

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR



**CITOGÉNÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM ESPÉCIES
PRESUMIVELMENTE EXTINTAS NA NATUREZA E EM HÍBRIDOS TRIPLOS DE
*Passiflora L.***

MANUELLA PALMEIRA LAVINSCKY

ILHÉUS-BAHIA-BRASIL

Março de 2022

MANUELLA PALMEIRA LAVINSCKY

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM ESPÉCIES
PRESUMIVELMENTE EXTINTAS NA NATUREZA E EM HÍBRIDOS TRIPLOS DE
*Passiflora L.***

Tese apresentada à Universidade Estadual

Área de Concentração:
Genética e Biologia Molecular.

Orientadora:
Prof.^a Margarete Magalhães de Souza

Coorientadores:
Prof. Dr. Cláudio Antônio Ferreira de Melo
Prof. Dr. Gonçalo Santos da Silva

ILHÉUS – BAHIA- BRASIL

Março de 2022

MANUELLA PALMEIRA LAVINSCKY

**CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM ESPÉCIES
PRESUMIVELMENTE EXTINTAS NA NATUREZA E EM HÍBRIDOS TRIPLOS DE
*Passiflora L.***

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para a obtenção do título doutor em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Biologia Molecular.

APROVADA: Ilhéus - BA, 31 de março de 2022

Prof. Dra. Ioná Santos Araújo Holanda
(UFERSA)

Prof. Dra. Vanessa de Carvalho Cayrer Pamponét
(IFBAIANO)

Prof. Dra. Viviane de Oliveira Souza
(CETEP João Campos)

Prof. Dr. Fátima Cerqueira Alvim
(UESC)

Prof. Dra. Margarete Magalhães de Souza
(UESC - Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser essencial em minha vida, guia que iluminou os meus caminhos durante esta caminhada.

Aos meus pais Huassile e Marisvaldo por serem meus exemplos de vida. Mãe, seu cuidado e dedicação me deram a esperança de seguir em frente. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que nunca estive sozinha nessa jornada. Amo vocês!

À minha filha, Laura, você chegou bem no início disso tudo e transformou completamente minha vida. Obrigada por me tornar uma mulher mais forte, batalhadora e por ter cedido um pouco do seu tempo nesses preciosos 4 anos de sua vida para meu trabalho. Obrigada por ter me escolhido para ser sua mãe e espero sempre lhe oferecer o melhor de mim. TE AMO INFINITAMENTE.

À Professora Dra. Margarete Magalhães de Souza, pela orientação e dedicação, pelos valiosos ensinamentos transmitidos e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus co-orientadores Dr. Cláudio Antônio Ferreira de Melo e Gonçalo Santos da Silva pela dedicação, ensinamentos, incentivo e apoio em todos os momentos profissional e emocional. Serei sempre grata à vocês.

As companheiras do Laboratório de Melhoramento de Plantas Rita e Andreia pelas experiências vividas e pelos poucos períodos de descontração na pandemia, em especial à Rita, que além de companheira se tornou uma grande amiga, obrigada pelo apoio emocional e por toda ajuda no laboratório e fora dele.

Ao técnico de campo Roberto pela ajuda na casa de vegetação, pelo cuidado e companheirismo comigo.

Às minhas amigas de longas datas que estão sempre comigo em todos os momentos me apoiando, incentivando, torcendo e crescendo juntas. Amo vocês!

À Universidade Estadual de Santa Cruz, em especial ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular.

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

A todos que me apoiaram e participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Muito obrigada!

EXTRATO

Lavinsky, Manuella Palmeira. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março de 2022. **Citogenética clássica e molecular em espécies presumivelmente extintas na natureza e em híbridos triplos de *Passiflora* L.** Orientadora: Margarete Magalhães de Souza. Coorientadores: Cláudio Antônio Ferreira de Melo; Gonçalo Santos da Silva.

O gênero *Passiflora* L. compreende espécies de valor comercial e relevância ornamental e apesar da grande diversidade genética existente e do clima favorável, essas espécies ainda são pouco utilizadas no Brasil com a finalidade ornamental. Algumas espécies estão ameaçadas de extinção, devido ao aumento do desmatamento, necessitando de estratégias para conservação imediata dessas espécies silvestres. Além disso, a hibridação entre espécies silvestres vem sendo bastante utilizada para obtenção de plantas com grande valor ornamental. Contudo, esses híbridos em sua maioria são obtidos e caracterizados híbridos apenas na F₁, carecendo de informações genéticas acerca de híbridos com mais de dois genomas em sua constituição. A caracterização cariotípica e a análise do comportamento meiótico de espécies do gênero *Passiflora* fornecem dados importantes para estudos de filogenia, taxonomia, estrutura e organização cromossômica e contribuem para compreensão da diversidade genética, conservação de espécies e para subsidiar futuros programas de melhoramento. A presente tese teve como objetivo geral a caracterização cariotípica de duas espécies presumivelmente extintas na natureza, *P. racemosa* e *P. malacophylla*, através de citogenética clássica e molecular, além de analisar o comportamento meiótico das duas espécies e de dois híbridos triplos interespecíficos de espécies do gênero *Passiflora*, progênie HD29 [HD25 (*Passiflora coccinea* x *P. hatschbachii*) x *P. tholozani*] e HD30 (HD25 x *P. mucronata*), bem como seus genitores. No capítulo I: a caracterização cariotípica de *P. racemosa* e *P. malacophylla* foi feita através da análise mitótica. Foram coletadas ápices de raízes e pré-tratados com 8-Hidroxiquinolina (8-HQ) e as lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e mantidas a -20 °C até a aplicação dos fluorocromos CMA3 e DAPI, Giemsa 3% e FISH. Foi observada estabilidade no número cromossômico das espécies *P. racemosa* e *P. malacophylla* (2n = 18), com o comprimento cromossômico médio de 3,27 μm e 2,42 μm, respectivamente. Apenas a espécie *P. malacophylla* revelou cromossomos submetacêntricos. Foram observados três e dois pares cromossômicos satelitados com blocos CMA₃⁺/DAPI e também sítios de DNAr 45S nas espécies *P. racemosa* e *P. malacophylla*, respectivamente. Adicionalmente, um par cromossômico com sítio de DNAr 5S foi observado em ambas espécies. Telômeros do tipo

(TTAGGG) n foram observados nas duas espécies analisadas. Para análise meiótica, foram coletados botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento, confirmando o número haplóide $n = 9$, formação de bivalentes, quiasma intersticial e final, meiose regular com formação de placa metafásica e quatro núcleos haplóides ao final da meiose. O índice meiótico ficou acima de 90% em ambas as espécies, com formação de grãos de pólen viáveis, indicando estabilidade meiótica. No capítulo II: o comportamento meiótico dos genitores e híbridos triplos foi feito através da citogenética clássica, com coleta de botões florais para análise meiótica e flores abertas para análise da viabilidade polínica. Para os genitores, a meiose foi regular, com número haplóide $n = 9$, formação de bivalentes, predominância de quiasma intersticial, com índice meiótico acima de 90%. Para o híbrido simples HD25 e os híbridos triplos HD29 e HD30, também foi observado número haplóide $n = 9$, porém maior prevalência de cromossomos univalentes e baixa frequência de quiasmas, formação de irregularidades na meiose, como cromossomos precoces, assincronia e irregularidades de fuso e índice meiótico abaixo de 80%, com maior formação de grãos de pólen inviáveis. O estudo do comportamento meiótico e da viabilidade polínica permite avaliar a fertilidade das espécies e quais as implicações da hibridação no genoma dos híbridos triplos, contribuindo com a seleção de espécies citogeneticamente mais estáveis para serem utilizadas em programas de conservação e de melhoramento genético

Palavras-chave: Cariótipo, comportamento meiótico, viabilidade polínica, FISH.

ABSTRACT

Lavinsky, Manuella Palmeira. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, março de 2022. **Classical and molecular cytogenetics in species presumably extinct in the wild and in triple hybrids of *Passiflora* L. Orientadora:** Margarete Magalhães de Souza. Coorientadores: Cláudio Antônio Ferreira de Melo; Gonçalo Santos da Silva.

The genus *Passiflora* L. comprises species of ornamental relevance and despite the great existing genetic diversity and the favorable climate, these species are still little used in Brazil for ornamental purposes and some species are threatened with extinction, due to the increase in deforestation, requiring strategies for immediate conservation of these wild species. In addition, hybridization between wild species has been widely used to obtain plants with great ornamental value. However, these hybrids are mostly obtained and characterized F1 hybrids, lacking genetic information about hybrids with more than two genomes in their constitution. Karyotypic characterization and analysis of meiotic behavior of species of the genus *Passiflora* provide important data for studies of phylogeny, taxonomy, chromosomal structure and organization and contribute to the understanding of genetic diversity, species conservation and to support future breeding programs. The present thesis has as general objective the karyotypic characterization of two species presumably extinct, *P. racemosa* and *P. malacophylla*, through classical and molecular cytogenetics, in addition to analyzing the meiotic behavior of the two species and of two interspecific triple hybrids of species of the genus *Passiflora*, progeny HD29 [HD25 (*Passiflora coccinea* x *P. hatschbachii*) x *P. tholozani*] and HD30 (HD25 x *P. mucronata*), as well as their parents. In chapter I: the karyotypic characterization of *P. racemosa* and *P. malacophylla* was done through mitotic analysis. Root apices were collected and pre-treated with 8-Hydroxyquinoline (8-HQ) and the slides were prepared by the crushing technique and kept at -20 °C until the application of fluorochromes CMA₃ and DAPI, Giemsa 3%, FISH. Stability was observed in the chromosome number of the species *P. racemosa* and *P. malacophylla* with $2n = 18$, with the average chromosome length being 3.27 µm and 2.42 µm, respectively. Only the species *P. malacophylla* revealed submetacentric chromosomes. Three and two satellite chromosome pairs with CMA₃⁺/DAPI blocks and also 45S rDNA sites were observed in *P. racemosa* and *P. malacophylla* species, respectively. Additionally, a chromosomal pair with a 5S rDNA site was observed in both species. Telomeres of the (TTAGGG)_n type were observed in the two analyzed species. For meiotic analysis, flower buds were collected at different stages of development, confirming the haploid number $n = 9$, bivalent formation, interstitial and final chiasm, regular meiosis with metaphase plaque formation and four haploid nuclei at the end of meiosis. The meiotic index was above 90% in

both species, with formation of viable pollen grains, indicating meiotic stability. In chapter II: the meiotic behavior of parents and triple hybrids was performed through classical cytogenetics, with collection of flower buds for meiotic analysis and open flowers for analysis of pollen viability. For the parents, meiosis was regular, with haploid number $n = 9$, formation of bivalents, predominance of interstitial chiasm and regular meiosis, with a meiotic index above 90%. For the single hybrid HD25 and the triple hybrids HD29 and HD30, a haploid number $n = 9$ was also observed, but a higher prevalence of univalent chromosomes and a low frequency of chiasmata, with formation of irregularities in meiosis, such as early chromosomes, asynchrony and spindle irregularities and meiotic index below 80% and higher formation of unviable pollen grains. The study of meiotic behavior and pollen viability allows us to assess the fertility of species and what are the implications of hybridization in the genome of triple hybrids, contributing to the selection of cytogenetically more stable species to be used in breeding programs.

Keywords: Karyotype, meiotic behavior, pollen viability, FISH.

ÍNDICE

EXTRATO.....	iv
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Gênero <i>Passiflora</i> L e importância econômica e ornamental.....	14
2.2 Espécies ameaçadas, estratégias de conservação e melhoramento genético.....	16
2.3 Caracterização mitótica em <i>Passiflora</i>	17
2.4 Caracterização meiótica em <i>Passiflora</i>	19
2.5 Híbridos interespecíficos de <i>Passiflora</i>	21
CAPÍTULO I	
3. CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM DUAS ESPÉCIES PRESUMIVELMENTE EXTINTAS NA NATUREZA, <i>P. racemosa</i> E <i>P. malacophylla</i>.	
Extrato.....	25
Abstract.....	26
3.1 Introdução.....	27
3.2 Material e métodos.....	30
3.2.1 Material vegetal.....	30
3.2.2 Preparo de lâminas com metáfases mitóticas	30
3.2.3 Coloração convencional e bandamento CMA ₃ /DAPI.....	31
3.2.4 Preparo de sondas para hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	32
3.2.5 Hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	33
3.2.6 Análise meiótica.....	34
3.2.7 Viabilidade polínica.....	35
3.3 Resultados.....	36
3.3.1 Análise cariotípica.....	36
3.3.2 Hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	38
3.2.3 Meiose e pós-meiose.....	40
3.2.4 Viabilidade polínica.....	45
3.4 Discussão.....	47
3.5 Conclusão	53
3.6 Referências Bibliográficas.....	54

CAPÍTULO II

4. ANÁLISES MEIÓTICAS EM GENITORES E HÍBRIDOS TRIPLOS INTERESPECÍFICOS (PROGÊNIE HD29 E HD30) DE *Passiflora L.*

Extrato.....	61
Abstract.....	62
4.1 Introdução.....	63
4.2 Material e métodos.....	65
4.2.1 Material vegetal.....	65
4.2.2 Condições de cultivo.....	67
4.2.3 Comportamento meiótico e pós-meiótico.....	67
4.2.4 Viabilidade polínica.....	68
4.3 Resultados.....	69
4.3.1 Meiose e pós-meiose.....	69
4.3.2 Viabilidade polínica.....	75
4.4 Discussão.....	77
4.5 Conclusão.....	83
4.6 Agradecimentos.....	83
4.7 Referências Bibliográficas.....	84
5. CONCLUSÕES FINAIS.....	89
6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES.....	90

1. INTRODUÇÃO

A família Passifloraceae A.L. de Jussieu ex Kunth compreende 17 gêneros e cerca de 650 espécies (BERNACCI et al., 2013) distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Na região neotropical (América) está presente a maior diversidade, com cerca de 500 espécies (ULMER; MACDOUGAL, 2004). O gênero *Passiflora* é o mais importante da família Passifloraceae por possuir espécies que têm valor econômico, ornamental e também apresentar maior diversidade com ampla variabilidade genética, com mais de 525 espécies relatadas (BERNACCI et al., 2013). O Brasil possui cerca de 137 espécies endêmicas e é considerado um importante centro de diversidade do gênero *Passiflora* (BERNACCI et al., 2013). No estado da Bahia, o gênero é representado por 31 espécies com uma ampla distribuição geográfica (NUNES; QUEIROZ, 2006). No entanto, novas espécies continuam sendo descobertas a cada ano e o número de novos táxons incluídos no gênero vem aumentando gradativamente (BERNACCI; SOUZA, 2012).

Apesar de ser o principal centro de diversidade de *Passiflora*, o Brasil pouco tem explorado o potencial de diversas espécies silvestres no mercado de plantas ornamentais. Devido à redução do habitat natural, como consequência direta ou indireta das ações humanas, e consequentemente da biodiversidade, a variabilidade genética de muitas espécies vem diminuindo drasticamente (CORLETT, 2016; KUSWANTO et al., 2022). Algumas espécies de plantas estão presumivelmente extintas na natureza (GOETTSCHE; GASTON, 2015), inclusive as passifloráceas, como exemplo *P. racemosa* Brot. e *P. malacophylla* Mast. (HERBÁRIO IAC, 2014), necessitando urgente de estratégias para conservação, manejo e uso de espécies silvestres (SHARROCK; JACKSON, 2017), abrangendo também a conservação dos ecossistemas e da variabilidade genética. As plantas têm um papel fundamental para a manutenção da biodiversidade e cada espécie é importante para manter o equilíbrio do ecossistema (GOETTSCHE et al., 2015).

As passifloras silvestres apresentam diversidade intra- e interespecífica em características morfológicas, das quais se destacam as belas flores vistosas e exuberantes, com coloração forte e intensa, em uma variedade de formatos e tamanhos (VANDERPLANK, 2000), algumas bem coloridas, outras mais pálidas, bem como a presença de corona que caracteriza a família Passifloraceae em termo taxonômicos e

morfológicos. Outros atributos, como longo ciclo de vida, longos períodos de florescimento, resistência a doenças e o número abundante de flores, incluem as espécies silvestres do gênero *Passiflora* no *ranking* de plantas ornamentais (ABREU et al., 2009; MELETTI et al., 2005; JUNQUEIRA et al., 2005).

Muitas espécies silvestres possuem características interessantes para serem selecionadas para estratégias de conservação e em programas de melhoramento, como na produção de híbridos ornamentais. A Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, possui uma Coleção de Trabalho do gênero *Passiflora*, no qual vem sendo realizadas pesquisas, desde 2004, no intuito de conhecer a diversidade genética do gênero, conservar espécies que estão ameaçadas e obter híbridos interespecíficos que reúnam caracteres de interesse ornamental (ABREU, 2008; SANTOS et al., 2012). Nesse contexto, há necessidade de um incremento no desenvolvimento de pesquisas para identificar, conservar e selecionar espécies que possuam características interessantes para o mercado de plantas ornamentais. Além disso, essas pesquisas contribuem para obtenção de híbridos ornamentais de *Passiflora* adaptados à região, associando estudos de caracterizações fenotípicas, marcadores moleculares e citogenéticos, visando à diversificação e expansão do seu cultivo no sul da Bahia de forma sustentável, mantendo a biodiversidade e criando oportunidades para o agronegócio.

