com o uso do software photoshop SC5.

RESULTADOS

Coloração convencional

O número cromossômico diploide $2n = 18$ foi observado tanto nas espécies genitoras, *P. vitifolia* e *P. hatschbachii*, quanto nos híbridos interespecíficos HD26-102, HD26-104, HD26-143 e HD26-146 (Figura 1).

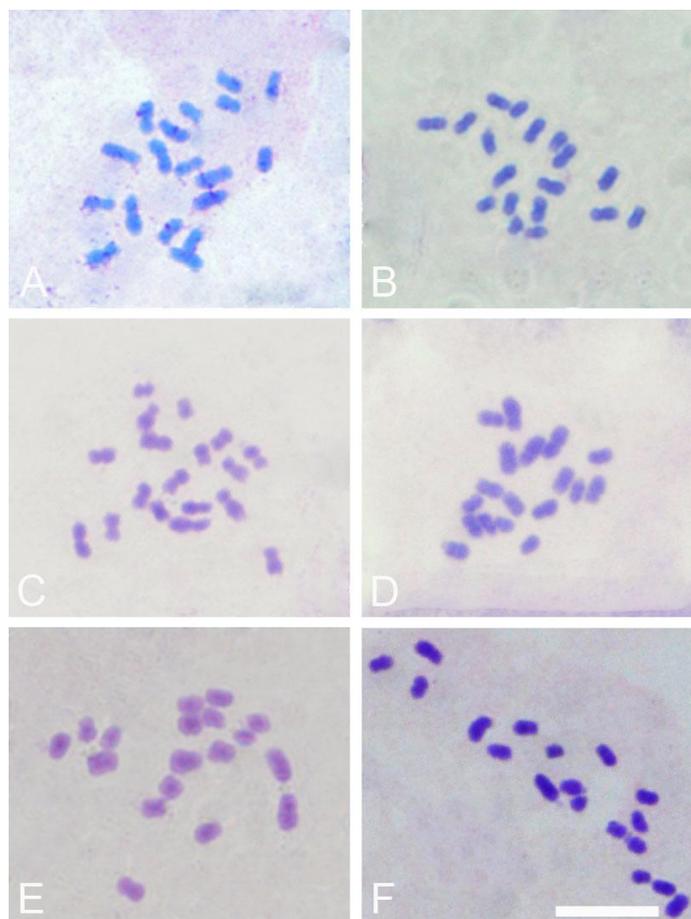


Figura 1. Metáfases mitóticas de genitores e híbridos interespecíficos F_1 (HD26) de *Passiflora* ($2n = 18$). (A) *P. vitifolia*; (B) *P. hatschbachii*; (C) HD26-102; (D) HD26-104; (E) HD26-143; (F) HD26-146. Barra = $10\mu\text{m}$.

Seguindo a classificação proposta por (GUERRA et al., 1986) a morfologia cromossômica dos genitores *P. vitifolia*, *P. hatschbachii* e dos quatro híbridos analisados foi em sua maioria metacêntrica, $2n = 18m$ (Tabela 1). O comprimento médio dos cromossomos de *P. vitifolia* e *P. hatschbachii* varia entre 2.08 a 4.12 μm e entre 1.8 a 3.5 μm , respectivamente. Observou-se comprimentos médios cromossômicos que variaram entre 1.67 μm a 4.14 μm para HD26 102, 1.58 μm a 3.92 μm para HD26104, 1.55 μm a 3.41 μm para HD26 143 e entre 1.55 μm a 3.55 μm para o híbrido HD 26 146. Para esses híbridos a

determinação do lote haplóide não foi realizada, uma vez que os cromossomos desses genótipos são homeólogos.

Tabela 1. Dados cariomorfológicos de *P. vitifolia*, *P. hatschbachii* e híbridos HD26

| <i>Passiflora vitifolia</i> | | | | | | |
|--------------------------------|------|------|------|------|-------|----|
| Par cromossômico | BL | BC | SAT | CT | BL/BC | TC |
| 1 | 2.40 | 1.73 | | 4.12 | 1.39 | M |
| 2 | 2.13 | 1.53 | | 3.65 | 1.39 | M |
| 3 | 1.93 | 1.35 | | 3.28 | 1.42 | M |
| 4 | 1.78 | 1.27 | | 3.05 | 1.40 | M |
| 5 | 1.67 | 1.19 | 0.61 | 2.86 | 1.40 | M |
| 6 | 1.56 | 1.14 | 0.64 | 2.69 | 1.37 | M |
| 7 | 1.50 | 1.07 | | 2.57 | 1.40 | M |
| 8 | 1.35 | 1.00 | | 2.35 | 1.35 | M |
| 9 | 1.19 | 0.90 | | 2.08 | 1.33 | M |
| <i>Passiflora hatschbachii</i> | | | | | | |
| Par cromossômico | BL | BC | SAT | CT | BL/BC | TC |
| 1 | 1.74 | 1.26 | 0.46 | 3.46 | 1.38 | M |
| 2 | 1.58 | 1.23 | 0.45 | 3.26 | 1.29 | M |
| 3 | 1.53 | 1.16 | | 2.69 | 1.32 | M |
| 4 | 1.42 | 1.08 | | 2.5 | 1.32 | M |
| 5 | 1.32 | 1.07 | | 2.38 | 1.23 | M |
| 6 | 1.29 | 1.01 | | 2.3 | 1.29 | M |
| 7 | 1.25 | 0.90 | | 2.16 | 1.39 | M |
| 8 | 1.24 | 0.82 | | 2.06 | 1.50 | SM |
| 9 | 1.02 | 0.76 | | 1.78 | 1.33 | M |
| HD26-102 | | | | | | |
| Cromossomo | BL | BC | SAT | CT | BL/BC | TC |
| 1 | 2.43 | 1.73 | 0.51 | 4.14 | 1.40 | M |
| 2 | 2.19 | 1.61 | | 3.80 | 1.35 | M |
| 3 | 1.98 | 1.34 | | 3.32 | 1.48 | M |
| 4 | 1.78 | 1.31 | | 3.09 | 1.36 | M |
| 5 | 1.72 | 1.29 | | 3.00 | 1.34 | M |
| 6 | 1.73 | 1.24 | | 2.97 | 1.39 | M |
| 7 | 1.74 | 1.23 | | 2.96 | 1.41 | M |
| 8 | 1.59 | 1.18 | | 2.76 | 1.34 | M |
| 9 | 1.52 | 1.12 | | 2.64 | 1.35 | M |
| 10 | 1.48 | 1.09 | | 2.57 | 1.36 | M |
| 11 | 1.43 | 1.06 | | 2.49 | 1.34 | M |
| 12 | 1.38 | 1.02 | | 2.39 | 1.35 | M |
| 13 | 1.31 | 0.98 | | 2.29 | 1.34 | M |
| 14 | 1.29 | 0.97 | | 2.26 | 1.33 | M |
| 15 | 1.23 | 0.88 | | 2.10 | 1.41 | M |
| 16 | 1.20 | 0.84 | | 2.04 | 1.43 | M |
| 17 | 1.13 | 0.79 | | 1.92 | 1.43 | M |
| 18 | 1.02 | 0.65 | | 1.67 | 1.56 | SM |
| HD26-104 | | | | | | |
| Cromossomo | BL | BC | SAT | CT | BL/BC | TC |