Em *Passiflora*, o cruzamento interespecífico para a obtenção de híbridos tem sido considerado uma ferramenta importante para obter germoplasmas com características únicas e voltadas para ornamentação (SANTOS et al., 2012; MELO et al., 2016). Esse fato ocorre por ampliar a oferta e variabilidade em flores, bem como, ampliar o tempo de duração do florescimento, flores mais vistosas e coloração intensa (SANTOS et al., 2012; MELO et al., 2016). Numerosas combinações híbridas de *Passiflora* têm sido produzidas, todas com a finalidade exclusivamente ornamental (VANDERPLANK, 2000), obtidos através de hibridações interespecíficas entre espécies silvestres (SANTOS et al., 2012; MELO et al., 2017; BELO et al., 2018; SOUZA et al., 2020). Nos programas de melhoramento, a hibridação interespecífica é bastante utilizada e o sucesso nas hibridações depende de uma série de fatores incluindo a compatibilidade genética entre as espécies envolvidas no cruzamento e a homologia cromossômica para obter híbridos mais viáveis (PEREIRA et al., 2005; LAVINSCKY

et al., 2017). Alguns estudos vêm sendo realizados no sentido de conhecer sobre a diversidade cariotípica e variabilidade genética de espécies silvestres do gênero *Passiflora* (MELO et al., 2001; SILVA et al., 2014; MELO et al., 2017), tendo em vista a necessidade de se conhecer sobre a estrutura e organização do genoma para criação de estratégias de conservação. O conhecimento sobre o comportamento cromossômico também permite a seleção de espécies com genótipos favoráveis para futuros programas de melhoramento (OHRI, 1998) envolvendo hibridações interespecíficas.

As técnicas de citogenéticas clássicas e moleculares têm sido fortemente aplicadas para a compreensão das relações entre as espécies, trazendo avanços significativos no estudo citotaxonômico (MELO et al., 2001, MELO; GUERRA, 2003), evolutivo (VIANA; SOUZA, 2012) e no melhoramento genético (SANTOS et al., 2012; MELO, 2014; MELO et al., 2017). A utilização de técnicas convencionais têm revelado parâmetros cariotípicos comuns a diversas espécies do gênero *Passiflora* (MELO et al., 2017). Além do conhecimento do número cromossômico, obtido pela coloração citogenética convencional, vem sendo aplicadas outras técnicas citogenéticas clássicas, como por exemplo, a utilização do bandamento C para a localização da heterocromatina constitutiva (VIANA; SOUZA, 2012). A localização de satélites (construção secundária) nos cariótipos das passifloras também vem sendo realizada através da simples coloração com fluorocromos base-específicos CMA₃ e DAPI, uma vez que as bandas CMA₃⁺ são restritas aos satélites em *Passiflora* (MELO et al., 2014). A identificação de blocos CMA₃⁺/DAPI tem revelado pouca variação em número, mas grandes variações na localização e posição desses blocos, demonstrando que a aplicação de fluorocromos possibilita uma análise comparativa entre espécies (MELO et al., 2001; MELO et al., 2014).

A análise do comportamento cromossômico na meiose também é de suma importância, por contribuir com estudos de relações filogenéticas e identificar similaridade entre genomas de espécies diferentes (TECHIO; DAVIDE, 2007; LAVINSCKY et al., 2017). Dessa forma, as análises meióticas conseguem fornecer informações detalhadas sobre o comportamento cromossômico e sobre a fertilidade de uma espécie, sendo considerada uma ferramenta importante para auxiliar em cruzamentos interespecíficos (KIIHL et al., 2011, LAVINSCKY et al., 2017). Estudos sobre a frequência e posição dos quiasmas ainda são pouco frequentes em *Passiflora* e a

observação do comportamento meiótico e da viabilidade polínica de espécies silvestres fornecem informações importantes sobre aspectos reprodutivos e genéticos, índice de recombinação, grau de irregularidade e viabilidade dos gametas (SOUZA et al., 2003) e contribuem para que cruzamentos sejam bem sucedidos na utilização dessas espécies em hibridações interespecíficas.

Algumas espécies e híbridos de *Passiflora* vêm sendo estudados indicando estabilidade meiótica e alta viabilidade polínica, como por exemplo as espécies *P. setacea*, *P. incarnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* (SOARES-SCOTT et al., 2003), *P. edmundoi* (SOUZA et al., 2003), *P. alata*, *P. rubra*, *P. mucronata* (SOUZA; PEREIRA, 2011), *P. gibertii*, *P. gardneri* e os híbridos *P. 'Gabriela'* e *P. 'Bella'* (BELO et al., 2018; LAVINSCKY et al., 2021), *P. coccinea*, *P. hatschbachii* e os híbridos *P. 'Vivis'* e *P. 'Jhovi'* (SOUZA et al., 2020). Percentuais elevados de grãos de pólen viáveis são esperados como resultado de altos percentuais de tétrades normais em consequência de uma meiose regular (CORRÊA et al., 2005). Entretanto, algumas irregularidades foram observadas no estudo da meiose em *Passiflora* como a presença de cromossomos retardatários, pontes anafásicas, irregularidades na orientação das fibras do fuso e assincronia (BARBOSA; VIEIRA, 1997; SOUZA et al., 2003; SOUZA; PEREIRA, 2011; LAVINSCKY et al., 2021), consequentemente essas alterações podem levar a formação de produtos pós-meióticos anormais como mônadas, díades, tríades e políadas e afetando a viabilidade polínica.

O presente estudo objetivou descrever sobre o cariótipo de duas espécies ameaçadas de extinção, *P. racemosa* e *P. malacophylla*, através de métodos citogenéticos clássicos e moleculares com a obtenção do ideograma, localização da heterocromatina rica em GC e aplicação da técnica Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) para localização dos sítios de DNAr 45S, 5S e telomérica. Além disso, foi analisado o comportamento meiótico e a viabilidade polínica de ambas as espécies e de híbridos triplos de *Passiflora*, denominados HD29 e HD30. Assim, o estudo citogenético permitiu caracterizar o cariótipo e avaliar a fertilidade das duas espécies, além de identificar quais as implicações da hibridação no genoma dos híbridos triplos através das análises meióticas e viabilidade polínica. Dessa forma, esses resultados poderão contribuir para a criação de medidas de conservação e para a seleção de espécies citogeneticamente mais estáveis para serem utilizadas na produção de híbridos

interespecíficos, em continuidade aos estudos que vêm sendo desenvolvidos por pesquisadores da UESC e assim, gerar conhecimentos adequados ao manejo das coleções de trabalho e ao melhoramento genético de maracujazeiros ornamentais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Passiflora* L., importância econômica e ornamental

A família Passifloraceae Juss. está taxonomicamente estruturada em 17 gêneros e cerca de 650 espécies (BERNACCI et al., 2013) que se encontram distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Na região neotropical (América) está a maior diversidade, com uma média de 500 espécies (ULMER; MACDOUGAL, 2004). No novo mundo a família é representada por cinco gêneros (*Passiflora* Mast, *Mitostemma* Mast, *Dilkea* Mast, *Ancistrothyrsus* Harms e *Tetrastylis* Ovalis), sendo o primeiro o mais representativo (ESCOBAR, 1988; MUSCHNER et al., 2003). A América do Sul é o centro de origem de mais de 95% das espécies do gênero, sendo o Brasil um dos principais centros de diversidade, com três gêneros relatados, *Passiflora*, *Dilkea* e *Mitostemma* e em torno de 200 espécies endêmicas (BERNACCI, 2013). No entanto, o número de espécies descritas no país tem aumentando constantemente devido ao relato de novos táxons (BERNACCI, SOUZA, 2012), atribuindo ao país uma posição privilegiada em termos de diversidade (FERREIRA, 1994; CERVI; SANTOS, 2000).

O gênero *Passiflora* foi estabelecido por Linnaeus, em 1735, o qual descreveu primeiramente a espécie *P. incarnata* L., utilizada até hoje na ornamentação (KILLIP, 1938; CERVI 1997; ABREU et al., 2009). A subdivisão do gênero *Passiflora* em quatro subgêneros (*Astropheia*, *Deidamioides*, *Decaloba*, e *Passiflora*) foi proposta por Ulmer e MacDougal (2004) utilizando principalmente aspectos morfológicos para a análise taxonômica. Estudos filogenéticos e taxonômicos mais recentes (HANSEN et al., 2006; MUSCHNER et al., 2012) utilizando marcadores moleculares demonstraram redução no número de subgêneros propostos por Killip's (1938), corroborando com os quatro gêneros sugeridos por Ulmer e MacDougal (2004).

Os representantes do gênero *Passiflora* possuem geralmente o hábito arbóreo, arbustivo, com extensa variabilidade morfológica, destacando-se dentre as demais

Angiospermas em termos de diversidade (MACDOUGAL, 1994). A característica mais marcante do gênero é a morfologia floral com simetria radial e a presença de discos nectaríferos na base do hipanto. Contudo, a presença diagnosticada de corona filamentosa é um descritor restrito às espécies do gênero, fato que sustenta a monofilia do grupo (JUDD et al., 1999). A presença de flores hermafroditas é observada em todas as passifloras, no entanto diferenças na biologia reprodutiva são constatadas em várias espécies, como por exemplo, no período de antese e no tempo de flor aberta, características importantes para indicação do recurso genético a programas de melhoramento genético com fins ornamentais. O período de antese das passifloras geralmente não ultrapassa um dia, salvo exceções, como nos táxons *P. eichleriana*, *P. bahiensis* Klotzsch., *P. aurantia* Forst., *P. cinnabarina* Lindl. e *P. jorullensis* Kunth., com maior período de flor aberta (ULMER; MACDOUGAL, 2004; ABREU et al., 2009).

A biologia reprodutiva do gênero *Passiflora* é caracterizada pela forte alogamia (polinização cruzada) existente no grupo, havendo poucas exceções a essa característica. Em passifloras a autoincompatibilidade favorece a alogamia promovendo a heterose, e, conseqüentemente, refletindo na diversidade genética intra- e interespecífica observada no grupo (LOSS, et al., 2006; MELETTI et al., 2005). A polinização natural realizada por insetos é uma característica marcante na biologia reprodutiva das passifloras. No maracujazeiro-azedo o principal agente polinizador é a abelha do gênero *Xylocopa* (mamangava), cujo porte possibilita e promove maior polinização ampliando o fluxo gênico (BENEVIDES et al., 2009).

As passifloras são popularmente conhecidas como maracujazeiros e largamente utilizadas para o consumo *in natura* e na indústria alimentícia, apresentando grande importância econômica na agricultura e na horticultura. As espécies de maior importância econômica no Brasil são *P. edulis* f. *favicarpa* e *P. alata*, sendo o país um dos maiores produtores e consumidores mundiais (AGRIANUAL, 2011). A utilização cosmética e farmacêutica das passifloras também é bastante representativa, as quais possuem flavonóides com atividade ansiolítica, hipnótica e sedativa (SAKALEM et al., 2012). A produção anual brasileira foi estimada em cerca de 690.364 toneladas/ha em 2020, revelando o potencial e a importância socioeconômica desta cultura ao Brasil (IBGE, 2020). O mercado comercial europeu é o principal importador da produção

Brasileira, o qual adquire cerca de 90% de todo consumo industrializado produzido (AGRIANUAL, 2011). O nordeste brasileiro é a região do país de maior produção (491.326t/ha), liderado pelo Ceará (199.725t/ha) e Bahia (197.160t/ha), seguido pelos estados de Santa Catarina (41.100t/ha), Pernambuco (40.509t/ha) e Minas Gerais (30.439t/ha) (IBGE, 2020).

As passifloras também possuem o status de planta ornamental por serem dotadas de atributos essenciais a esta utilização, como, flores vistosas, de coloração forte, brilhante e de beleza exótica, florescimentos mais de uma vez ao ano e grande capacidade de produção (ABREU et al., 2009). Adicionalmente, todos os representantes do gênero *Passiflora* possuem coroa, peça floral de beleza exuberante, a qual é uma característica diagnóstica para a taxonomia do grupo (ABREU et al., 2009). Apesar de espécies silvestres serem utilizadas diretamente para a ornamentação, os híbridos interespecíficos correspondem a uma importante parcela do recurso genético voltada à decoração (ABREU et al., 2009).

2.2 Espécies ameaçadas, estratégias de conservação e melhoramento genético

A seleção de passifloras potencialmente aplicáveis ao melhoramento genético tem sido realizada através da coleta de germoplasma silvestre, estratégia também aplicável à conservação do *pool* gênico constantemente ameaçado pela erosão genética causada por processos antropológicos (BERNACCI et al., 2005; FERREIRA; RANGEL, 2005). Infelizmente, muitos processos de urbanização, expansão de atividades agrícolas e agropecuárias têm reduzido drasticamente o habitat natural de diversas populações da fauna e flora, tendo como resultado a redução no tamanho das populações (FERREIRA, 2005). Uma grande problemática contemporânea na flora brasileira é o risco de extinção e conseqüentemente a perda de diversidade, fato que atinge vários grupos vegetais. Neste sentido, podem-se encontrar espécies de passifloras em processo de extinção, como por exemplo, os táxons endêmicos do estado do Rio de Janeiro: *P. campanulata* Mast., *P. setulosa* Killip, *P. malacophylla* Mast. e *P. racemosa* Brot. (HERBÁRIO IAC, 2014). A implantação de ações e estratégias para conservação de passifloras ainda é incipiente (CERQUEIRA-SILVA et al., 2016). Assim, existe uma necessidade de tomar medidas para conservação imediata de espécies silvestres ameaçadas de extinção

e preservação dos recursos naturais em diversas regiões (KUSWANTO et al., 2022) do país e do mundo.

A caracterização do recurso genético é essencial para a condução de estratégias de conservação e para futuros programas de melhoramento por possibilitar a seleção de plantas promissoras, além do mais a caracterização certifica a estabilidade de uma cultivar pós-melhoramento (BELO, 2010; SANTOS et al., 2012). A conservação do germoplasma de espécies silvestres é necessária para manter a variabilidade genética e permitir o acesso futuro a essas coleções (ABREU et al. 2009), principalmente às espécies em risco de extinção. No Brasil, a maior parte do germoplasma de passifloras é conservado em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), mantidos por instituições públicas, como por exemplo, o BAG da Embrapa Cerrados, a Coleção da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e o BAG da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). As análises citogenéticas clássica e molecular como, caracterização cariotípica, análises meióticas, viabilidade polínica, têm contribuído para o conhecimento da diversidade cariotípica e genética de muitas espécies (TRIVEDI; ROY, 1970; DANE; TSUCHIYA, 1976), sendo utilizadas para subsidiar estudos de conservação.

Em passifloras a caracterização pré-melhoramento de espécies silvestres tem possibilitado a seleção de plantas candidatas ao melhoramento genético envolvendo o método de hibridações interespecíficas, seja com a finalidade na produção de novas variedades ornamentais ou na introdução de resistência a doenças (JUNQUEIRA et al., 2007). O melhoramento genético do maracujá-azedo, o qual corresponde a 95% do plantio nacional de *Passiflora* (MELETTI et al., 2011), está voltado à melhoria na qualidade do fruto, no aumento da produção e na transferência de genes de resistência, principalmente a fatores bióticos. Pode-se citar que as espécies *P. cincinnata*, *P. caerulea*, *P. incarnata*, *P. maliformis*, *P. foetida*, *P. nitida*, *P. quadrangularis* e *P. setacea* possuem genes de resistência a doenças que acometem o maracujazeiro, e desta forma, possuem potencial como fonte de genes, ampliando a variabilidade para o melhoramento genético envolvendo hibridações (JUNQUEIRA et al., 2006).

2.3 Caracterização mitótica em *Passiflora*

Os estudos citogenéticos já realizados nas espécies do gênero *Passiflora* trouxeram grandes contribuições para o conhecimento taxonômico e evolutivo do grupo. De acordo com o Index to Plant Chromosome Numbers (IPCN) os números cromossômicos de apenas 13.5% das espécies do gênero *Passiflora* já foram reportados. No geral, as passifloras são diplóides com $2n = 12$, $2n = 18$ e $2n = 20$ (MELO et al., 2001; SOUZA et al., 2008). O gênero possui número básico primário ($x = 6$), no entanto números básicos secundários foram propostos ao menos para um grupo citotaxonômico específico ($x = 9, 10, 12$) (STOREY, 1950; MELO et al., 2001; HANSEN et al., 2006). Estudos recentes baseados em sequências indicam $x = 6$ como o número básico mais provável, sustentando a árvore filogenética do gênero (MELO et al., 2001) porém alguns ainda consideram o número básico $x = 12$ como sendo ancestral dentro do gênero e os demais números básicos considerados secundários (HANSEN et al., 2006). Cada par de cromossomos representa um papel importante no desenvolvimento do indivíduo e o número cromossômico de uma espécie é um dado importante para estudos filogenéticos, taxonômico e para técnicas de hibridação (GUERRA, 1988). A variação do número cromossômico das espécies, quando não conhecida, pode interferir nos programas de melhoramento genético e na criação de híbridos interespecíficos (LAVINSCKY, et al. 2017).

A evolução citogenética do grupo teve como base os eventos de aneuploidia e poliploidia, acarretando variações numéricas observadas entre seções ou subgêneros (MELO et al., 2001; SOUZA et al., 2008). As espécies do gênero *Passiflora* possuem cromossomos com morfologia variando de meta- a submetacêntrico, com o complemento cromossômico total variando de 32.9 μm a 62.3 μm (SOUZA et al., 2003; VIEIRA et al., 2004). De acordo com Stebbins (1971), a presença de cariótipo assimétrico indica, evolutivamente, uma característica derivada. As variações existentes entre os cariótipos das passifloras, em parâmetros como morfologia cromossômica e número de satélites, estão presente tanto de forma intra- quanto interespecíficas, demonstrando padrões citológicos particulares a subgêneros e seções botânicas (SNOW; MACDOUGAL, 1993; MAYEDA, 1997; SOUZA et al., 2008; VIANA; SOUZA, 2012).

Em *Passiflora*, a aplicação da coloração diferencial com nitrato de prata foi realizada por Mayeda (1997) nas espécies *P. alata*, *P. amethystina*, *P. coccinea*, *P.*

edulis f. *flavicarpa*, *P. incarnata* e *P. maliformis*, indicando que algumas espécies apresentam mais de um par cromossômico com RON, como por exemplo *P. coccinea*. Já a utilização de fluorocromos base-específicos DAPI e CMA₃ realizada em oito espécies de *Passiflora* (*P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. capsularis*, *P. edulis* f. *edulis*, *P. foetida*, *P. racemosa*, *P. rubra* e *P. tricuspis*), possibilitou a visualização de um a três pares de blocos CMA⁺/DAPI relacionados a constrições secundárias, no entanto não foi constatada a presença de blocos DAPI⁺. Tais contribuições sugerem que tanto o número quanto a localização de satélites e constrições secundárias são marcadores citológicos importantes para a análise cariotípica comparativa de táxons do gênero *Passiflora* (MELO et al., 2001).

A caracterização citogenética realizada através da FISH tem demonstrado variações, principalmente em nível taxonômico, no número de sítios de hibridação de DNAr 45S e 5S (MELO et al., 2003). O mapeamento das regiões de DNAr 45S em *P. edulis* f. *edulis* e em *P. amethystina* demonstraram a presença de quatro sítios de DNAr 45S para *P. edulis* f. *edulis* e seis sítios para *P. amethystina* (CUCO et al., 2001). O número de sítios de DNA ribossômico 45S tem apresentado relação ao nível de ploidia das espécies do gênero *Passiflora*. Entretanto, verificou-se o silenciamento de alguns sítios gênicos de DNAr 5S em espécies consideradas de origem paleopoliploides (MELO; GUERRA, 2003). Sítios de hibridação de DNAr 45S subsidiou a delimitação entre táxons, sugerindo a existência de polimorfismo atribuído a rearranjo cromossômico (VIANA; SOUZA, 2012). Em *Passiflora*, a diferenciação genômica realizada através da técnica de GISH tem sido relatada em alguns estudos principalmente para confirmação de híbridos (MELO et al., 2015; SILVA et al., 2018; SOUZA et al., 2020; LAVINSCKY et al., 2021)

2.4 Caracterização meiótica em *Passiflora*

A meiose representa uma série de eventos altamente conservados e coordenados e estudos citológicos e moleculares vêm sendo realizados em diferentes organismos para compreender como o material genético é passado de geração para geração (BOATENG et al., 2008). O estudo sobre a biologia reprodutiva, juntamente com dados cariotípicos fornecem informações importantes para caracterização de uma espécie e

contribui para montar estratégias de conservação e futuros programas de melhoramento genético, considerando que na meiose ocorre a recombinação de genes, sendo uma fonte de variabilidade genética (FACHINETTO; TEDESCO, 2009). A avaliação do comportamento meiótico permite identificar anormalidades que afetam a fertilidade e mutações que podem ser exploradas com sucesso nos programas de melhoramento (PAGLIARINI, 2000).

Alguns estudos foram realizados para identificar o grau de pareamento cromossômico de diversas espécies de *Passiflora*. Foram observadas diferentes associações cromossômicas com predominância de bivalentes, entretanto, foram encontradas também outras associações como univalentes e tetravalentes (SOUZA; PEREIRA, 2011; PEREIRA et al., 2017; LAVINSCKY et al., 2021). A formação do complexo sinaptonêmico permite o pareamento entre os cromossomos homólogos, chamados de bivalentes, ocorrendo o crossing-over, evento muito importante para gerar variabilidade genética (BASS et al., 2003). A utilização de dados sobre o pareamento cromossômico é útil na seleção de genótipos para produção de híbridos interespecíficos, já que o grau de homologia entre cromossomos homeólogos demonstra o grau de proximidade entre os genitores (TECHIO; DAVIDE, 2007). Muitas espécies e híbridos apresentaram meiose regular como as espécies *P. setacea*, *P. incarnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* que apresentaram formação de bivalentes e grãos de pólen viáveis (SOARES-SCOTT et al., 2003), *P. edmundoi* (SOUZA et al., 2003), *P. alata*, *P. rubra*, *P. mucronata* (SOUZA; PEREIRA, 2011), *P. subblanceolata*, *P. foetida* var. *foetida*, e os híbridos *P. 'Alva'*, *P. 'Aninha'* e *P. 'Priscilla'* (SANTOS et al., 2012), *P. gibertii*, *P. gardneri* e os híbridos *P. 'Gabriela'* e *P. 'Bella'* (BELO et al., 2018; LAVINSCKY et al., 2021), *P. coccinea*, *P. hatschbachii* e os híbridos *P. 'Vivis'* e *P. 'Jhovi'* (SOUZA et al., 2020).

Eventos citogenéticos fundamentais na meiose, como o reconhecimento e pareamento de cromossomos homólogos, *crossing over*, disjunção cromossômica e formação de complexos recombinantes são os principais elementos envolvidos na análise citogenética antes e durante o processo meiótico (SCHWARZACHER, 2003). A instabilidade meiótica causada por irregularidades pode afetar a fertilidade de uma espécie ou híbrido podendo levar a decadência de uma cultivar, sendo de grande

importância análises citológicas contínuas (PAGLIARINI, 2001). A fertilidade de uma planta depende em grande parte da regularidade da meiose.

A compreensão da fertilidade de espécies selecionadas para hibridação intra ou interespecífica aumenta as chances dos cruzamentos serem bem sucedidos (MARTINS et al., 2010). A análise meiótica pode ser importante para escolher espécies que apresentem estabilidade meiótica e que possuam altos índices de grãos de pólen viáveis para contribuir no planejamento de programas de melhoramento (LAVINSCKY et al., 2017). A viabilidade polínica é considerada uma importante ferramenta para medir a fertilidade do gameta masculino e pode ser determinada pela utilização de diversas metodologias (OLIVEIRA et al., 2001). Fatores bióticos e abióticos podem interferir na fertilidade de diversas espécies silvestres que não estão em seu habitat natural (SOUZA et al., 2004). Um estudo realizado em 17 espécies de *Passiflora* silvestres e domesticadas indicou índices acima de 90% em todas as espécies, exceto em *P. pentagona* que obteve 78% de viabilidade (SOUZA et al., 2004). A viabilidade polínica de *P. edulis*, *P. incarnata*, *P. setacea* e de dois híbridos foi observada indicando índices de grãos de pólen viáveis de 94,3%, 70,2% e 81,2%, respectivamente. Para os híbridos a média ficou em torno de 37,2% no híbrido somático e 65,76% no híbrido sexuado (SOARES-SCOTT et al., 2003). A viabilidade polínica é alta em passifloras, acima de 70% de grãos de pólen viáveis (SOUZA et al., 2002) na maioria das espécies estudadas (SOARES-SCOTT et al., 2003; SOUZA et al., 2004; SANTOS et al., 2012; LAVINSCKY et al., 2021).

Técnicas de citogenética molecular, como a GISH tem sido utilizada com grande sucesso no estudo de plantas, em diferentes abordagens, incluindo na compreensão do comportamento meiótico, como ocorre o pareamento entre cromossomos homólogos ou se ocorre entre cromossomos homeólogos (SILVA; SOUZA, 2013; LAVINSCKY et al., 2021). Os estudos envolvendo citogenética clássica e molecular em *Passiflora* trazem contribuições indispensáveis para estratégias de conservação e melhoramento genético de espécies.

2.5 Híbridos interespecíficos de *Passiflora*

Entende-se por híbrido, o cruzamento interespecífico entre dois genitores com genótipos diferentes que irá originar um indivíduo com características intermediárias e que carregam genes de interesse. Diversas são as formas de hibridação e o tipo mais comum envolve indivíduos de espécies que se reproduzem de forma sexuada por polinização cruzada e como consequência do cruzamento dão origem a descendentes variáveis, resultantes da segregação e recombinação de genes (ALLARD, 1960; VANDERPLANK, 2000; GRIFFITHS et al., 1998).

O primeiro híbrido artificial de *Passiflora* obtido foi *P. violacea* em 1819 (*P. caurelea* x *P. racemosa*), produzido por Thomas Milne através de hibridação sexual (VANDERPLANK, 2000). Ainda é desconhecido para qual finalidade foi obtido esse híbrido, mas acredita-se que tenha sido para fins de ornamentação, já que só depois da obtenção desse híbrido que surgiu a necessidade de expandir a ideia de hibridação de passifloras para uso ornamental pela Europa (ABREU et al., 2009). A obtenção de híbridos de *Passiflora* tem sido realizada com sucesso através da simples hibridação sexual e por meio da hibridação somática (LIMA et al., 2000). As hibridações interespecíficas em *Passiflora* possuem geralmente o objetivo de aumentar o valor ornamental, e são eficientemente realizadas entre espécies filogeneticamente próximas, com fracas barreiras reprodutivas, mas com compatibilidade genômica e citogenética suficientes para o sucesso da obtenção de progênies (BELO, 2010; SANTOS et al., 2012).

Numerosas combinações híbridas de *Passiflora* têm sido produzidas, sendo a maioria com a finalidade exclusivamente ornamental (VANDERPLANK, 2000). Nos programas de melhoramento, a hibridação interespecífica é bastante utilizada e o sucesso nas hibridações depende de uma série de fatores incluindo a compatibilidade genética entre as espécies envolvidas no cruzamento e a homologia cromossômica para obter híbridos viáveis (PEREIRA et al., 2005).

Em *Passiflora*, a técnica de hibridação é relativamente simples (MELETTI et al., 2005), uma vez que na maioria das espécies o florescimento é abundante e ocorre durante quase todo o ano, com flores grandes assim como, as anteras e os estigmas o que facilita a polinização (BRUCKNER; OTONI, 1999). Entretanto, deve-se salientar a existência de híbridos naturais ocasionados por diversos fatores evolutivos, mas principalmente pelo mecanismo de autoincompatibilidade comum às espécies de

maracujazeiro (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002). O processo de incompatibilidade pode ocorrer em qualquer estágio, podendo ser desde a polinização até a fertilização (BRUCKNER et al., 1995). A autoincompatibilidade é a incapacidade de uma planta fértil, quando autopolinizada, de produzir sementes, sendo uma barreira reprodutiva para diversas espécies. É um mecanismo fisiológico, com base genética e é resultante do fracasso do grão de pólen da própria planta de aderir ou germinar no estigma (SCHIFINO-WITTMANN; DALL'AGNOL, 2002).

No maracujazeiro a autoincompatibilidade pode ser útil na produção de híbridos, pois torna necessário, quase sempre, a polinização cruzada (BRUCKNER et al., 2005). As hibridações interespecíficas não têm sido exploradas adequadamente pelos programas de melhoramento e no Brasil, muitos híbridos apresentam problemas de desenvolvimento, suscetibilidade às doenças, macho esterilidade, baixa viabilidade polínica, baixo florescimento em alguns cruzamentos, entre outros (OLIVEIRA; RUGGIERO, 1998; MELETTI; BRUCKNER, 2001). Embora existam algumas dificuldades na obtenção de híbridos através da hibridação sexuada, essa técnica é uma ferramenta muito importante, pois possibilita a introgressão de novos genes de interesse e uma maior variabilidade genética, além de ser um método simples (SIQUEIRA et al., 1988; VANDERPLANK, 2000; ULMER; MACDOUGAL, 2004).

No Brasil a grande variabilidade genética torna possível a exploração de híbridos interespecíficos, entretanto, essa possibilidade é pouco explorada no país (ABREU et al., 2009). As hibridações interespecíficas possuem importância na ornamentação, por permitirem a obtenção de plantas com características únicas, ampliando a possibilidade de produtores em países onde a exploração ornamental das passifloras é comum (ABREU et al., 2009). A variabilidade genética das passifloras vem sendo estudada em pesquisas na Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) na cidade de Ilhéus (BA) desde 2004 com a fundação de uma coleção de passifloras da UESC, o qual mantém tanto espécies silvestres e cultivadas, quanto de táxons endêmicos e exóticos. Na UESC vêm sendo realizada a obtenção de híbridos interespecíficos de passifloras com potencial ornamental, cujo foco principal é o desenvolvimento de plantas voltadas às condições edafoclimáticas brasileiras (BELO, 2010; SANTOS et al., 2012), visando a ornamentação de interiores. Com o avanço do uso de passifloras com a finalidade ornamental, a produção de híbridos tem ganhado

mais espaço e vários híbridos estão sendo obtidos com essa finalidade (ABREU et al., 2009) e registrados como, *Passiflora*. ‘Alva’ (referência de registro: #120), *P.* ‘Aninha’ (#121), *P.* ‘Priscilla’ (#122) (SANTOS et al., 2012), *P.* ‘Gabriela’ (#170) e *P.* ‘Bella’ (#171) (BELO et al., 2018) (www.passiflorasociety.org/wp-content/uploads/2012/08/Passiflora-cultivars-2008-2010.pdf) e *P.* ‘Vivis’ e *P.* ‘Jhovi’ (SOUZA et al., 2020). Também foram obtidos híbridos interespecíficos do cruzamento de sete espécies de *Passiflora* com finalidade ornamental e esses híbridos foram retrocruzados para obter progênies de cruzamentos entre híbridos e verificar a compatibilidade reprodutiva entre os genitores (CONCEIÇÃO et al., 2011).

CAPÍTULO I

3. CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA E ANÁLISE MEIÓTICA EM ESPÉCIES PRESUMIVELMENTE EXTINTAS NA NATUREZA: *Passiflora racemosa* e *Passiflora malacophylla*.

EXTRATO

A caracterização cariotípica e a análise do comportamento meiótico foram analisadas em espécies do gênero *Passiflora*, *P. racemosa* Brot. e *P. malacophylla* Mast, ambas presumivelmente extintas na natureza. Considerando que a análise citogenética é um recurso utilizado na caracterização de espécies e contribui para a seleção de genótipos com características interessantes para conservação de plantas ornamentais silvestres, este estudo teve como objetivo realizar a caracterização cariotípica, meiótica e analisar a viabilidade polínica das espécies *P. racemosa* e *P. malacophylla*. A análise cariotípica revelou estabilidade no número cromossômico com $2n = 18$ para ambas as espécies analisadas. O comprimento cromossômico médio foi de 3,27 μm e 2,42 μm para *P. racemosa* e *P. malacophylla*, respectivamente, com fórmulas cariotípicas de $2n = 18m$ e $2n = 14m + 4sm$. Foram observados três e dois pares cromossômicos satelitados com blocos CMA_3^+ /DAPI e também sítios de DNAr 45S nas espécies *P. racemosa* e *P. malacophylla*, respectivamente. Um par cromossômico em ambas as espécies com sítio de DNAr 5S foi observado. O comportamento meiótico foi estável, com valor de $n = 9$, prevalecendo a formação de bivalentes e quiasmas intersticiais observados na fase de diacinese. Nas fases de metáfase, anáfase e telófase I e II observou-se regularidade na orientação das fibras do fuso, cromossomos alinhados na placa metafásica e formação de quatro núcleos haploides. O índice meiótico foi acima de 90% em ambas as espécies, sugerindo estabilidade meiótica e alto índice de grãos de pólen viáveis. Algumas irregularidades também foram observadas, tais como cromossomos retardatários, assincronia e formação de fuso transversal ou tripolar, sendo essas também responsáveis por alguns produtos pós-meióticos anormais. As caracterizações realizadas mostraram que o cariótipo das espécies possuem similaridades com outras espécies do subgênero *Passiflora*, o comportamento meiótico e a viabilidade polínica revelaram estabilidade meiótica e esses dados fornecem informações importantes para estudos sobre a diversidade genética de plantas silvestres e contribui para o planejamento de ações para conservação, já que a intensidade da exploração do habitat natural tem afetado as populações destas espécies, indicando a necessidade de conservação imediata.

Palavras-chave: cariótipo, comportamento meiótico, viabilidade polínica, FISH, conservação.

ABSTRACT

Karyotypic characterization and analysis of meiotic behavior were analyzed in species of the genus *Passiflora*, *P. racemosa* Brot. and *P. malacophylla* Mast, both presumably extinct in the wild. Considering that cytogenetic analysis is a resource used in the characterization of species and contributes to the selection of genotypes with interesting characteristics for the conservation of wild ornamental plants, this study aimed to carry out the karyotypic and meiotic characterization and analyze the pollen viability of *P. racemosa* and *P. malacophylla*. The karyotypic analysis revealed stability in the chromosome number with $2n = 18$ for both species analyzed. The mean chromosome length was $3.27 \mu\text{m}$ and $2.42 \mu\text{m}$ for *P. racemosa* and *P. malacophylla*, respectively, with karyotypic formulas of $2n = 18\text{m}$ and $2n = 14\text{m} + 4\text{sm}$. Three and two satellite chromosome pairs with $\text{CMA}_3^+/\text{DAPI}$ blocks and also 45S rDNA sites were observed in *P. racemosa* and *P. malacophylla* species, respectively. A chromosomal pair in both species with a 5S rDNA site was observed. Meiotic behavior was stable, with a value of $n = 9$, prevailing the formation of bivalents and interstitial chiasms observed in the diakinesis phase. In the phases of metaphase, anaphase and telophase I and II, regularity was observed in the orientation of the spindle fibers, chromosomes aligned in the metaphase plate and formation of four haploid nuclei. The meiotic index was above 90% in both species, suggesting meiotic stability and a high index of viable pollen grains. Some irregularities were also observed, such as laggard chromosomes, asynchrony and transverse or tripolar spindle formation, which are also responsible for some abnormal post-meiotic products. The characterizations carried out showed that the karyotype of the species has similarities with other species of the subgenus *Passiflora*, the meiotic behavior and pollen viability revealed meiotic stability and these data provide important information for studies on the genetic diversity of wild plants and contribute to the planning of actions for conservation, since the intensity of exploitation of the natural habitat has affected the populations of these species, indicating the need for immediate conservation.