| | | | | | | |
|----|------|------|------|------|------|---|
| 1 | 2.22 | 1.70 | | 3.92 | 1.31 | M |
| 2 | 1.98 | 1.41 | 0.46 | 3.85 | 1.40 | M |
| 3 | 1.88 | 1.29 | | 3.16 | 1.46 | M |
| 4 | 1.74 | 1.24 | | 2.97 | 1.40 | M |
| 5 | 1.61 | 1.22 | | 2.82 | 1.32 | M |
| 6 | 1.51 | 1.17 | | 2.68 | 1.29 | M |
| 7 | 1.46 | 1.14 | | 2.59 | 1.28 | M |
| 8 | 1.42 | 1.10 | | 2.51 | 1.29 | M |
| 9 | 1.36 | 1.09 | | 2.44 | 1.25 | M |
| 10 | 1.32 | 1.05 | | 2.36 | 1.26 | M |
| 11 | 1.28 | 1.03 | | 2.31 | 1.24 | M |
| 12 | 1.26 | 1.01 | | 2.26 | 1.25 | M |
| 13 | 1.20 | 0.98 | | 2.18 | 1.22 | M |
| 14 | 1.17 | 0.94 | | 2.11 | 1.24 | M |
| 15 | 1.08 | 0.90 | | 1.98 | 1.20 | M |
| 16 | 1.01 | 0.81 | | 1.82 | 1.24 | M |
| 17 | 0.98 | 0.75 | | 1.72 | 1.30 | M |
| 18 | 0.86 | 0.72 | | 1.58 | 1.19 | M |

| HD26-143 | | | | | | |
|-------------------|-----------|-----------|------------|-----------|--------------|-----------|
| Cromossomo | BL | BC | SAT | CT | BL/BC | TC |
| 1 | 1.98 | 1.43 | 0.55 | 3.41 | 1.38 | M |
| 2 | 1.76 | 1.22 | | 2.98 | 1.44 | M |
| 3 | 1.67 | 1.18 | | 2.92 | 1.42 | M |
| 4 | 1.56 | 1.14 | | 2.70 | 1.37 | M |
| 5 | 1.47 | 1.08 | | 2.55 | 1.36 | M |
| 6 | 1.41 | 1.05 | | 2.46 | 1.35 | M |
| 7 | 1.38 | 1.02 | | 2.39 | 1.35 | M |
| 8 | 1.36 | 0.99 | | 2.34 | 1.37 | M |
| 9 | 1.31 | 0.97 | | 2.28 | 1.36 | M |
| 10 | 1.24 | 0.95 | | 2.18 | 1.31 | M |
| 11 | 1.21 | 0.92 | | 2.13 | 1.32 | M |
| 12 | 1.20 | 0.89 | | 2.08 | 1.35 | M |
| 13 | 1.14 | 0.86 | | 2.00 | 1.34 | M |
| 14 | 1.10 | 0.83 | | 1.93 | 1.33 | M |
| 15 | 1.07 | 0.78 | | 1.85 | 1.37 | M |
| 16 | 1.01 | 0.76 | | 1.76 | 1.34 | M |
| 17 | 0.99 | 0.71 | | 1.70 | 1.39 | M |
| 18 | 0.90 | 0.66 | | 1.55 | 1.36 | M |

| HD26-146 | | | | | | |
|-------------------|-----------|-----------|------------|-----------|--------------|-----------|
| Cromossomo | BL | BC | SAT | CT | BL/BC | TC |
| 1 | 2.0 | 1.6 | | 3.55 | 1.27 | M |
| 2 | 1.9 | 1.4 | | 3.26 | 1.34 | M |
| 3 | 1.8 | 1.3 | | 3.07 | 1.37 | M |
| 4 | 1.7 | 1.3 | | 2.97 | 1.35 | M |
| 5 | 1.6 | 1.2 | | 2.81 | 1.30 | M |
| 6 | 1.5 | 1.2 | | 2.74 | 1.26 | M |
| 7 | 1.5 | 1.2 | 0.66 | 2.64 | 1.28 | M |
| 8 | 1.4 | 1.1 | | 2.55 | 1.26 | M |
| 9 | 1.3 | 1.1 | | 2.47 | 1.20 | M |
| 10 | 1.3 | 1.1 | | 2.38 | 1.23 | M |

| | | | | | |
|----|-----|-----|------|------|---|
| 11 | 1.3 | 1.1 | 2.34 | 1.24 | M |
| 12 | 1.3 | 1.0 | 2.28 | 1.25 | M |
| 13 | 1.2 | 1.0 | 2.22 | 1.28 | M |
| 14 | 1.2 | 1.0 | 2.14 | 1.23 | M |
| 15 | 1.1 | 0.9 | 2.0 | 1.21 | M |
| 16 | 1.1 | 0.9 | 1.95 | 1.20 | M |
| 17 | 1.0 | 0.8 | 1.79 | 1.22 | M |
| 18 | 0.8 | 0.7 | 1.55 | 1.18 | M |