Keywords: karyotypic, meiotic behavior, pollen viability, FISH, conservation.

3.1 INTRODUÇÃO

A família Passifloraceae A.L. de Jussieu ex Kunth compreende 17 gêneros e mais de 650 espécies (BERNACCI et al., 2013), sendo o gênero *Passiflora* L. o maior e o mais importante desta família, com cerca de 525 espécies (CERVI; IMIG, 2013). As espécies dessa família crescem nas regiões tropicais e subtropicais (SANTOS; REZENDE, 2006). Estima-se que, em média, de 150 a 200 espécies de maracujazeiro são nativas do Brasil (BERNACCI et al., 2005). Algumas espécies são cultivadas comercialmente para a produção de frutos, entretanto existem espécies que são utilizadas para uso medicinal (ABREU et al., 2009; LIMA et al., 2011) e também com a finalidade ornamental (BERNACCI et al., 2005).

As passifloras são, em sua maioria, plantas trepadeiras, com flores pendentes, vistosas e perfumadas, consideradas exóticas e complexas, umas com coloração forte e brilhante, ou ainda com coloração suave e marcante (PEIXOTO, 2005; ABREU et al., 2009). Devido a sua beleza, desde o século XVII, algumas espécies de passifloras são cultivadas em casas de vegetação e usadas como plantas ornamentais (ABREU et al., 2009). O Brasil é considerado o grande centro de diversidade do gênero *Passiflora* e possui um amplo banco genético *in vivo*, entretanto, ainda é muito pequeno o uso das passifloras com a finalidade ornamental. No entanto, existe um grande interesse em relação ao uso de algumas espécies como plantas ornamentais de interiores, como *P. alata* Curtis (DURANTE, 2013; CARINI, 2014), já que esse mercado permite maior interação entre as pessoas, melhoram a estética e modificam o ambiente (ILYAS et al., 2021; KUSWANTO et al., 2022).

Muitas espécies silvestres da flora e fauna estão perdendo seu habitat natural, com o uso excessivo dos recursos e o desenvolvimento comercial devido à conversão de florestas em pastagens, agricultura, campos e etc (CORLETT, 2016; CROSS et al., 2020), inclusive as passifloráceas (SILVA et al. 2016), como exemplo *P. racemosa* Brot. e *P. malacophylla* Mast. consideradas presumivelmente extintas na natureza (HERBÁRIO IAC, 2014). A espécie *P. racemosa*, nativa do estado do Rio de Janeiro, é uma das poucas espécies que produzem cachos de flores. Estes cachos podem suportar de 5 a 30 flores vermelhas brilhantes, que abrem gradativamente, no máximo três flores estarão abertas ao mesmo tempo. Enquanto a maioria das passifloras produzem botões

florais nas pontas dos ramos, *P. racemosa* produz botões como brotos laterais curtos na parte debaixo da planta, característica desta espécie (ULMER; MACDOUGAL, 2004). *P. malacophylla*, nativa dos estados da Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina (SOUZA; MELETTI, 1997), é uma liana, com folhas simples e alternas e com gavinhas bem desenvolvidas.

Grande parte do potencial genético encontrado dentro do gênero *Passiflora* está sendo perdido (FERREIRA, 2005) assim, tem se tornado urgente à criação de medidas para conservação imediata de espécies silvestres e preservação dos recursos genéticos e poucos esforços têm sido feitos para conservação de plantas ornamentais silvestres em diversas regiões (KUSWANTO et al., 2022). No Brasil, algumas formas de conservação do germoplasma de passifloras têm sido realizadas principalmente em Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), mantidos por instituições públicas, como por exemplo, o BAG da Embrapa Cerrados, a Coleção da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e o BAG da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Estas instituições mantêm uma grande variabilidade de espécies e acessos que possuem grande potencial para utilização nos setores agrônomicos, medicinal e ornamental (FALEIRO et al., 2017).

Atualmente, as análises citogenéticas clássica e molecular, associadas a ferramentas de bioinformática e estudos genômicos, têm contribuído para o conhecimento da diversidade cariotípica e genética de algumas espécies (TRIVEDI; ROY, 1970; DANE; TSUCHIYA, 1976), sendo utilizadas para subsidiar estudos de conservação, filogenéticos, taxonômicos e evolutivos. A análise cariotípica com coloração convencional em espécies silvestres e híbridos é atualmente a abordagem mais utilizada para conhecer as relações entre táxons (MELO et al., 2001; SOUZA et al., 2008). O número e a posição de satélites é uma característica cariotípica utilizada na análise comparativa de espécies de *Passiflora* (MELO et al., 2001; MELO; GUERRA, 2003; SOUZA et al., 2008; VIANA; SOUZA, 2010) e, apesar da conservação na quantidade de satélites, a posição tem sido variável entre representantes do mesmo grupo taxonômico (SOUZA et al., 2008; VIANA; SOUZA, 2012).

A utilização dos fluorocromos base-específicos CMA₃ (chromomycin A3) e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) são importantes para a localização de satélites em diversos grupos vegetais, possibilitando, inclusive a localização de marcadores

espécie-específicos (MELO et 2017; MELO et al., 2017; SILVA et al., 2018; PAMPONÉT et al., 2019). Os sítios de DNAr 45S e 5S são sequências conservadas nos cromossomos e podem fornecer informações valiosas sobre a evolução do cariótipo e as inter-relações entre espécies (MELO; GUERRA, 2003). Por outro lado, a citogenética molecular, através da técnica de Hibridação Fluorescente *In Situ* (FISH), tem refinado os estudos sobre caracterização cariotípica, confirmação de híbridos e localização de sequências de DNA repetitivo (LAVINSCKY et al., 2017).

O estudo da meiose em passifloras tem sido relevante para se obter informações quanto a viabilidade das espécies e contribuir para criação de programas de manejo e conservação de espécies ameaçadas, considerando que na meiose ocorre a recombinação de genes, sendo uma fonte de variabilidade genética (FACHINETTO; TEDESCO, 2009). As análises meióticas fornecem informações detalhadas sobre o comportamento cromossômico e sobre a fertilidade de uma espécie, sendo considerada uma ferramenta importante para auxiliar também em futuros cruzamentos interespecíficos (KIIHL et al., 2011). A observação do comportamento meiótico de espécies silvestres pode fornecer informações importantes sobre a estabilidade do genoma, taxa de recombinação, grau de irregularidades, além de auxiliar no entendimento sobre a viabilidade polínica (SOUZA et al., 2003; SILVA, 2008). Percentuais elevados de grãos de pólen viáveis são esperados como resultado de uma meiose regular (CORRÊA et al., 2005), e conseqüentemente uma alta taxa de fertilidade da planta. A citogenética pode fornecer informações essenciais para o manejo e conservação de espécies ameaçadas de extinção (POTTER; DEAKIN, 2018).

O presente trabalho teve como objetivo realizar citogenética clássica e molecular, visando a caracterização do cariótipo, a localização da heterocromatina rica em GC e a localização dos sítios DNAr 45S, 5S e telomérica em *P. racemosa* e *P. malacophylla*, além de analisar o comportamento meiótico e a viabilidade polínica de ambas as espécies. Desta forma pretende-se verificar a diversidade cariotípica do subgênero *Passiflora* com a caracterização das espécies e contribuir para a seleção de genótipos com características interessantes e obter informações importantes para estudos sobre conservação de espécies silvestres ameaçadas de extinção com grande potencial ornamental.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material Vegetal

As espécies *P. racemosa* (Búzios – RJ) e *P. malacophylla* (Acesso 519, BAG UESC) (Figura 1) foram mantidas dentro da casa de vegetação com teto e laterais em tela sombrite de 50% e à pleno sol, para obtenção de botões florais e flores abertas, na Coleção de Passifloras da Universidade Estadual Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, Brasil (14° 39' S, 30° 10' W; 78 m de altitude). As plantas foram podadas mensalmente e regadas todos os dias. A nutrição das plantas foi realizada todo mês com 23,3 g/L de uréia e uma solução de micronutrientes (1,019 g/L Bo; 2,5 g/L Cu; 0,14 g/L Mo; 8,4 g/L Zn; 5,58 g/L Mn), 15g/L de KCl a cada três meses e 34,3 g/L de fosfato de amônia (MAP) a cada seis meses. O controle de pragas foi realizado com o defensivo agrícola Decis® e Vertimec® e o nematicida Furadan®. Os fungos foram controlados com pulverização de produtos a base de cobre (Fungitol).



Figura 1. Espécies do gênero *Passiflora* analisadas (A) *P. racemosa* e (B) *P. malacophylla*, cultivadas em casa de vegetação – UESC.

3.2.2. Preparo de lâminas com metáfases mitóticas

Estacas das plantas matrizes foram feitas periodicamente para obtenção de ponta de raiz e cultivadas em saquinhos de polietileno com volume de 1 L, contendo areia lavada. Ápices de raízes com aproximadamente 1 cm de comprimento foram coletados de estacas e pré-tratados em solução de 8-hidroxiquinolina 0,002 M em temperatura

ambiente (TA) por 1 h e posteriormente em ± 10 °C por 21 h. Após esse período, foram lavados 2x em água destilada, por 5 min cada e fixados em Carnoy I (etanol-ácido acético 3:1, v/v; JOHANSEN, 1940) por 3 h em TA e estocados a -20 °C até a preparação das lâminas.

O protocolo proposto por Guerra e Souza (2002) foi utilizado para o preparo das lâminas citológicas. Os ápices das raízes foram lavados 2x em água destilada e incubados em 50 μ L de solução enzimática contendo celulase 2% e pectinase 20% por 60 a 90 min em estufa (37 °C). Após a digestão enzimática, os ápices foram lavados 2x em água destilada, por 5 min cada, secos com papel de filtro e adicionado 10 μ L de ácido acético 45%. Os ápices das raízes foram macerados com o auxílio de agulhas. Após a maceração foi colocado uma lamínula, pressionada gentilmente com os dedos utilizando papel de filtro para espalhamento do material citológico e em seguida com o auxílio de uma seringa de ponta grossa para espalhamento dos cromossomos. Após esse processo, as lâminas foram colocadas para congelar em nitrogênio líquido e a retirada das lamínulas foi realizada com o auxílio de um bisturi. Em seguida, as lâminas foram secas ao ar e estocadas em -20 °C até o momento do uso.

3.2.3 Coloração convencional e bandamento CMA₃/DAPI

As lâminas foram coradas com Giemsa 2% por 20 min, seguidas de secagem ao ar e montadas com meio Neo-Mount[®]. As cinco melhores metáfases de cada espécie foram fotografadas em microscópio Olympus BX41, equipado com câmera digital DP25 5 megapixels, utilizando o *software* DP2-BSW (Olympus). Os braços cromossômicos foram mensurados e os kariogramas foram montados com a utilização do *software* Adobe[®] Photoshop CS6. Os dados cariomorfométrico foram utilizados para o cálculo do tamanho cromossômico médio (CT) de cada espécie, valor que foi submetido a análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade para a verificação de diferença significativa. Adicionalmente, foi calculado o comprimento do lote haplóide, pela soma do tamanho cromossômico médio de cada cromossomo do complemento cariotípico. Foi realizado o cálculo do índice de assimetria (TF%) de acordo com Huziwarra, 1962 e a fórmula cariotípica foi obtida de acordo com a classificação proposta por Levan et al., (1964).

A localização da heterocromatina base-específica, rica em GC e AT, foi realizada utilizando os fluorocromos CMA₃ e DAPI. A dupla coloração consistiu na aplicação de 10 µl de CMA₃ (0,25 mg/ml) sobre a lâmina por 1 h; depois de lavadas com água destilada e secas, e aplicado 10 µl de DAPI (Vector[®])(0,5 mg/ml) por 30 min. Após este tempo, as lâminas foram lavadas com água destilada, secas e montadas com 15 µl do meio de montagem glicerol/MacIlvaine (1:1 v/v) contendo 2,5 mM de MgCl₂. As preparações foram cobertas com lamínula de 20 x 20 mm, envelhecidas por três dias e mantidas a ±10 °C até a análise (GUERRA; SOUZA, 2002). As metáfases foram fotodocumentadas com a utilização do microscópio de epifluorescência Olympus BX41 equipado com câmera digital 5M Olympus DP25 e com software DP2-BSW. Para visualização do DAPI foi utilizado um filtro U-MWU (330-385 nm de excitação/400 nm de corte dicróico/>420 nm de emissão) e para visualização do CMA₃ foi utilizado um filtro U-MWB (450-480 nm de excitação/500 nm de corte dicróico/>515 nm de emissão). As sobreposições CMA₃/DAPI foram realizadas utilizando *software* Adobe[®] Photoshop CS6.

3.2.4 Preparo de sondas para Híbridação Fluorescente In Situ (FISH)

Primers para amplificação parcial do gene 26S de *Passiflora* Pe26S-rDNA-F 5'-GGCTGAATCTCAGTGGATCG-3' e Pe26S-rDNA-R 5'-GCTGTCGGTGGACTGCTC-3' (SILVA, 2017) foram utilizados para a elaboração de sondas para sítios de DNAr 45S, as quais foram marcadas com biotin16-dUTP via *Nick translation* seguindo o protocolo do fabricante (Roche Diagnostics[®]).

As sondas para sítios de DNAr 5S foram obtidas a partir do produto da reação em cadeia da polimerase (PCR) com o par de *primer* específico para *Passiflora* 5'-GTGCGATCATAACCAG C(AG)(CT)TAATGCACCGG-3' e 5'-GAGGTGCAACACGAGGACTTCCCAGGA GG-3' (MELO; GUERRA, 2003). Para obtenção dos sítios teloméricos foi utilizado o seguinte par de primers: 5'-AAATCCCAAATCCCAAATCCCAAATCCCAAATCCCAAATCCC-3' e 5'-TTTAGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGGGTTTAGCGTTTAGG-3' (BELO et al., 2015). Os produtos de PCR com as sequências de DNAr 5S e teloméricas foram

marcadas com digoxigenina-11-dUTP via *Nick translation* seguindo o protocolo do fabricante (Roche Diagnostics®).

3.2.5 Hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

O tratamento das lâminas para FISH seguiu o protocolo proposto por Schwarzacher e Heslop-Harrisson (2000), com modificações de Souza et al. (2010). Lâminas contendo as preparações citológicas foram secas em estufa a 37 °C pelo tempo mínimo de 1 h. Após aplicação de 50 µL de RNase a 1 µg/mL em tampão 2xSSC (cloreto de sódio a 0,3 M, citrato de sódio a 0,03 M), as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 1 h a 37 °C. Em seguida, as lâminas foram imersas em 2xSSC em TA duas vezes por 5 min cada e então incubadas com 50 µL de ácido clorídrico (HCl) a 10 mM por 5 min. Após a retirada do HCl, foi adicionado 50 µL de pepsina [pepsina 10 mg/ml; HCl 10 mM (1:100 v/v)] e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 20 min a 37 °C. As etapas de lavagens citadas a seguir foram realizadas em plataforma agitadora a 120 rpm. As lâminas foram lavadas em 2xSSC em TA duas vezes por 5 min cada, imersas em paraformaldeído a 4% em TA por 10 min, e novamente lavadas em 2xSSC duas vezes por 5 min cada. As preparações citológicas foram desidratadas em etanol 70% e etanol 95% por 5 min cada. Após a secagem das lâminas por 30 min, foi adicionado 15 µL do mix de hibridação com o volume final de formamida a 50%, dextran sulfato a 10%, 2xSSC, SDS (dodecil sulfato de sódio) a 0,13% e 66 ng de sonda. Antes da aplicação, o mix de hibridação foi aquecido a 75 °C por 10 min (termociclador) e resfriado em gelo por 5 min. Após a aplicação do mix de hibridação, as lâminas foram aquecidas a 75 °C durante 10 min em termociclador (Techne TC-412), contendo um adaptador para lâminas. A hibridação foi realizada em uma câmara úmida a 37 °C *overnight*. Após a hibridação, as lâminas foram imersas em 2xSSC em TA para facilitar a remoção das lamínulas. Após a remoção das lamínulas, as lâminas foram transferidas para o banho Dubnoff a 42 °C. As lâminas foram então imersas duas vezes em 2xSSC, por 5 min cada, duas vezes em 0,1xSSC por 5 min cada, duas vezes em 2xSSC, por 5 min cada. Finalmente as lâminas foram imersas em 4xSSC/Tween 20 a 0,2% em TA por 5 min cada. Em seguida, as lâminas foram tratadas com 50 µL BSA 5% (albumina de soro bovino) em TA por 10 min. A sonda DNAr 45S, marcada com

biotina, foi detectada com avidina-FITC (Vector[®]). As sondas DNAr 5S e teloméricas, marcadas com digoxigenina, foram detectadas com anti-digoxigenina-rodamina (Roche Diagnostics[®]). Para detecção das sondas de DNAr 45S e 5S foi utilizado 0.5 µL de avidina-FITC (Vector[®]) e 0.5 µL de anti-digoxigenina-rodamina (Roche Diagnostics[®]), respectivamente, mais 19 µL BSA 5% por lâmina. Para detecção da sonda telomérica foi utilizado 0.5 µL de anti-digoxigenina-rodamina (Roche Diagnostics[®]) mais 19.5 µL BSA 5% por lâmina. A detecção foi realizada em câmara úmida a 37 °C por 1 hora. Em seguida, as lâminas foram lavadas em 4xSSC/0.2% de Tween, em TA, três vezes, por 5 min cada. Em seguida as lâminas foram imersas rapidamente em 2xSSC e as preparações citológicas foram montadas e contracoloradas com DAPI em meio Vectashield (Vector[®]).