(BC) Braço Curto; (BL) Braço Longo; (SAT) Satélite; (CT) Comprimento Total do Cromossomo; (BL/BC) Razão entre o Braço Longo e o Braço Curto do Cromossomo; (TC) Tipo de Cromossomo; (M) Metacêntrico; (SM) Submetacêntrico.

A ANOVA demonstrou diferença significativa para o tamanho cromossômico médio (Tabela 2) entre o genitor materno (*P. vitifolia*) e o híbrido HD26-143. Os outros quatro indivíduos apresentaram médias cromossômicas intermediárias entre esses dois genótipos, uma vez que os mesmos apresentaram as maiores e as menores médias, respectivamente. O teste de Tukey agrupou os genótipos em três grupos de acordo com médias (Tabela 3).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para comprimento cromossômico total entre os diferentes genótipos.

| FV | GL | Quadrado Médio CT |
|-------------|----|-------------------|
| Genótipo | 5 | 0.32* |
| Erro | 24 | |
| Total | 29 | |
| CV (%) | | 12.63 |
| Média Geral | | 2.58 |

FV = Fonte de variação; GL = Grau de liberdade; CV = Coeficiente de variação; CT = Comprimento total. *Significativo a 5% pelo teste F.

Tabela 3. Comprimento cromossômico médio dos híbridos HD26 e seus genitores (*P. vitifolia* e *P. hastchbachii*).

| Genótipos | Comprimento Total Cromossômico |
|------------------------|--------------------------------|
| <i>P. vitifolia</i> | 3.02 a |
| <i>P. hastchbachii</i> | 2.44 ab |
| HD26 -146 | 2.49 ab |
| HD26 - 104 | 2.51 ab |
| HD26 - 102 | 2.75 ab |
| HD26 - 143 | 2.30 b |

Letras diferentes nas médias diferem entre os diferentes genótipos pelo teste Tukey.

Os kariogramas das espécies genitoras foram elaborados com base no lote haploide e os cromossomos foram dispostos na ordem decrescente de 1 a 9. Por outro lado, devido a natureza híbrida dos genótipos HD26, o pareamento cromossômico não pode ser realizado, uma vez que os cromossomos das progênies são homeólogos e os cromossomos das espécies genitoras possuem tamanhos muito similares entre si, dificultando a distinção dos cromossomos de cada genitor no híbrido, sendo assim os cromossomos dos híbridos foram e numerados de um a dezoito. Além disso, a presença de satélites mediante a coloração com Giemsa, não foi visualizada em todas as metáfases não sendo possível identificar sua localização de forma precisa em todos os genótipos. A partir das médias obtidas das cinco metáfases de cada genótipo, foram produzidos os ideogramas dos genitores e híbridos (Figura 2). Em *P. vitifolia* e *P. hatschabachii*, satélites foram identificados nos pares 5 e 6 na primeira espécie, e nos pares 1 e 2 na segunda espécie (Figura 2A e 2B). No híbrido HD26-102 dois satélites foram encontrados nos cromossomos 1 e 5 (Figura 2C). Por outro lado, apenas um único foi identificado no cromossomo 2 dos híbridos HD26-104 e HD26-143 (Figura 2D e 2E). Para o híbrido HD26-146 a presença de satélite foi visualizada no cromossomo 7 (Figura 2F).

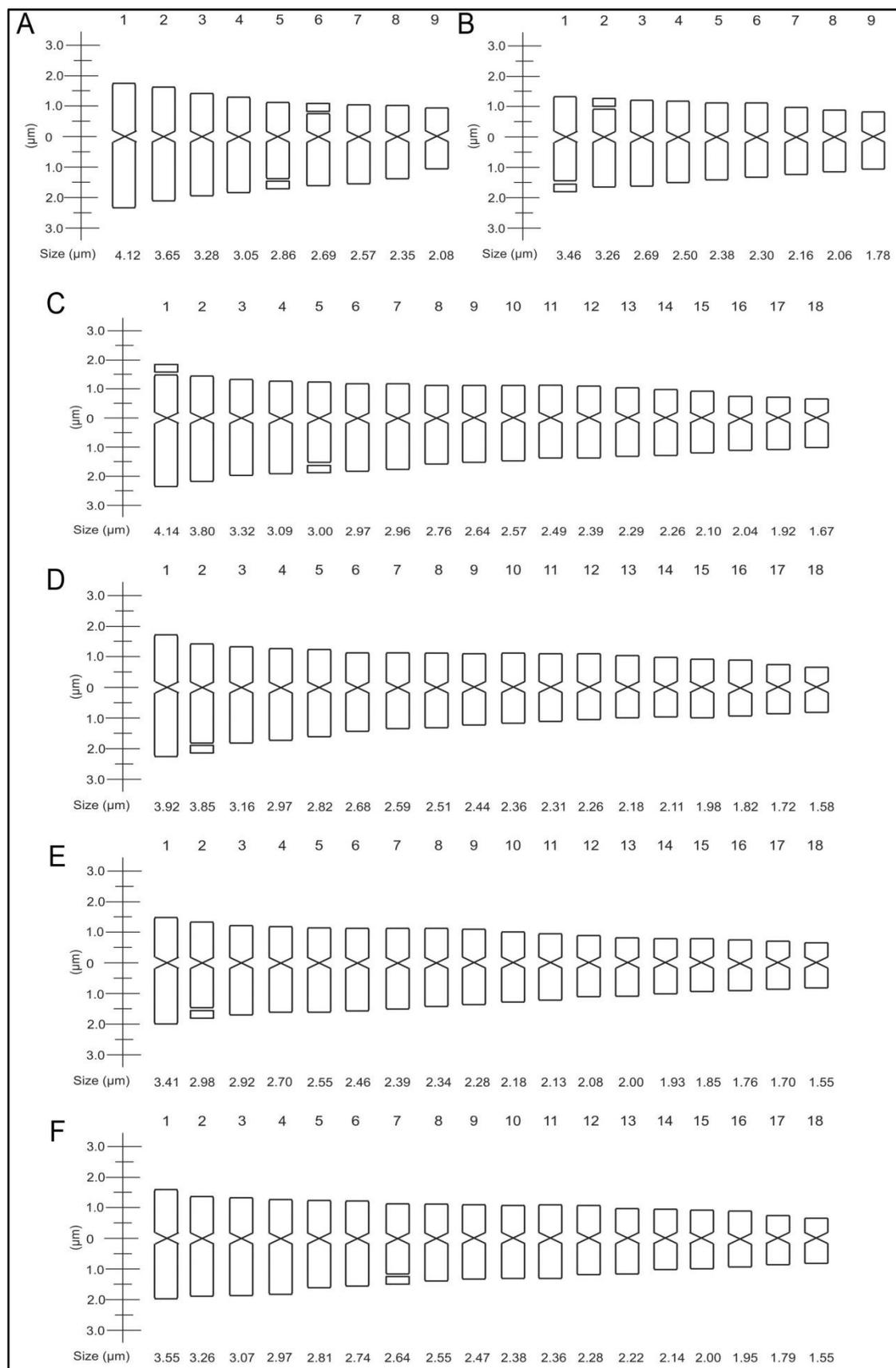


Figura 2. Ideogramas das espécies genitoras e híbridos interespecíficos F_1 (HD26) de *Passiflora*. **(A)** *P. vitifolia*; **(B)** *P. hatschbachii*; **(C)** HD26-102; **(D)** HD26-104; **(E)** HD26-143 e **(F)** HD26-146.

Bandamento CMA₃/DAPI

Através do bandamento CMA₃/DAPI foi possível observar a presença de blocos CMA₃⁺/DAPI restritos as regiões de satélites (constricções secundárias), que não foram visualizados através da coloração convencional (Figura 3). Os blocos CMA₃⁺/DAPI permitiram observar o número de satélites em ambos os genitores e nos híbridos analisados. Foram observados quatro blocos CMA₃⁺/DAPI em *P. vitifolia*, quatro em *P. hatschbachii* e quatro em cada híbrido,