Os resultados foram analisados usando um microscópio de epifluorescência Olympus BX41 equipado com câmera digital 5M Olympus DP25 e com *software* DP2-BSW. Para visualização dos fluorocromos FITC e rodamina, foram utilizados os filtros U-MWB (450-480 nm de excitação/500 nm de corte dicróico/>515 nm de emissão) e U-MWG (510-550 nm de excitação/570 nm de corte dicróico/ >590 nm de emissão) respectivamente. A contracoloração com DAPI foi visualizada com o filtro U-MWU filtro (330-385 nm de excitação/400 nm de corte dicróico/>420 nm de emissão). As sobreposições FITC/rodamina/DAPI foram realizadas utilizando *software* Adobe[®] Photoshop CS6. Os ideogramas foram montados utilizando o *software* CorelDraw[®].

3.2.6 Análise meiótica

Botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados e fixados em Carnoy I, com trocas realizadas nos períodos de 30 e 180 min em TA, e estocados a -20 °C por 24 horas. Após esse período, os botões foram transferidos para etanol 70% e mantidos a ±10 °C até a análise. Foi utilizada apenas uma antera de cada botão floral para análise. Lâminas temporárias foram preparadas pela técnica de esmagamento. Antes as anteras foram amaciadas com duas gotas de ácido acético 60% por 7 min e, depois de retirado o ácido acético com papel de filtro, foram coradas com carmim acético 2% (SOUZA; PEREIRA, 2011). Foram observadas 50 células de cada fase meiótica, por espécie. Foi analisada a frequência de quiasmas terminal, intersticial

e total, para o cálculo do índice de recombinação ($IR = [\sum n^\circ \text{ total de quiasmas} \div n^\circ \text{ de células analisadas}] + \text{valor de } n$) (DARLINGTON, 1958), sendo considerado um quiasma para os bivalentes associados em bastão (*rod*) e dois quiasmas para os bivalentes associados em anel (*ring*) (SENDA et al., 2005). Os números dos produtos pós-meióticos (mônades, díades, tríades, tétrades e políades) foram registrados para o cálculo do índice meiótico ($IM (\%) = [n^\circ \text{ de tétrades normais} \times 100] \div n^\circ \text{ de produtos pós-meióticos contados}$) (LOVE, 1951) e para a análise de variância (ANOVA), considerando delineamento inteiramente ao acaso, com repetições de quatro lâminas por espécie. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa computacional SISVAR (*open source*).

Para registro das fases meióticas e pós-meióticas, as lâminas temporárias foram mergulhadas em ácido acético 60% por 20 min e em etanol 70% por 5 min para retirada do carmim acético e da lamínula. As lâminas foram secas em TA, coradas com 2 μ L DAPI (2 μ g/mL) detectado com o filtro U-MWU (330-385 nm de excitação/400 nm de emissão de corte dicróico/emissão >420 nm) e fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 equipado com câmera digital de 5M Olympus DP25 e com o *software* DP2-BSW.

3.2.7 Viabilidade polínica

Para análise da viabilidade polínica, flores abertas foram coletadas ao acaso nos horários entre 7h30 e 8h30 e os grãos de pólen (GP) foram testados com dois corantes: (i) solução de Alexander (ALEXANDER, 1969), que utiliza a tripla coloração com laranja G (intensificador), fucsina básica (cora o citoplasma de vermelho) e verde malaquita (cora a parede do grão de pólen de verde), proporcionando a reatividade da parede/citoplasma, (ii) diacetato de fluoresceína (HESLOP-HARRISON; HESLOP-HARRISON, 1970), fluorocromo que indica presença de atividade da enzima esterase, relacionada com a integridade do plasmalema. Para solução de Alexander, foram considerados viáveis os GP corados e com citoplasma íntegro; os GP inviáveis foram classificados em três tipos: tipo 1 (T1), vazio (ausência de citoplasma); tipo 2 (T2), citoplasma contraído (SOUZA, et al., 2004) e tipo 3 (T3), citoplasma pulverizado (ABREU, 2008). Para o diacetato de fluoresceína, foram considerados viáveis os GP

cujos citoplasmas tenham corado de amarelo-esverdeado fluorescente, observando-se apenas os tipos viável e inviável.

Para ambos os testes, uma antera aberta foi delicadamente colocada sobre uma gota do corante para liberar os GP. Para o teste com diacetato de fluoresceína, a lâmina foi incubada em câmara úmida por 10 min no escuro em TA. Os GP foram contados e observados quanto à corabilidade utilizando-se o microscópio de luz e epifluorescência Olympus BX41 equipado com câmera digital de 5M Olympus DP25 e com o *software* DP2-BSW. Os GP corados com solução de Alexander foram contados no microscópio de luz. Os GP corados com diacetato de fluoresceína foram contados no microscópio de epifluorescência utilizando o filtro U-MWB (450-480 nm de excitação/500 nm de emissão de corte dicróico/emissão>515 nm). Foram analisadas quatro lâminas por espécie e 1000 GP foram contados por lâmina, totalizando 4000 GP. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa computacional SISVAR (*open source*).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Análise cariotípica

A coloração convencional revelou o número cromossômico de $2n = 18$ tanto na espécie *Passiflora racemosa* quanto em *P. malacophylla*, possibilitando a visualização de três e dois pares cromossômicos satelitados, respectivamente. *P. racemosa* apresentou satélites no primeiro, segundo e sexto par cromossômico, sendo no primeiro par localizado no braço longo e nos demais cromossomos satelitados no braço curto (Figura 2A e 2C). Por outro lado, a espécie *P. malacophylla* revelou satélites nos braços curtos do segundo e terceiro par cromossômico (Figura 2B e 2D).

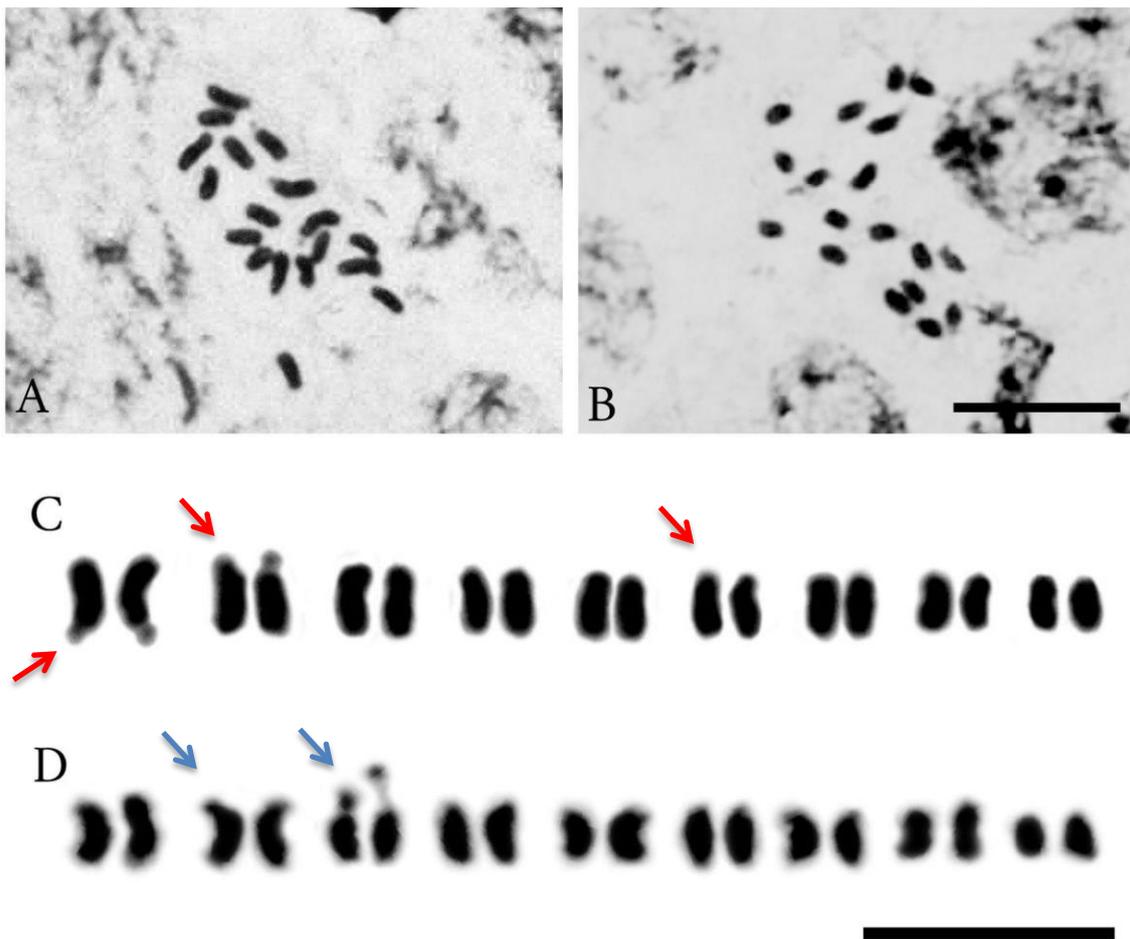


Figura 2. Cariótipos em *Passiflora*. Cromossomos metafásicos e kariogramas das espécies (A e C) *P. racemosa* com visualização dos satélites (seta vermelha) e (B e D) *P. malacophylla* com visualização dos satélites (seta azul). Barra = 10 μm .

A morfometria cromossômica revelou que o comprimento cromossômico médio foi de 3,27 μm e 2,42 μm para *P. racemosa* e *P. malacophylla*, respectivamente com diferença estatística altamente significativa pela ANOVA ($p < 0.05$). *P. racemosa* apresentou variação cromossômica de 2,62 μm a 4,17 μm enquanto que *P. malacophylla* variou de 1,80 μm a 2,90 μm em relação ao cromossomo menor e maior cromossomo do complemento (Tabela 1). A análise da morfologia cromossômica indicou que a fórmula cariotípica para *P. racemosa* é $2n = 18m$ e para *P. malacophylla* é $2n = 14m + 4sm$, apresentando comprimento total do lote haploide de 29,51 μm e 21,80 μm , respectivamente. A análise do índice de assimetria (TF%) demonstrou que *P. racemosa* possui cariótipo mais simétrico (TF% = 46,83) que *P. malacophylla* (TF% = 44,27).

Tabela 1. Morfometria de cromossomos metafásicos das espécies *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla*. Valores apresentados em micrômetros.

	Par cromossômico	BC	BL	SAT	CT	BL/BC
<i>P. racemosa</i>	1	1,91	1,93	0,32	4,17 ± 0,06	1,33
	2	1,63	1,98	0,29	3,90 ± 0,18	1,03
	3	1,58	1,86		3,44 ± 0,19	1,17
	4	1,47	1,81		3,28 ± 0,16	1,23
	5	1,45	1,76		3,21 ± 0,12	1,21
	6	1,30	1,65	0,23	3,18 ± 0,06	1,10
	7	1,39	1,57		2,96 ± 0,15	1,12
	8	1,30	1,41		2,71 ± 0,11	1,08
	9	1,27	1,35		2,62 ± 0,10	1,06
	Par cromossômico	BC	BL	SAT	CT	BL/BC
<i>P. malacophylla</i>	1	1,40	1,50		2,90 ± 0,20	1,07
	2	1,00	1,45	0,35	2,80 ± 0,10	1,80
	3	0,80	1,40	0,40	2,60 ± 0,13	2,15
	4	1,20	1,30		2,50 ± 0,12	1,08
	5	1,25	1,25		2,50 ± 0,19	1,00
	6	1,20	1,30		2,50 ± 0,10	1,08
	7	0,90	1,20		2,10 ± 0,11	1,33
	8	1,00	1,10		2,10 ± 0,19	1,10
	9	0,90	0,90		1,80 ± 0,14	1,00

Braço curto (BC), braço longo (BL), satélite (SAT), comprimento cromossômico total (CT) e razão entre o braço longo e curto (BL/BC).

Na dupla coloração com fluorocromos CMA₃ e DAPI foram observados apenas blocos CMA₃⁺/DAPI restritos a satélites e constrições secundárias, indicando que *P. racemosa* e *P. malacophylla* possuem três e dois pares cromossômicos com blocos CMA₃⁺/DAPI terminais, respectivamente (Figuras 3A, 3D e 4).

3.3.2 Hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

A hibridação com a sonda para DNAr 5S permitiu a localização de dois sítios cromossômicos (um par) em ambas as espécies. Em *P. racemosa* foi observado na região intersticial do sétimo par cromossômico e em *P. malacophylla* foi observado na região terminal do quarto par cromossômico (Figuras 3B, 3E e 4). A hibridação de sondas teloméricas revelou sítios de hibridação terminais em todos os braços cromossômicos em ambas espécies analisadas (Figuras 3C, 3F e 4).

A hibridação de sondas para DNAr 45S indicou a presença de seis (três pares) e quatro sítios (dois pares) terminais de hibridação nas espécies *P. racemosa* e *P.*

malacophylla, respectivamente (Figura 3B e 3E). Tanto os blocos CMA₃⁺/DAPI⁻ quanto os sítios de hibridação de sondas para DNAr 45S foram colocalizados nos pares cromossômicos 1, 2 e 6 em *P. racemosa*, sendo no primeiro par localizado no braço longo e nos demais pares localizados nos braços curtos. Em *P. malacophylla* esses marcadores cariotípicos foram colocalizados nos braços curtos dos pares 2 e 3 (Figura 4).

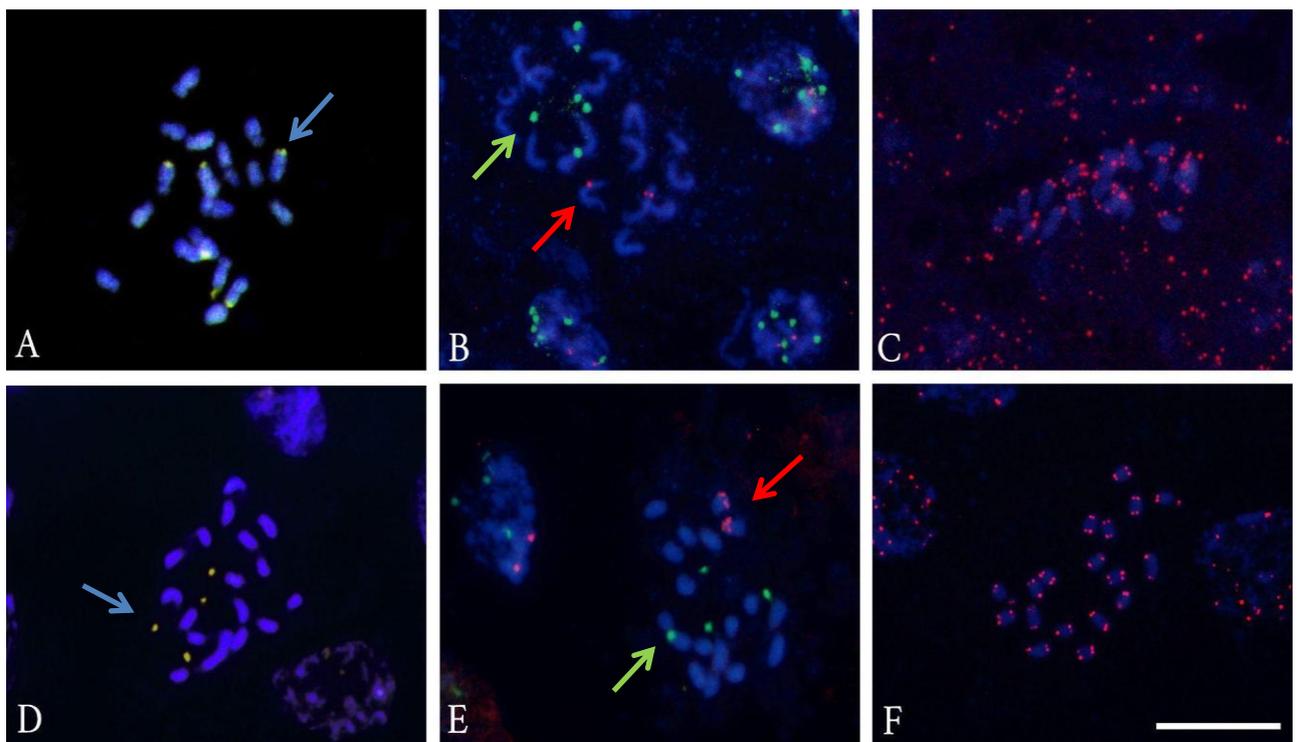


Figura 3. Localização da heterocromatina rica em AT e GC por fluorocromos CMA₃ e DAPI e aplicação da técnica de FISH com sondas para DNAr 45S, DNAr 5S e telomérica em cromossomos metafásicos e pró-metáfásicos de duas espécies de *Passiflora*. Para *P. racemosa* (A) blocos CMA₃⁺/DAPI⁻ (seta azul), (B) FISH com sonda para DNAr 45S (seta verde) e DNAr 5S (seta vermelha) em cromossomos pró-metáfásicos e (C) FISH com sonda telomérica. Para *P. malacophylla* (D) blocos CMA₃⁺/DAPI⁻ (seta azul), (E) FISH com sonda para DNAr 45S (seta verde) e DNAr 5S (seta vermelha) e (F) FISH com sonda telomérica. Sítios de hibridação pela técnica de FISH confirmados em núcleos interfásicos. Barra = 10 μm.