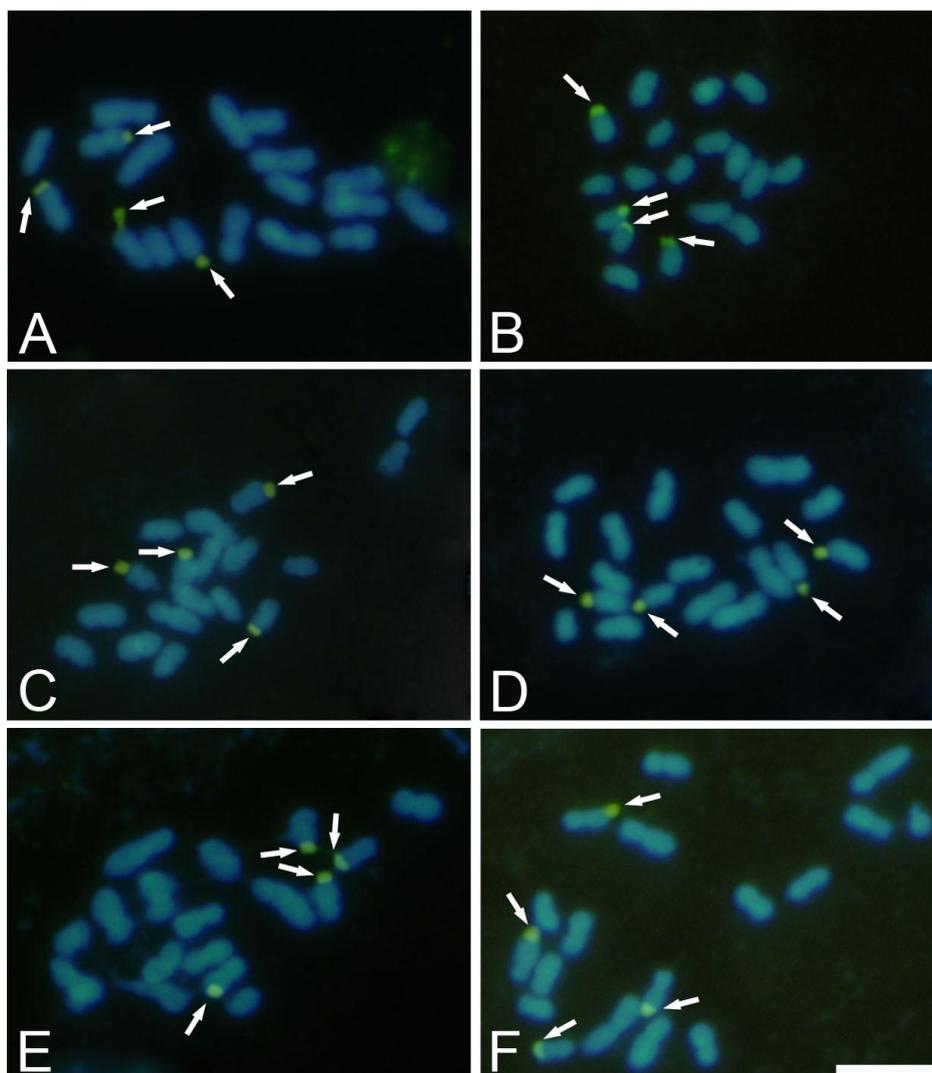


Figura 3. Bandamento CMA₃/DAPI em metafases mitóticas de genitores e híbridos interespecíficos F₁ (HD26) de *Passiflora* ($2n = 18$). (A) *P. vitifolia* (B) *P. hatschbachii*, (C) HD26-102, (D) HD26-104, (E) HD26-143, (F) HD26-146. As setas indicam blocos CMA₃⁺. Barra = 10 μ m.

GISH

A utilização simultânea das sondas dos genitores materno e paterno permitiu a visualização distinta dos genomas de *P. vitifolia* e *P. hatschbachii* em cada um dos quatro híbridos F₁ analisados. Em cada híbrido foram observados nove cromossomos de origem materna (vermelho) e nove cromossomos de origem paterna (verde) (Figura 4).

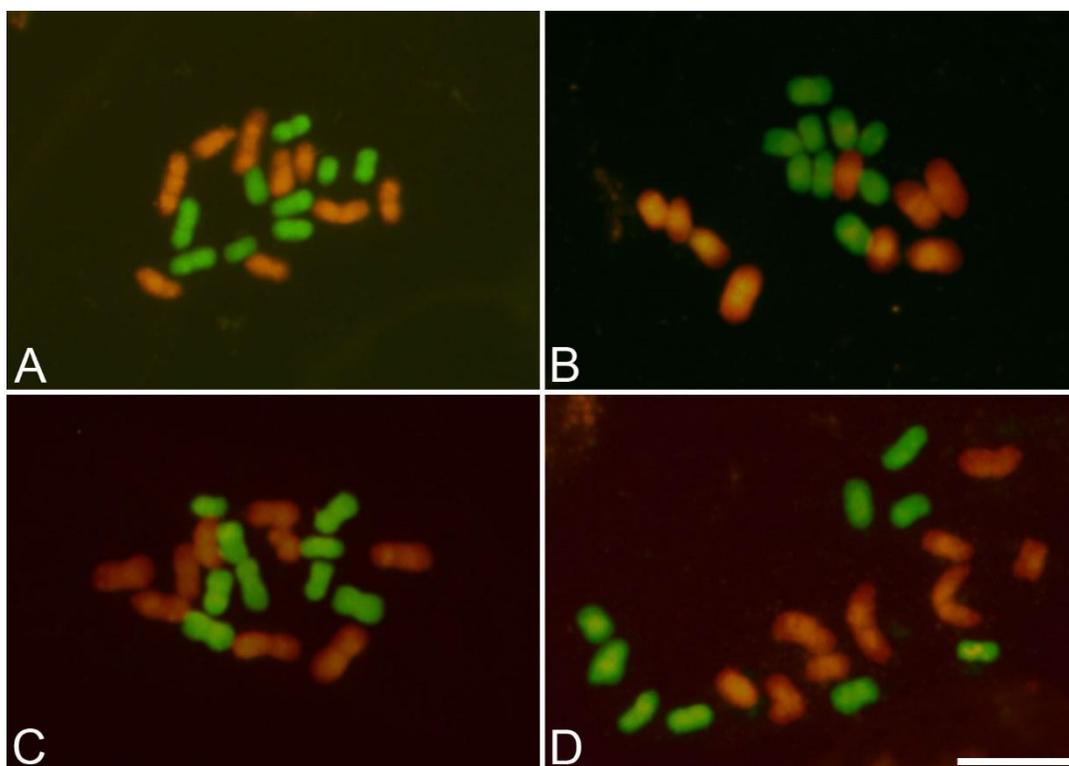


Figura 4. Hibridação Genômica *In Situ* (GISH) em metafases mitóticas dos híbridos interespecíficos F₁ (HD26) obtidos do cruzamento entre *P. vitifolia* vs. *P. hatschbachii*. (A) HD26-102, (B) HD26-104, (C) HD26-143, (D) HD26-146. Barra = 10 µm.

DISCUSSÃO

O número cromossômico é uma característica fundamental na obtenção de híbridos (SANTOS et al., 2012; BELO et al., 2018) uma vez que, híbridos obtidos de espécies que possuem o mesmo número cromossômico podem ocorrer o pareamento correto entre os cromossomos homeólogos. O compartilhamento do mesmo número cromossômico pelas espécies genitoras possibilita a ocorrência de pareamento entre todos os cromossomos homeólogos, ocorrendo assim uma meiose regular (ocorrência do *crossing over* e a formação dos quiasmas), o que permite a viabilidade do híbrido (FACHINETTO; TEDESCO, 2009; (SOUZA et al., 2003).

Em *Passiflora*, a confirmação da hibridação apenas com base no comprimento cromossômico não é confiável devido a semelhança no tamanho e na morfologia (cromossomos metacêntricos) (SOUZA et al., 2008), não favorece uma boa delimitação entre as espécies genitoras. Isso dificulta a identificação de características exclusivas de cada genitor nos híbridos e dessa forma restringe a análise comparativa com a finalidade de confirmação da hibridação. Em alguns cruzamentos a caracterização cromossômica fica restrita a contagem do número cromossômico ou a obtenção de dados cariomorfológicos que não permitem realizar a confirmação de maneira confiável (MOREIRA, 2017; SOUZA, 2018). Nesse estudo, por exemplo, apesar da coloração cromossômica com Giemsa ter possibilitado a confirmação do caráter diploide $2n = 18$ dos híbridos HD26, a identificação e comparação de alguns satélites nos híbridos em relação aos seus genitores foi dificultada, não sendo possível a confirmação precisa da hibridação através da coloração convencional. Dificuldades semelhantes também foram observadas em híbridos HD25 oriundos do cruzamento *P. coccinea* vs. *P. hatschbachii* (SOUZA, 2018), e em híbridos HD15 provenientes do cruzamento *P. gardneri* Mast. vs. *P. gibertii* N.E. BROW (SILVA et al., 2018).

Diferença na posição de satélites podem ser originadas de translocação em função de rearranjos estruturais em híbridos retrocruzados (MELO et al., 2017). Nos híbridos analisados, além de diferenças quantitativas, observadas pela coloração convencional, diferenças na posição dos satélites em relação aos genitores também foram observadas a partir da elaboração dos ideogramas. Entretanto, essas diferenças na posição dos satélites nos híbridos podem ser devido aos tamanhos semelhantes dos cromossomos entre as espécies genitoras. Em híbridos HD25 oriundos do cruzamento *P. coccinea* vs. *P. hastchabachii* não foram observadas variações dos satélites em comparação aos genitores (SOUZA, 2018).

Diferenças no tamanho médio cromossômico podem ser observadas entre algumas espécies de passifloras (SOUZA et al., 2003). Em cromossomos de híbridos esse comprimento tende a variar sendo obtidos valores intermediários entre as duas espécies envolvidas no cruzamento, assim como observado para híbridos obtidos do cruzamento *P. edulis* vs. *P. setacea* (SOARES-SCOTT et al., 2005). A comparação do comprimento cariótipo de *P. hatschabachii* e *P. vitifolia* demonstrou que essa última espécie apresenta cromossomos de maior tamanho e que híbridos oriundos desse cruzamento apresentam cromossomos de comprimento intermediário entre as duas espécies como resultado das variações oriundas da hibridação interespecífica.

A nível taxonômico a morfologia cromossômica nas espécies do gênero *Passiflora* é uma característica conservada (MAYEDA, 1997), sendo observada para a maioria das espécies uma maior ocorrência de cromossomos metacêntricos e poucos cromossomos submetacêntricos nas espécies (VIANA; SOUZA 2012; AMORIM et al., 2014; MELO et al., 2014; MOREIRA, 2017). Nesse estudo os cromossomos dos híbridos foram classificados como metacêntricos e alguns poucos classificados como submetacêntricos, característica herdada dos genitores. Em algumas plantas, a morfologia cromossômica não é muito conservada entre diferentes espécies como ocorre no gênero *Passiflora*.

A dupla coloração com o uso de fluorocromos CMA₃ e DAPI é uma importante ferramenta na determinação do número de satélites correspondente a regiões de heterocromatina rica em GC em *Passiflora*. Em híbridos interespecíficos, a identificação de satélites com esses fluorocromos permite a confirmação confiável da hibridação, uma vez que essas regiões se configuram como importantes marcadores citológicos (SOUZA, 2018). Nos híbridos analisados nesse estudo, o bandamento CMA₃/DAPI permitiu, de forma confiável a observação de dois pares de satélites tanto nos genitores quanto em híbridos. Em híbridos triplos de *Passiflora* o número de satélites identificados também foi igual ao apresentado pelos seus genitores (SANCHÊS, 2018). Em híbridos F₁ oriundos do cruzamento entre *P. gardneri* Mast. vs. *P. gibertii* N. E. Brown, o número de satélites (CMA₃⁺) diferiu nos diferentes indivíduos analisados, devido a presença de um par heteromórfico em um dos genitores (*P. gibertii*). A ocorrência de híbridos com número de satélites diferentes pode levar a ocorrência de rearranjos cromossômicos, caso ocorra cruzamento entre esses indivíduos (SILVA et al., 2018). A comparação do número de satélites dos híbridos e de seus genitores é um importante parâmetro (SILVA et al., 2018), uma vez que em espécies do gênero *Passiflora* tanto o número quanto a posição de satélites são características cromossômicas que possibilitam para a comparação entre indivíduos (MELO et al., 2011).

A citogenética molecular tem proporcionado a confirmação rápida e acurada de híbridos. Em *Passiflora* a aplicação de GISH tem auxiliado na identificação de híbridos interespecíficos, retrocruzados e de híbridos triplos (; MELO et al., 2017; SANCHÊS, 2018; SOUZA, 2018). Além da hibridação utilizando sonda-bloqueio, resultados satisfatórios também vêm sendo obtidos a partir da hibridação utilizando as sondas dos genitores materno e paterno simultaneamente. Entretanto, a homologia cromossômica e alto grau de compartilhamento de sequências repetitivas entre as espécies envolvidas no cruzamento, pode resultar na ocorrência de hibridação cruzada (SILVA; SOUZA, 2013; SILVA et al., 2018),

sendo necessária a realização de ajustes na concentração de umas das sondas para melhorar a distinção dos cromossomos (SILVA; SOUZA, 2013).