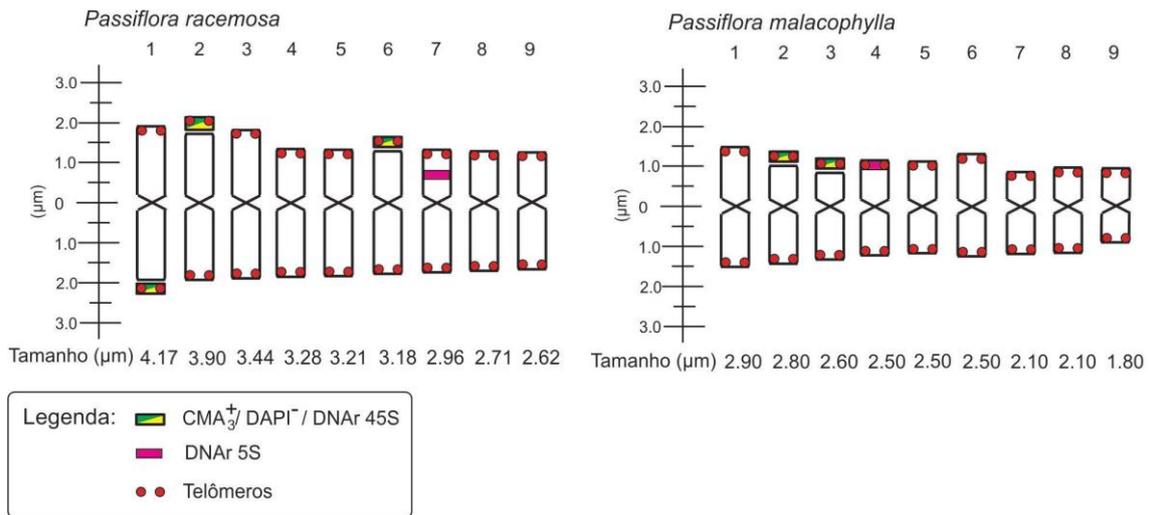


Figura 4. Ideogramas de *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla* com bandas CMA₃⁺, sítios de DNAr 45S, 5S e de DNA telomérico.

3.3.3 Meiose e Pós-meiose

As espécies *P. racemosa* e *P. malacophylla* estudadas apresentaram número haploide $n = 9$. Na meiose I, foi observado o início da condensação cromossômica em paquíteno (Figura 5A) com formação de nódulos de recombinação. Durante a fase de diacinese, com maior condensação dos cromossomos, foi identificada a predominância de associação bivalente na maioria das células, com poucos cromossomos univalentes. Ainda em diacinese, foram observadas a formação de quismas terminais e intersticiais (Figura 5B e 5C), com predominância de quismas intersticiais em ambas as espécies e maior prevalência de quismas em *P. malacophylla*, com uma média de 12,1 quismas por célula (Tabela 2).

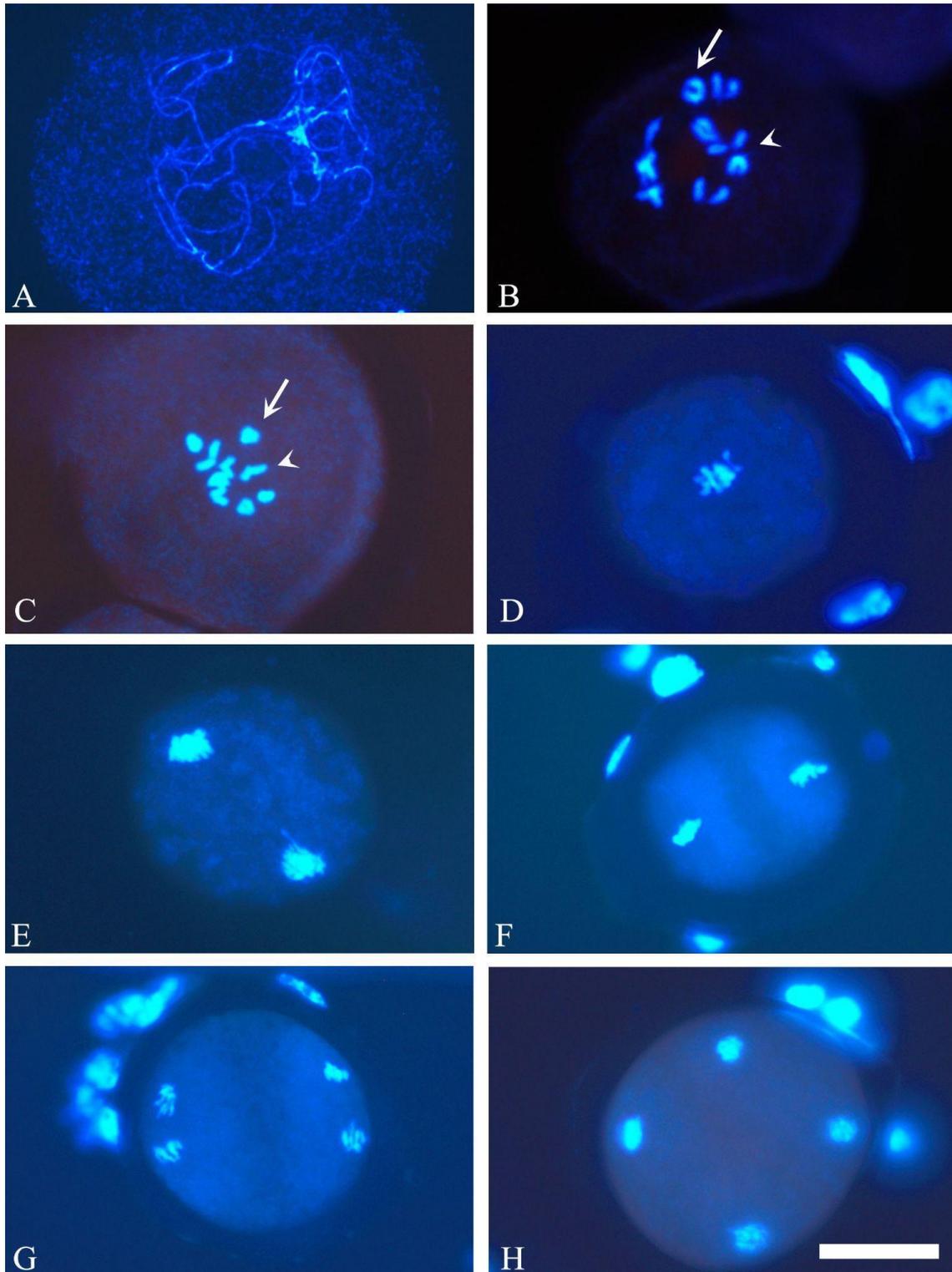


Figura 5. Pareamento cromossômico e comportamento meiótico regular em *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla* ($2n = 18$), corados com DAPI. (A) paquíteno em *P. malacophylla*; (B) diacinese em *P. racemosa*; (C) diacinese em *P. malacophylla*; (D) metáfase I em *P. malacophylla*; (E) anáfase I em *P. racemosa*; (F) metáfase II em *P. malacophylla*; (G) anáfase II em *P. racemosa* e (H) telófase II em *P. malacophylla*. A

ponta da seta indica a presença de quiasma intersticial e a seta indica a presença de quiasma terminal em B e C. Barra = 20 μ m.

Tabela 2. Número e localização de quiasmas observados por célula em diacinese e índice de recombinação (IR) em *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla*.

Genótipos (n = 9)	Terminal		Intersticial		TQ	IR
	Média	(Min-Max \pm dp)	Média	(Min-Max \pm dp)	Média	
<i>P. racemosa</i>	4,06a	(1-6 \pm 1,30)	5,62a	(2-8 \pm 1,32)	9,68a	18,7
<i>P. malacophylla</i>	4,26a	(1-8 \pm 1,74)	7,82b	(6-9 \pm 1,02)	12,1b	21,1

Min = mínimo; Max = máximo; dp = desvio padrão; TQ = total de quiasmas.

Valores seguidos pelas mesmas letras nas colunas não difere estatisticamente pelo teste de Tukey.

Para análise de variância não houve diferença significativa ($P < 0,05$) na localização dos quiasmas terminais e houve diferença significativa ($P < 0,05$) na localização dos quiasmas intersticiais entre as espécies (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância para os tipos de quiasmas (Q) em *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla*

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Q Terminal	Q Intersticial
Genótipos	1	1,0 ^{NS}	121,0*
Erro	98	2,4	1,4
Coefficiente de variação (%)		37,0	17,6

GL = graus de liberdade, * $P < 0,05$; ^{NS} = não significativo.

O comportamento meiótico foi regular, com cromossomos alinhados na placa equatorial em metáfase I e II, segregação normal em anáfase I e II e formação de quatro núcleos haploides em telófase II (Figura 5D - 5H). Algumas irregularidades foram observadas no decorrer das fases da meiose I e II, com formação de ponte cromossômica em apenas uma célula em *P. racemosa* durante a segregação cromossômica em anáfase I (Figura 6A). Na meiose I, foi observado maior incidência de cromossomos precoces e retardatários (Figura 6B, 6D e 6F). Na meiose II foram observadas algumas células com assincronia durante a divisão celular, com células apresentando um grupo cromossômico em metáfase e outro em anáfase, ou um grupo cromossômico na placa metafásica e outro grupo desorganizado (Figura 6C). Em

algumas células também foram encontradas irregularidades na orientação das fibras do fuso em meiose II, onde grupos cromossômicos de uma mesma célula se posicionaram na placa metafásica de forma irregular, dando origem à formação de fuso transverso em formato de “T” ou fuso tripolar em formato de “V” (Figura 6B e 6E) (Tabela 4).

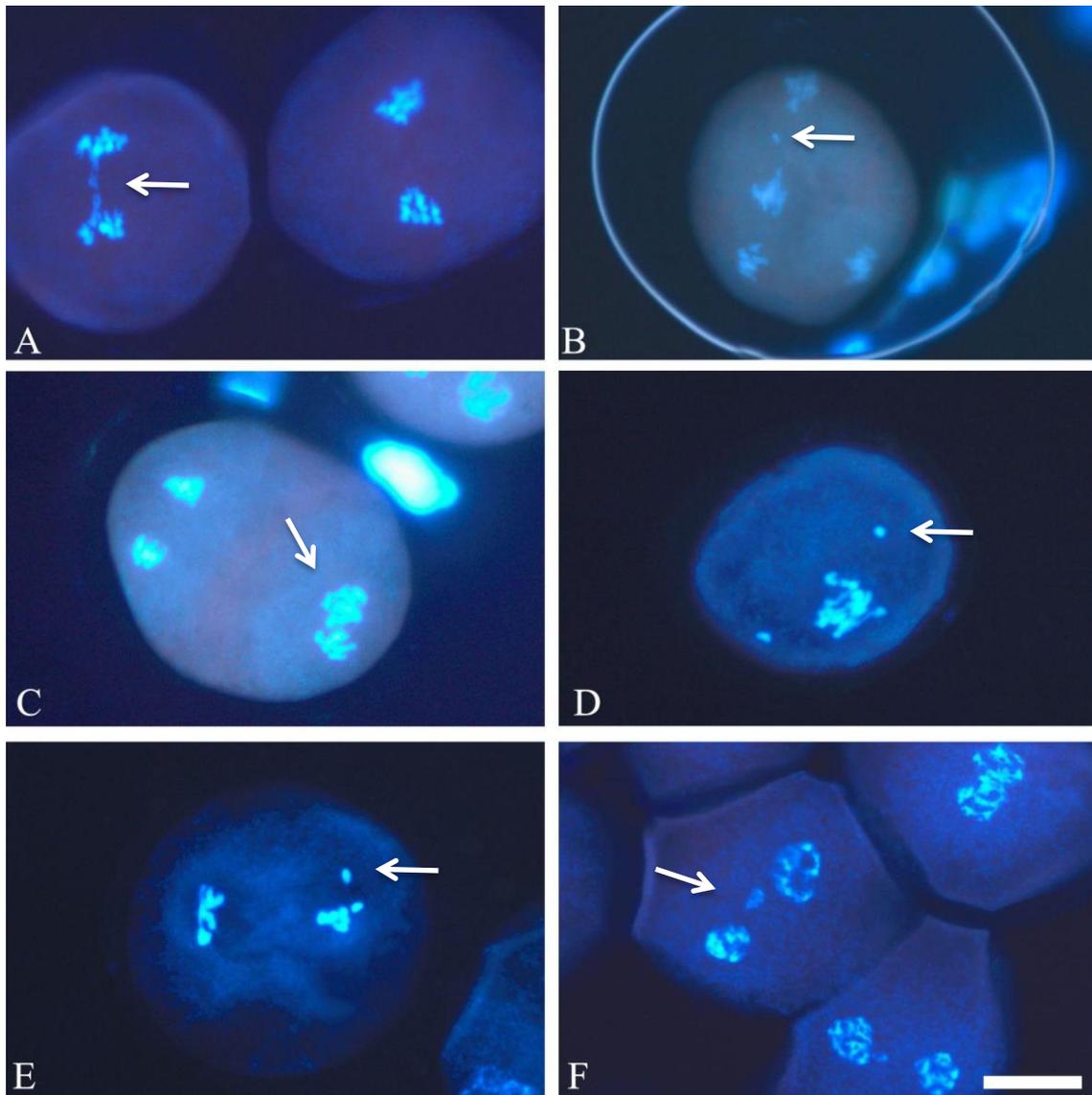


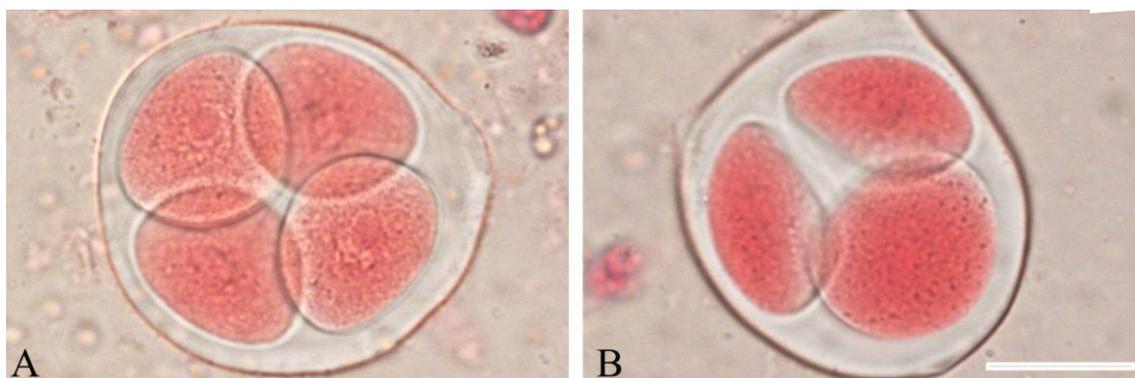
Figura 6. Comportamento meiótico com irregularidades em *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla* ($2n = 18$), corados com DAPI. (A) Anáfase I com ponte cromossômica em *P. racemosa*; (B) Anáfase II com cromossomo retardatário e fuso transverso em formato de “T” em *P. racemosa*; (C) Anáfase II com assincronia em *P. malacophylla*; (D) Anáfase I com cromossomos retardatários em *P. malacophylla*; (E) Metáfase II com fuso transverso em formato de “T” em *P. malacophylla*; (F) Telófase I com cromossomo retardatário em *P. racemosa*. A seta indica as irregularidades. Barra = 20 μm .

Tabela 4. Células observadas com irregularidades no comportamento meiótico em *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla*

Genótipos	Cromossomos precoces/retardatários						Ponte cromossômica		Assincronia		Irregularidade de fuso			Três núcleos
	MI	AI	TI	MII	AII	TII	AI	AII	MII	AII	MII	AII	TII	TII
<i>P. racemosa</i>	14	9	9	7	4	5	1	-	5	5	4	7	4	5
<i>P. malacophylla</i>	9	8	6	5	5	3	-	-	7	8	6	7	8	3

M = metáfase; A = anáfase; T = telófase; I = meiose I; II = meiose II.

Nos produtos pós-meióticos foram observados a formação de tétrades em quase todas as células, mantendo o IM acima de 95% em ambas as espécies, com outras formações encontradas em menor percentual como díades, tríades e políades, sendo a última a mais frequente (Figura 7, tabela 5). A análise de variância indicou haver diferença significativa ($P < 0,05$) para as irregularidades dos produtos pós-meióticos, com exceção para tríade (Tabela 6).

**Figura 7.** Pós-meiose em *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla*. (A) Tétrade normal em *P. racemosa* e (B) Tríade em *P. malacophylla*. Barra = 50 μ m.**Tabela 5.** Valores médios dos produtos pós-meióticos (tétrades normais e irregularidades) e índice meiótico (IM) em *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla*

Genótipos	PPM						Total PPM	IM (%)
	Tétrades normais	Mônades	Díades	Tríades	Políades	Irregularidades		
<i>P. racemosa</i>	1176a	1,8a	7,2a	27,6a	0,4a		1213	96,9
<i>P. malacophylla</i>	1442b	0,5b	3,0b	22,5a	0,0b		1468	98,2

PPM = produto pós-meiótico; IM = índice meiótico.

Valores seguidos pelas mesmas letras nas colunas não difere estatisticamente pelo teste de Tukey.

Tabela 6. Resumo da análise de variância para os diferentes tipos de produtos pós-meióticos em *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla*

FV	GL	QM				
		Tétrades	Tríades	Díades	Mônades	Políades
Genótipos	1	141512,0*	50,0 ^{NS}	36,1*	3,1*	0,5*
Erro	6	11173,6	40,0	3,7	0,6	0,2
CV (%)		8,1	25,3	37,9	70,3	163,3

FV = Fonte de variação; GL = grau de liberdade; CV = coeficiente de variação; QM = quadrado médio; *P < 0,05; ^{NS} = não significativo.