Para algumas espécies de plantas o tamanho reduzido dos cromossomos também tem se mostrado um fator limitante da aplicação de GISH em função da dificuldade de distinção cromossômica (FU et al., 2004; YAO et al., 2010). Entretanto, em passifloras essa técnica tem se mostrado eficiente independentemente do comprimento do cromossomo (MELO et al., 2015, SILVA et al., 2018, SOUZA, 2018, SANCHÊS, 2018). Nesse estudo, a hibridação sonda-sonda permitiu a visualização de dois conjuntos cromossômicos distintos, um oriundo de *P. vitifolia* e outro oriundo de *P. hatschbachii* no genoma das plantas híbridas. Resultados semelhantes foram obtidos em híbridos do cruzamento entre *P. coccinea* vs. *P. vitifolia* (SOUZA, 2018). Em híbridos triplos do cruzamento [(*Passiflora coccinea* vs. *P. hatschbachii*) vs. *P. cincinnata* Mast.], [(*Passiflora coccinea* vs. *P. hatschbachii*) vs. *P. tholozani*] e [(*Passiflora coccinea* vs. *P. hatschbachii*) vs. *P. mucronata*] a GISH possibilitou a observação da contribuição não igualitária dos cromossomos dos genitores no genoma dos híbridos (SANCHÊS, 2018). Ajustes como os realizados para hibridação sonda-sonda também podem ser necessários quando se utiliza sonda-bloqueio na hibridação, assim como realizado na identificação de híbridos interespecíficos obtidos do cruzamento *P. gardneri* vs. *P. gibertii* (SILVA et al., 2018). Além de eficiente e precisa na confirmação da hibridação, a GISH ainda permite a visualização de recombinações em híbridos retrocruzados, auxiliando assim no entendimento cromossômico durante o pareamento (MELO et al., 2016).

CONCLUSÕES

Os híbridos HD26 são cariotipicamente estáveis ($2n = 18$) e possuem cromossomos metacêntricos e submetacêntricos.

Cada híbrido apresenta quatro sítios de satélites herdados dos pais que podem ser melhor distinguidos mediante a dupla coloração dos cromossomos com CMA₃/DAPI.

Os híbridos possuem estabilidade cromossômica, sendo nove cromossomos oriundos do genitor materno e nove oriundos do genitor paterno.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à UESC, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro à pesquisa; FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia) pelas bolsas concedidas ao primeiro autor; CNPq pela bolsa concedida ao segundo autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, P. P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A. A. F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, v. 166, p.307-315, 2009.
- AMORIM, J. DOS S.; SOUZA, M. M.; VIANA, A. J.; CORRÊA, R. X.; ARAÚJO, I. S.; AHNERT, D. Cytogenetic, Molecular and Morfological Characterization of *Passiflora capsularis* L. and *Passiflora rubra* L. **Plant Systematic and Evolution**. 300(5), p.1147-1162, 2014.
- BELO, G. O.; SOUZA, M. M.; SILVA, G. S.; LAVINSCKY, M. P. Hybrids of *Passiflora*: *P. gardneri* versus *P. gibertii*, confirmation of paternity, morphological and cytogenetic characterization. **Euphytica**. v. 214, p. 1-14, 2018.
- CERVI, A. C.; IMIG, D. C. A new species of *Passiflora* (Passifloraceae) from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Phytotaxa**, v. 103, p.46-50, 2013.
- COELHO, M.S.E.; BORTOLETI, K.C.A.; ARAÚJO, F.P.; MELO, N.F. Cytogenetic characterization of the *Passiflora edulis* Sims x *Passiflora cincinnata* Mast. interspecific hybrid and its parents. **Euphytica**, v. 210, n. 1, p. 93-104, 2016.
- DOYLE J.; J, DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** v.12, p.13-15 1990.
- FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Número cromossômico, análise meiótica e estimativa da viabilidade polínica em populações de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, p.110-116, 2009.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; PEIXOTO, J. R. Caracterização de germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro assistidos por marcadores moleculares: resultados de pesquisa 2005-2008. Planaltina, DF: Embrapa, Cerrados, 57p, 2008.
- FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; SOARES-SCOTT, M. D.; SOUZA, L. S.; CASTIGLIONI, G. L. BRS Rubiflora: Híbrido de *Passiflora* para uso como planta ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental (Suplemento)**, v. 13, p. 337, 2007b.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, K. P.; BRAGA, M. F.; BORGES, R. S.; PEIXOTO, J. R.; ANDRADE, G. A.; SANTOS, E. C.; SILVA, D. G. P. BRS Estrela do Cerrado: Híbrido de *Passiflora* para uso como planta ornamental. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental (Suplemento)**, v. 13, p. 334, 2007a.

FERREIRA, D. F. **Programa Sisvar**. Software 5.0. UFLA, Lavras, 2003.

FU, C. H.; CHEN, C. L.; GUO, W. W.; DENG, X. X. GISH, AFLP and PCR-RFLP analysis of an intergeneric somatic hybrid combining Goutou sour orange and *Poncirus trifoliata*. **Plant Cell Rep**, 23, 391-396, 2004.

HANSEN, A. K.; GILBERT, L. E.; SIMPSON, B. B.; DOWNIE, S. R.; CERVI, A. C.; JANSEN, R. K. Phylogenetic relationships and chromosome number evolution in *Passiflora*. **Systematic Botany**, 31:1, 138–150, 2006.

GUERRA M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco, I. **Revista Brasileira de Genética** n. 9, p. 21-40, 1986.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. **Ribeirão Preto: FUNPEC**, p. 201, 2002.

JAUHAR, P. P.; PETERSON, T. S. Cytological analyses of hybrids and derivatives of hybrids between durum wheat and *Thinopyrum bessarabicum*, using multicolour fluorescent GISH. **Plant breeding**, v. 125, n. 1, p. 19-26, 2006.

JUNQUEIRA, K. P.; JUNQUEIRA, N. T. V.; FALEIRO, F. G.; BRAGA, M. F.; LIMA, C. A.; VAZ, C. F.; VILLANOVA, A. C. C. BRS Roseflora: Híbrido de *Passiflora* para uso em paisagismo. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental (Suplemento)**, 13, 340 p., 2007.