3.3.4 Viabilidade polínica

Os grãos de pólen de *P. racemosa* e *P. malacophylla* reagiram positivamente aos dois testes utilizados (Figura 8). Com a solução de Alexander, ambas as espécies apresentaram percentuais acima de 85% de GP viáveis, com parede e citoplasma íntegros. Foram observados três tipos de GP inviáveis (Figura 8B, 8C e 8D). O maior percentual de GP T1 (vazio) foi encontrado em *P. malacophylla* (5,9%), o GP T2 (citoplasma contraído) em *P. racemosa* (6%) (Tabela 7). Não foram observados em *P. malacophylla* GP T3 (pulverizado) e em *P. racemosa* foram observados em apenas 1,3% das células analisadas. Para análise da viabilidade polínica utilizando o fluorocromo diacetato de fluoresceína foram observados altos percentuais de grãos de pólen viáveis em ambos os genótipos, com percentuais acima de 80% (Figura 8E e 8F, tabela 7). A análise de variância indicou haver diferença significativa apenas para as irregularidades encontradas com a solução de Alexander (Tabela 8).

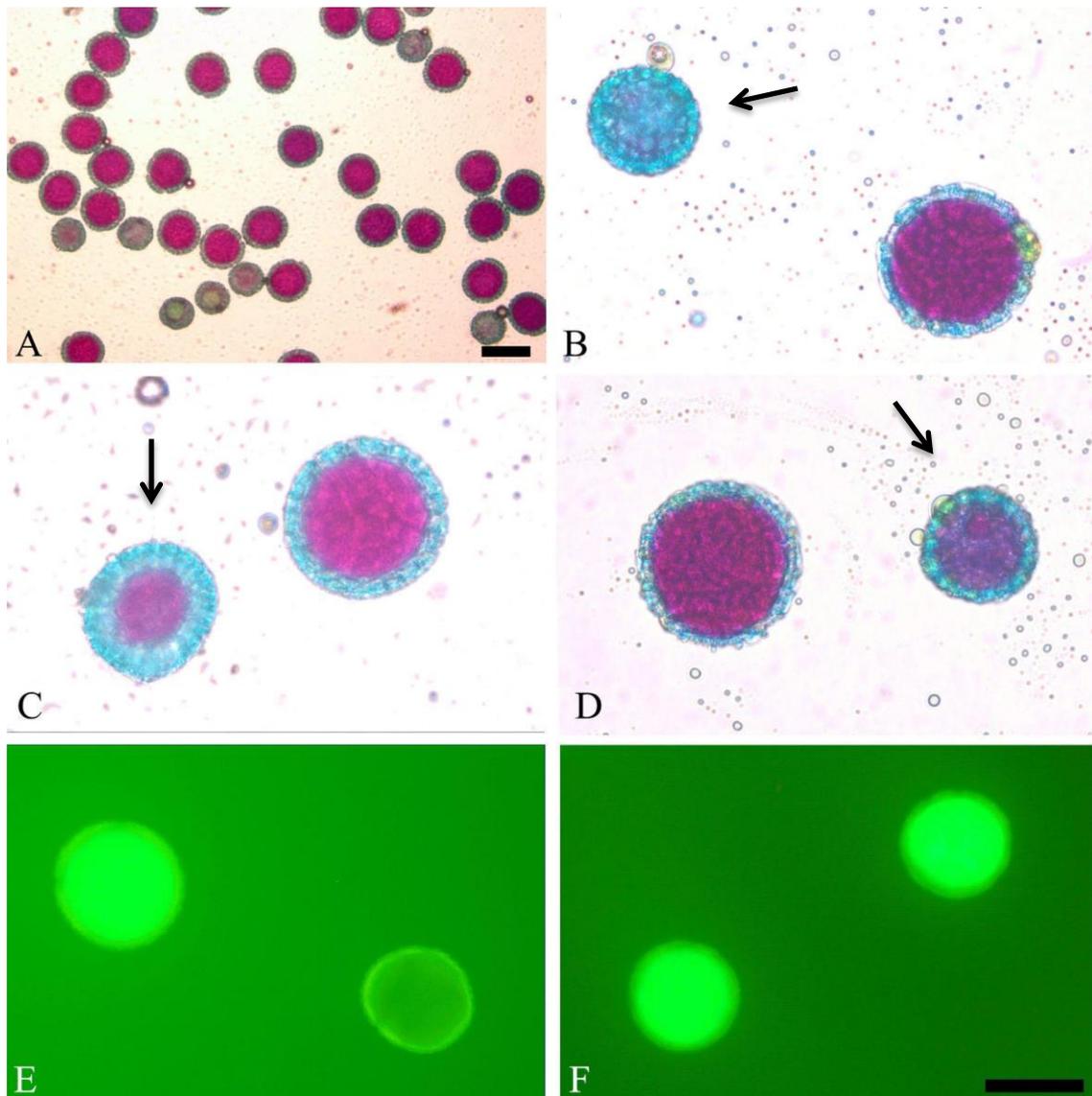


Figura 8. Grãos de pólen (GP) em *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla*. (AD) teste com solução de Alexander. (A) GP viáveis com citoplasma vermelho e vazio com citoplasma incolor em *P. malacophylla*, Barra = 100 μm (B) GP inviável vazio em *P. malacophylla* (seta), (C) GP inviável contraído em *P. racemosa* (seta), (D) GP inviável pulverizado em *P. racemosa* (seta). (E-F) teste com diacetato de fluoresceína em *P. racemosa* e *P. malacophylla*, respectivamente, com GP viáveis fluorescentes e inviáveis sem fluorescência. Barra = 25 μm .

Tabela 7. Valores percentuais médios de GP viáveis e inviáveis T1, T2 e T3 utilizando diacetato de fluoresceína e solução de Alexander em *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla*

Genótipos	Diacetato de fluoresceína		Solução de Alexander			
	% GP viável	% GP inviável	% GP T1	% GP T2	% GP T3	% GP Viável
<i>P. racemosa</i>	83,5	16,5	4,0a	6,0a	1,3a	88,6
<i>P. malacophylla</i>	86,9	13,1	5,9b	3,9b	0,0b	90,1

GP = grãos de pólen; T1 = vazio; T2 = contraído; T3 = pulverizado.

Valores seguidos pelas mesmas letras nas colunas não difere estatisticamente pelo teste de Tukey.

Tabela 8. Resumo da análise de variância para o total de GP viável (V) e inviável (Inv) com diacetato de fluoresceína e solução de Alexander em *Passiflora racemosa* e *P. malacophylla*.

FV	GL	QM					
		Diacetato de fluoresceína		Solução de Alexander			
		GP V	GP Inv	GP V	GP Inv T1	GP Inv T2	GP Inv T3
Genótipos	1	2312,0 ^{NS}	2031,2 ^{NS}	450,0 ^{NS}	780,1*	903,1*	364,5*
Erro	6	756,9	726,9	591,9	118,7	97,1	28,1
CV (%)		3,2	18,25	2,72	21,8	19,8	78,6

FV = fonte de variação; GL = grau de liberdade; CV = coeficiente de variação; QM = quadrado médio; GP = grão de pólen; T1 = vazio; T2 = contraído; T3 = pulverizado; *P < 0,05; ^{NS} = não significativo.

3.4 DISCUSSÃO

No gênero *Passiflora* espécies em risco de extinção têm levado a necessidade da conservação *ex-situ* e *in-situ* de táxons (KROSNICK et al., 2013), sendo uma problemática existente em diversos biomas brasileiros (BRASIL, 1998; CNCFLORA, 2013). Contudo, para se conservar determinada espécie é ideal a manutenção da diversidade intraespecífica de populações, pois a conservação da variabilidade genética implica em maiores sucessos de programas de conservação, em especial os que envolvem a conservação *ex-situ* (KLINK; MACHADO, 2005).

A caracterização cariotípica possibilita tanto a identificação quanto a delimitação entre espécies, gerando informações que podem ser utilizadas em programas de conservação de germoplasma (POTTER; DEAKIN, 2018; VIANA; SOUZA, 2012). Algumas espécies do gênero *Passiflora* possuem semelhanças morfológicas, dificultando a correta identificação taxonômica e posterior coleta e conservação de germoplasma certificado. A espécie *P. malacophylla*, por exemplo, possui similaridades morfológicas com *P. echinasteris* (KOCH et al., 2015), mas pela ausência de dados cariotípicos para essa espécie, a delimitação citológica de ambas as espécies ainda não pode ser inferida. A análise cariotípica utilizando técnicas clássicas e moleculares possibilitou não apenas a delimitação cromossômica entre as espécies *P. coccinea*, *P. vitifolia* e *P. tholozanii*, mas também permitiu a visualização de similaridade genômica entre as espécies (OLIVEIRA et al., 2019).

A caracterização cariotípica em espécies do gênero *Passiflora* têm revelado que a variação no número cromossômico de $2n = 12$, $2n = 18$, $2n = 20$ e $2n = 24$ está atrelada, na maior parte das espécies a posição taxonômica e filogenética, sendo reconhecidos atualmente quatro subgêneros com a predominância de espécies com o mesmo número cromossômico (MELO et al., 2001; HANSEN et al., 2006). No presente trabalho, as espécies *P. racemosa* e *P. malacophylla* apresentaram $2n = 18$ cromossomos, sendo uma característica observada nas espécies do subgênero *Passiflora* (MELO et al., 2001; HANSEN et al., 2006). O número cromossômico observado corrobora com a posição taxonômica atual de ambas as espécies analisadas (CERVI, 1997; CERVI; RODRIGUES, 2010). De modo geral, as espécies do gênero *Passiflora* podem ser agrupadas com base na evolução por poliploidização e eventos de disploidia, que juntos contribuiram para o estabelecimento de quatro subgêneros citologicamente distintos em relação ao número cromossômico básico: *Decaloba* ($x = 12$), *Passiflora* ($x = 9$), *Deidamioides* e *Astropheia* ($x = 12$) (MELO et al., 2001). Muito embora variações intra- e interespecíficas sejam pouco relatadas em relação a poliploidização recente no gênero *Passiflora*. Desta maneira, o número cromossômico constante entre espécies do mesmo grupo taxonômico e filogenético parece ser a rota mais comum no gênero, sendo um dos principais marcadores citológicos na identificação primária de espécies para a organização taxonômica e conservação (SADER et al., 2019).

O tamanho cromossômico médio tem sido uma característica cariotípica observada em diversas espécies do gênero *Passiflora*, revelando variações intra- e interespecífica (SOUZA et al., 2003; MELO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2021). Ocorre indícios da relação do tamanho cromossômico médio e da posição taxonômica do gênero, mas essa característica parece estar relacionada ao conteúdo de DNA, e conseqüentemente, ao tamanho do genoma. Da mesma forma que o tamanho cromossômico médio, o comprimento do lote haplóide tem sido uma característica cariotípica que contribui na inferência do conteúdo de DNA e do tamanho do genoma das espécies do gênero (MELO et al., 2014). Assim, a espécie *P. racemosa* pode apresentar mais conteúdo de DNA e conseqüentemente maior tamanho do genoma que a espécie *P. malacophylla*, pela variação estatisticamente significativa no tamanho cromossômico médio e no conteúdo do lote haplóide.

A fórmula cariotípica indicou variação na morfologia cromossômica interespecífica entre *P. racemosa* e *P. malacophylla*. A existência de cariótipo com a predominância de cromossomos metacêntricos tem sido o mais relatado dentro do subgênero *Passiflora*. Muito embora a existência de cromossomos submetacêntricos tenham sido observados em espécies como *P. coccinea* e *P. bahiensis* pertencentes ao mesmo subgênero (MELO et al., 2014). Cromossomos submetacêntricos foram observados em *P. malacophylla*, refletindo alterações cromossômicas estruturais recentes em termos evolutivos. Essas informações refletem diretamente no índice de assimetria cromossômica, pois indica alterações no âmbito estrutural ao longo do cariótipo em função da morfologia cromossômica (STEBBINS, 1971). Desta forma, a espécie *P. racemosa* possui cariótipo mais primitivo pela existência exclusiva de cromossomos metacêntricos (HUZIWARA et al., 1962).

Tanto o número quanto a posição de satélites tem sido considerado um dos marcadores cariotípicos mais importantes para o gênero *Passiflora*, muito embora a variação intra-, interespecífica e entre espécies do mesmo subgênero sejam observadas (MELO et al., 2001; SOUZA et al., 2003; MELO et al., 2014). No presente trabalho, foi observada variação tanto no número quanto na localização de satélites no cariótipo das espécies analisadas, com *P. racemosa* apresentando o primeiro par cromossômico com satélite no braço cromossômico longo. No gênero *Passiflora* satélites localizados no braço cromossômico longo ocorrem em algumas espécies como *P. micropetala*, *P.*

ferruginea e *P. coriacea* do subgênero *Decaloba* e *P. actinia*, *P. setacea*, *P. hatschbachii* e *P. subrotundra* do subgênero *Passiflora* (MELO et al., 2014).

Em *Passiflora*, a utilização de fluorocromos base-específicos têm revelado até o momento a existência de regiões cromossômicas ricas em GC restritas aos satélites, constrições secundárias e regiões organizadoras de nucléolos em núcleos interfásicos. Desta forma, quando a visualização de satélites é impossibilitada pela simples coloração cromossômica convencional a utilização da dupla coloração com CMA₃ e DAPI é uma alternativa para a localização destes importantes marcadores cariotípicos (MELO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2021). No presente estudo foram observados apenas blocos CMA₃⁺/DAPI em ambas as espécies analisadas, sem a evidência de regiões ricas em AT. Os blocos CMA₃⁺/DAPI foram colocalizados com os sítios de hibridação de sondas para DNAr 45S, sendo regiões restritas a satélites e constrições secundárias, fato comumente observado no gênero *Passiflora* (MELO; GUERRA, 2003; MELO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2021).

As espécies *P. racemosa* e *P. malacophylla* apresentaram variações entre si para o número e a localização de sítios de DNAr 45S. Contudo, o par cromossômico dois é o único que possui semelhança entre ambas as espécies em relação à posição terminal de DNAr 45S. De fato, a variação no número e na posição dos sítios de hibridação de DNAr 45S tem sido relatada em análises interespecíficas em espécies do gênero *Passiflora*, sendo comum no subgênero *Passiflora* (MELO; GUERRA, 2003; SOUZA, 2008; OLIVEIRA et al., 2021). Esse fato pode ser atribuído à grande diversificação das espécies deste subgênero, a sua maior diversidade em termos taxonômicos e as características evolutivas no cariótipo, associadas aos processos de poliploidia e disploidia (MELO; GUERRA, 2003; SADER, 2019). Por outro lado, variações interespecíficas são pouco relatadas em relação a diversos marcadores cromossômicos, excetuando o número e posição de satélites e de sítios de hibridação da sonda para DNAr 45S que em alguns casos indicam variações em relação ao acesso ou população analisada (SOUZA et al., 2008; VIANA; SOUZA, 2012; OLIVEIRA et al., 2021).

Neste estudo, ambas as espécies estudadas revelaram apenas um par cromossômico contendo sítio de hibridação para DNAr 5S, mas com variações em relação à localização e posição cromossômica. No gênero *Passiflora*, geralmente, um par cromossômico contendo sítio de DNAr 5S tem sido o mais comum entre as espécies

do subgênero *Passiflora*, ocorrendo poucas variações quantitativas, mas relatos de variações entre cromossomos homólogos contendo DNAr 5S tem sido observado (MELO et al., 2003).

As variações observadas em relação ao mapeamento de sondas para DNAr entre as espécies *P. racemosa* e *P. malacophylla* as colocam em posições taxonômicas distintas, mas seguem a distribuição destes marcadores com semelhanças em relação a outras espécies do subgênero *Passiflora*. Neste sentido, as informações cariotípicas incluídas em programas de conservação permitirão a melhor compreensão da diversidade intra- e interespecífica nas espécies *P. racemosa* e *P. malacophylla* para ampliar as perspectivas na conservação da diversidade cariotípica inerente a cada espécie. Contudo, o processo de extinção e as limitações na coleta de germoplasma nativo dificulta a análise citológica de populações *in-situ*.

A hibridação de sondas teloméricas revelou que as espécies *P. racemosa* e *P. malacophylla* apresentam sequência telomérica do tipo (TTTAGGG), o tipo mais comum de sequência telomérica em vegetais, como *Arabidopsis* e também observada em outras espécies do gênero *Passiflora* e pertencentes à subgêneros e seções distintas (BELO et al. 2015; MELO et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2021). Em *Passiflora* a localização de DNA telomérico apenas foi reportada em regiões cromossômicas terminais, indicando que alterações cromossômicas estruturais envolvendo telômeros não são uma característica recente na rota evolutiva do cariótipo das passifloras (SADER, 2019; OLIVEIRA et al., 2021).

As análises meióticas conseguem fornecer informações detalhadas sobre o comportamento cromossômico e sobre a fertilidade de uma espécie (KIIHL et al., 2011). As espécies silvestres de maracujá utilizadas como planta ornamental possuem um grande potencial, entretanto, é necessário trabalhos de coleta, caracterização do germoplasma e conservação (FALEIRO, 2006). As duas espécies, *P. racemosa* e *P. malacophylla* apresentaram número haplóide $n = 9$, com pareamento cromossômico, formação de bivalentes e predominância de quiasmas intersticiais. O pareamento cromossômico é um evento importante na meiose, tanto para ocorrência de recombinação, quanto para a exata segregação dos cromossomos (FACHINETTO; TEDESCO, 2009) e a presença de bivalentes é indicativo de recombinação meiótica entre os cromossomos homólogos (SOARES-SCOTT et al., 2003). A quantidade média

de quiasmas foi alta em *P. racemosa* e *P. malacophylla*, com 9,68 e 12,1 respectivamente, indicando estabilidade meiótica, já que baixa ocorrência de quiasmas pode levar a separação precoce dos bivalentes e maiores irregularidades ao longo das fases da meiose. Em algumas espécies de *Passiflora*, quanto menor o número de quiasmas, maior a ocorrência de cromossomos retardatários, precoces e univalentes (SOUZA; PEREIRA, 2011).