MAYEDA, L. Y. **Estudo citogenético em dez táxons do gênero *Passiflora* L. (*Passifloraceae*)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 1997

MELO C. A. F.; SOUZA M. M.; VIANA A. P.; SANTOS E. A.; SOUZA V. O.; CORRÊIA R. X. Morphological characterization and genetic parameter estimation in backcrossed progenies of *Passiflora* L. for ornamental use. **Sci Hort** n.212, p. 91-103, 2016.

MELO, C. A. F.; MARTINS, M. I. G.; OLIVEIRA, M. B. M.; BENKO-ISEPPON, A. M.; CARVALHO, R. Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L. **Plant systematics and evolution**, v. 293, n. 1-4, p. 227-235, 2011.

MELO, C. A. F.; SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Establishment of the genomic in situ hybridization (GISH) technique for analysis in interspecific hybrids of *Passiflora*. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 1, p. 2176-2188, 2015.

MELO, C. A. F.; SOUZA, M. M.; ABREU, P. P.; VIANA, A. J. C. Karyomorphology and GC-rich heterochromatin pattern in *Passiflora* (*Passifloraceae*) wild species from *Decaloba* and *Passiflora* subgenera. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 209, n. 11, p. 620-631, 2014.

MELO, C. A. F.; SOUZA, M. M.; ABREU, P. P.; VIANA, A. P. Karyomorphology and GC-rich heterochromatin pattern in *Passiflora* (Passifloraceae) wild species from Decaloba and *Passiflora* subgenera. **Flora**, 209, 620-631, 2014.

MELO, C. A. F.; SOUZA, M. M.; SILVA, G. S. Karyotype analysis by FISH and GISH techniques on artificial backcrossed interspecific hybrids involving *Passiflora subblanceolata* (Killip) MacDougal (Passifloraceae). **Euphytica**, v. 213, n. 8, p. 161, 2017.

MELO, N. F. Relações cariotípicas e conteúdo de DNA entre espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* L. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 38, n. 1supl, p. 47, 2017.

MELO, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 226, n. 1-2, p. 69-84, 2001.

MOREIRA, R. C. T. **ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM ESPÉCIES DE CITRUS E PASSIFLORA**. Dissertação (DMestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2017.

ORTOLONI, F. P.; MATAQUEIRO, M. F.; MORO, J. R. Caracterização citogenética em *Schlumbergera truncate* (Haworth) Moran e *Schlumbergera x buckley* (T. Moore) Tjaden (Cactaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 21 p.361-367, 2007.

RUSHING, F. Tough plants for southern gardens-low care, no care, tried and true winners. Nashville: Cool Springs Press. p.240, 2003.

SANCHÊS, R. C. V. S. **ANÁLISES CITOGENÉTICAS EM ACESSOS DE *Cucumis melo* L. E HÍBRIDOS TRIPLoS DE *Passiflora* L.** Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2018.

SANTOS, E. A.; SOUZA, M. M.; ABREU, P. P.; ARAÚJO, I. S.; VIANA, A. P.; ALMEIDA, A. A. F.; FREITAS, J. C. O. Confirmation and characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**, v. 184, n. 3, p. 389-399, 2012.

SANTOS, O. C. Caracterização cromossômica do cupuaçu *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. (Sterculiaceae) cultivado na Amazônia. 2002.

SCHWARZACHER, T.; HASLOP-HARRISON, P. Practical in situ Hybridization. Oxford: Bios Scientific Publishers, p. 250, 2000.

SILVA, G. S.; SOUZA, M. M. Genomic in situ hybridization in plants. **Genet Mol Res**, v. 12, n. 3, p. 2953-65, 2013.

SILVA G. S.; SOUZA MM; MELO C. A. F.; URDAMPILLETA J. D.; FORNI-MARTINS E. R. Identification and characterization of karyotype in *Passiflora* hybrids using FISH and GISH. **BMC genetics**, v. 19, n. 1, p. 26, 2018.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; VIANA, A.P.; PEREIRA, M.G.; BERNACCI, L.C.; SUDRÉ, C.P.; SILVA, L.C. Meiotic irregularities and pollen viability in *Passiflora edmundoi* Saco (Passifloraceae). **Caryologia**, 56:2, p. 161-169, 2003.

SOARES-SCOTT, M. D.; MELETTI, L. M.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: FALEIRO, Fábio Gelape; JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela; BRAGA, Marcelo Fideles. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2005., 2005.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIEIRA, M. L. C. Cytogenetic studies in some species of *Passiflora* L. (Passifloraceae): a review emphasizing Brazilian species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 247-258, 2008.

SOUZA, V. O. de. **ANÁLISES MORFOLÓGICAS, GENÉTICAS E CITOGENÉTICAS EM HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DE *Passiflora coccinea* e *P. hatschbachii***. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia. 2018.

ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M.; ULMER, B. *Passiflora*: Passionflowers of the world. **Portland, Or.: Timber Press 430p.-illus., col. illus. ISBN**, v. 881926485, 2004.

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

VIANA, A. J. C.; SOUZA, M. M. Comparative cytogenetics between the species *Passiflora edulis* and *Passiflora cacaoensis*. **Plant Biology**, v. 14, n. 5, p. 820-827, 2012.

YAO, X.C.; GE, X.H.; CHEN, J.P.; LI, Z.Y. Intra- and intergenomic relationships in interspecific hybrids between *Brassica* (*B. rapa*, *B. napus*) and a wild species *B. maurorum* as revealed by genomic *in situ* hybridization (GISH). **Euphytica**, 173, 113-120, 2010.

YOSHITOME, M. Y.; SOUZA, M. F. P.; KARSBURG, I. V. Caracterização dos cromossomos mitóticos e índice meiótico de *Theobroma speciosum* (L.) WILLD. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 6, p. 21-28. 2008.