Os quiasmas possuem uma função essencial na divisão celular, pois são as únicas regiões que mantêm os cromossomos homólogos juntos na prófase I da meiose e evitam a disjunção precoce, garantindo a segregação cromossômica adequada (SUMNER, 2003). Os resultados desse estudo confirmaram a predominância de quiasmas intersticiais observados em outras espécies de *Passiflora* (SOUZA et al., 2008) como *P. amethystina*, *P. mucronata*, e *P. cincinnata* (SOUZA; PEREIRA, 2011), *P. gibertii* e *P. gardneri* (LAVINSCKY et al., 2021) assegurando assim a variabilidade genética do gênero, já que a formação de quiasmas intersticiais é indicativo de recombinação.

Algumas irregularidades foram observadas durante as fases da meiose, com prevalência de cromossomos retardatários em metáfase I com 28% das células em *P. racemosa* e 18% em *P. malacophylla*, enquanto telófase II esse percentual foi apenas de 10% e 6% respectivamente. Outra irregularidade encontrada, com maior percentual em *P. malacophylla*, foi a assincronia que é exclusiva na meiose II e caracteriza-se pela presença de dois conjuntos cromossômicos de uma mesma célula em fases distintas do ciclo celular, como resultado da despolimerização das fibras do fuso na célula, resultando na formação de três núcleos em telófase II (SOUZA et al., 2003) e também foi observado em outras espécies de passifloras, como em *P. edulis* f. *flavicarpa* (SOUZA et al., 2000), *P. alata*, *P. gibertii*, *P. gardneri*, *P. cincinnata* e *P. kermesina* (SOUZA; PEREIRA, 2011; LAVINSCKY et al., 2021). A formação de ponte cromossômica foi observada apenas em uma célula na anáfase I em *P. racemosa* e também foram encontradas irregularidades nas fibras do fuso, com formação em de “T” (transverso) ou “V” (tripolar) que podem levar a formação de produtos pós meióticos anormais como díades ou tríades.

O índice meiótico de ambas as espécies foi superior a 95%, indicando alta estabilidade meiótica, com meiose regular e formação de tétrades ao final da meiose.

Muitas espécies de *Passiflora* possuem IM acima de 90%, como em *P. edulis*, *P. alata*, *P. rubra*, *P. cincinnata* e *P. edmundoi* (SOUZA; PEREIRA, 2011; SOUZA et al, 2003). Três espécies de *Passiflora* foram analisadas quanto ao comportamento meiótico, *P. setacea*, *P. incarnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* e o estudo do comportamento meiótico evidenciou pareamento cromossômico regular e fases da meiose com poucas anormalidades e formação de grãos de pólen viáveis, o que pode favorecer a utilização dessas espécies em hibridações interespecíficas (SOARES-SCOTT et al., 2003). A observação do comportamento meiótico em espécies silvestres fornece informações sobre seu genoma, índice de recombinação e viabilidade dos gametas para subsequentes programas de hibridação (SOUZA et al., 2003) e estratégias de conservação das espécies.

A viabilidade polínica das espécies estudadas foi acima de 80% para grãos de pólen (GPs) viáveis em ambos os testes, sendo que em passifloras valores superiores a 70% é considerado alto (SOUZA et al., 2002) e indica uma meiose regular. Muitas espécies de passifloras obtiveram valores superiores a 70% de GPs viáveis durante estudos de viabilidade polínica, como *P. subrotunda* Mast., com GP viável acima de 91% (SOUZA et al., 2018), *P. alata*, *P. capsularis*, *P. foetida*, *P. pentagona* (SOUZA et al., 2004; MELETTI et al., 2003), *P. edmundoi* (SOUZA et al., 2003), *P. edulis* (SOUZA et al., 2004; MORENO et al., 2015) e *P. setacea* (SOARES-SCOTT et al., 2003). Percentuais elevados de GPs viáveis são esperados como resultado de altos percentuais de tétrades normais em consequência de uma meiose regular (CORRÊA et al., 2005).

3.5 CONCLUSÃO

A análise cariotípica possibilitou a observação de marcadores cromossômicos importantes para a delimitação citogenética entre as duas espécies. As informações obtidas através da aplicação de técnicas citogenéticas clássicas e moleculares permitiu estabelecer o cariótipo das espécies analisadas fornecendo informações acerca da diversidade interespecífica. A espécie *P. racemosa* possui blocos CMA₃⁺/DAPI e sítios de hibridação de sondas DNAr 45S em três pares cromossômicos 1,2 e 6, enquanto *P. malacophylla* possui em dois pares 2 e 3 e apenas um par cromossômico de sítios de

hibridação para DNAr5S. Para os sítios de hibridação de sondas teloméricas não foram observadas nenhum tipo de alteração cromossômica. *P. racemosa* possui cariótipo mais primitivo pela existência exclusiva de cromossomos metacêntricos. A análise meiótica conseguiu fornecer informações detalhadas sobre o comportamento cromossômico e sobre a fertilidade das espécies, sendo que as duas espécies apresentaram comportamento meiótico estável, com IM acima de 95% e viabilidade polínica alta. As informações cariotípicas e de comportamento meiótico do presente trabalho permitiram a melhor compreensão da diversidade intra- e interespecífica nas espécies *P. racemosa* e *P. malacophylla* para ampliar as perspectivas na conservação da diversidade inerente a cada espécie.

3.6 REFERÊNCIAS

- ABREU, P.P. **Análise em *Passiflora palmeri*, *Passiflora foetida* e híbridos F₁ ornamentais: relação citogenética e caracterização fisiológica**. 188 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2008.
- ABREU, P.P.; SOUZA, M. M.; SANTOS, E. A.; PIRES, M. V.; PIRES, M. M.; ALMEIDA, A. F. Passion flower hybrids and their use in the ornamental plant market: perspectives for sustainable development with emphasis on Brazil. **Euphytica**, Wageningen, v. 166, p. 307 –315, 2009.
- ALEXANDER, M.P. Differential staining of aborted and non-aborted pollen. **Stain Technology**, v. 44, p. 117 - 122, 1969.
- 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. 1–13, 2018.
- BELO, G.O.; SOUZA, M.M.; SOUZA, V.O.; MELO, C.A.F. Reproductive and cytogenetic characterization in *Passiflora subblanceolata*. **Biologia** 70(6): 733–743, 2015.
- 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.; MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D. & PASSOS, I.R.S. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). **Maracujá, germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA, cap. 22, p. 559 – 586, 2005.

BRASIL, Secretaria do meio ambiente, Resolução SMA n° 20/98 de 09 de março de 1998. Disponível em:

<https://www.cetesb.sp.gov.br/licenciamento/documentos/1998_Res_SMA_20.pdf>. Acesso em 01 de março de 2022.

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

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

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

CARINI, M. Dentro do apê, cresce um jardim. **Casa Cláudia**, v. 629, n. 1, p. 122 - 126, 2014.

CORRÊA, M.G.S.; VIÉGAS, J.; SILVA, J.B.; ÁVILA, P.F.V.; BUSATO, G.R.; LEMES, J.S. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. **Acta bot. Bras.**, v. 19, n. 2, p. 295 - 303, 2005.

CORLETT, R.T. Plant diversity in a changing world: Status, trends, and conservation needs. **Plant diversity**, v. 38, p. 10 - 16, 2016.

CROSS, A.T.; KRUEGER, T.A.; GONELLA, P.M.; ROBINSON, A.S.; FLEISCHMANN, A.S. Conservation of carnivorous plants in the age of extinction. **Global Ecology and Conservation**, 2020.

DANE, F.; TSUCHIYA, T. Chromosome studies in the genus Cucumis. **Euphytica**, v. 25, p. 367 - 374, 1976.

DARLINGTON, C.D. **Evolution of genetic systems**. London: Oliver and Boyd, 1958.

DURANTE, S. Flores em escalada. **Casa e Jardim**, n. 706, p. 160 - 168, 2013.

FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Número cromossômico, análise meiótica e estimativa da viabilidade polínica em populações de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 110 - 116, 2009.

FALEIRO, F.G. Conservação e caracterização de espécies silvestres de maracujazeiro (*Passiflora* spp.) e utilização potencial no melhoramento genético, como porta-enxertos, alimentos funcionais, plantas ornamentais e medicinais. **Embrapa Cerrados**, 2006.

FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; COSTA, A.M.; JESUS, O.N.; MACHADO, C.F. Maracujá. **Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura**, p. 32, 2017.

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

GOETTSCHE, B.; GASTON, K.J. High proportion of cactus species threatened with extinction. **Nature Plants**, 2015.

GROSSI, J.A.; GODOY, S.M.; MACEDO, C.R.; PAULA, G.B.N.; ROMAGNOLO, M.B.; RISSO-PASCOTTO, C. Comportamento meiótico durante a microsporogênese em espécies da família Meliaceae. **Arq. Ciência Vet. Zool.**, v. 14, n. 1, p. 51 – 56, 2011.

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

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, p. 138-150, 2006.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Stain Technology**, v. 45, p. 115 - 120, 1970.

HERBÁRIO IAC. Herbário Instituto Agrônomo de Campinas, SP. Disponível em: <http://herbario.iac.sp.gov.br/Relatorios/Listagens/LExtincao.asp> acesso em: 09 de março de 2022.

HUZIWARA, Y. Karyotype analysis in some genera of Compositae. VIII. Further studies on the chromosome of Aster. **Am. J. Bot.** 49, 116–119, 1962.

ILYAS, M.; LIU, Y.Y.; SHAH, S.; ALI, A.; KHAN, A.H.; ZAMAN, F.; YUCUI, Z.; SAUD, S.; ADNAN, M.; AHMED, N.; ALI, B.; FAHAD, S.; WANG, Y.J. Adaptation of functional traits and their plasticity of three ornamental trees growing in urban environment. **Scientia Horticulturae**, v. 286, 2021.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 523 p., 1940.

KIIHL, P.R.P.; PEREIRA, A.R.A.; GODOY, S.M.; STENZEL, N.M.C.; RISSO-PASCOTTO, C. Chromosome stickiness during meiotic behavior analysis of *Passiflora serrato-diditata* L. (Passifloraceae). **Ciência Rural**, v. 41, p. 1018 - 1023, 2011.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. Megadiversidade. **Conservação Internacional**, p.147-155, 2005.

KROSNICK, S.E.; PORTER-UTLEY, K.E.; MACDOUGAL, J.M.; JØRGENSEN, P.M.; MCDADE, L.A. New Insights into the Evolution of *Passiflora* subgenus *Decaloba* (Passifloraceae): Phylogenetic Relationships and Morphological Synapomorphies. **Systematic Botany**, v. 38, p. 692–713, 2013.

KOCH, A. K.; DE REZENDE CARDOSO, A. L.; ILKIU-BORGES, A. L. *Passiflora echinasteris*: a new species of subgenus *Passiflora*, series *Serratifoliae* (Passifloraceae) from the Brazilian Amazon. **Phytotaxa**, v. 208, n. 2, 2015.

KUSWANTO, L.; CHUSNA, N.A.; PURNOMO, E.; KRISANTINI; AHMAD, M.U. Identification and documentation of wild plant species with ornamental potentials at Mount Prau, Central Java, Indonesia. **Ornamental Horticulture**, v. 28, p. 110 - 119, 2022.

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, 2017.

LAVINSCKY, M.P.; SOUZA, M.M.; SILVA, G.S.; SOUZA, V.O.; MELO, C.A.F.; Meiotic analyses of *Passiflora* L. parents and interspecific F1 hybrids (HD15 progeny). **Euphytica**, v. 68, p. 1 - 19, 2021.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, 52, 1–20, 1964.

LOVE, R.M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**, v. 43, p. 72 - 76, 1951.

LIMA, A.A.; BORGES, A.L.; FANCELI, M.; CARDOSO, C.E.L. Maracujá sistema de produção convencional. In: PIRES, M.M.; SÃO JOSE, A.R.; CONCEIÇÃO, A.O. (Org.) **Maracujá: Avanços Tecnológicos e Sustentabilidade**. Ilhéus: Editus, p. 203-238, 2011.

MARTINS, K.C.; PEREIRA, T.N.S.; SOUZA, S.A.M.; COSTA, F.R. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annum* e *Capsicum baccatum*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1746 – 1751, 2010.

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, p. 227 - 235, 2011.

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, p. 161, 2017.

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, p. 309 - 316, 2003.

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

MORENO E.C.; TIAGO A.V.; ROSSI F.S.; ROSSI A.A.B. Biologia floral, morfometria e viabilidade polínica do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f.

flavicarpa Degener). **Enciclopédia Biosfera**, Centro científico Conhecer, v. 11, p. 2094 - 2104, 2015.

CNCFlora. *Passiflora miersii* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Passiflora miersii](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Passiflora%20miersii)>. Acesso em 2 março 2022.

OLIVEIRA, O.L.S.; MELO, C.A.F.; SOUZA, M.M. Searching for intraspecific chromosomal variation in *Passiflora* L. species. **Biologia**, v. s/n, p. 1, 2021.

OLIVEIRA, O.L.S.; SOUZA, M.M.; MELO, C.A.F. Cytogenetics and morphological delimitation between three species of *Passiflora* L. (Subgenus *Distephana* Cervi). **Plant Biology**, v. 21, p. 1 - 8, 2019.

PAMPONÉT, V.C.C.; SOUZA, M.M.; SANTOS, G.S.; MICHELI, F.; MELO, C.A.F.; DE OLIVEIRA, S.G.; COSTA, E.A.; CORRÊA, R.X. Low coverage sequencing for repetitive DNA analysis in *Passiflora edulis* Sims: cytogenomic characterization of transposable elements and satellite DNA. **BMC GENOMICS**, v. 20, p. 262, 2019.

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 - 463, 2005.

POTTER, S.; DEAKIN, J. E. Cytogenetics: an important inclusion in the conservation genetics toolbox. **Pacific Conservation Biology**. 2018.

SADER, M.A.; AMORIM, B.S.; COSTA, L.; SOUZA, G.; PEDROSA-HARAND, A. The role of chromosome changes in the diversification of *Passiflora* L. (Passifloraceae), **Systematics and Biodiversity**, 17:1, 7-21, 2019.

SANTOS, W.V.; RESENDE, L.P.; **Produção de Maracujá**. Viçosa: Centro de produções técnicas, 172 p., 2006.

SCHWARZACHER, T.; HASLOP-HARRISON, P. Practical in situ Hybridization. **Springer-Verlag Inc**. New York, 2000.

SENDA, T.; HIRAOKA, Y.; TOMINAGA, T. Cytological affinities and interfertilities between *Lolium temulentum* and *L. persicum* (Poaceae) accessions. **Hereditas**, v. 142, p. 45 - 50, 2005.

SILVA, G.S. **Contribuição à taxonomia do gênero *Arachis* – secção *Arachis* à luz do estudo de espécies e híbridos interespecíficos**. 2008. 114 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SILVA, E.O; GUARÇONI, E.A.E.; FERREIRA, A.W.C.; OLIVEIRA, M.S.; JUNIOR, C.N.O. First record of *Passiflora pedata* L. (Passifloraceae) from Maranhão state, northeastern Brasil. **Check List the journal of biodiversity**, 12: p. 1-4, 2016.

SILVA, G.S.; SOUZA, M.M.; 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, p. 26, 2018.

SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.; RECCO-PIMENTEL, S. Meiotic behavior
and pollen fertility in sexual and somatic hybrids of *Passiflora* species. **Caryologia**,
v.56, p. 129 - 138, 2003.

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

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T. N. S. Meiotic behavior in wild and domesticated species
of *Passiflora*. **Revista Brasil. Bot.** v. 34, p. 63 – 72, 2011.

SOUZA, M.M., PALOMINO, G., PEREIRA, T.N.S., PEREIRA, M.G., VIANA, A.P.
Flow cytometric analysis of genome length variation in some *Passiflora* species.
Hereditas, 141, 31–38, 2004.

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 Agrotec., v. 26, n. 6, p. 1209 – 1217, 2002.

SOUZA, M.M., PEREIRA, T.N.S., SILVA, L.C., REIS, D.S.S., SUDRÉ, C.P.
Karyotype of six *Passiflora* species collected in the state of Rio de Janeiro. **Cytologia**
68, 165– 587, 2003b.

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, p. 247 – 258, 2008.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.; VIANA, A.P.; SILVA, L.C.; SUDRÉ, C.P. Pollen
viability and fertility in wild and cultivated *Passiflora* species (Passifloraceae).
Beiträge zur Biologie der Pflanzen, v. 73, p. 359 - 376, 2004.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; RODRIGUES, R.; DUTRA, G.A.; SUDRÉ, C.P.
Irregularidade meiótica em pimenta. **Horticultura Brasileira**, v. 18, p. 748 - 749, 2000.

SOUZA, M. M.; URDAMPILLETA, J. D.; FORNI-MARTINS, E. R. Improvements in
cytological preparations for fluorescent *in situ* hybridization in *Passiflora*. **Genetics
and Molecular Research**, v. 9, p. 2148 - 2155, 2010.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; SUDRÉ, C.P.; RODRIGUES, R. Meiotic
irregularities in *Capsicum* L. species. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.
12, p. 138 – 144, 2012.

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**, v. 56, p. 161 - 169, 2003a.

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

STEBBINS, G.L., 1971. **Chromosomal Evolution in Higher Plants**. Edward Arnold, London.

SUMNER, A.T. **Chromosomes: Organization and function**. Oxford: Blackwell publishing, 2003.

TRIVEDI, R. N.; ROY, R. P. Karyological studies in Cucumis and Citrullus. **Caryologia**. v. 35, p. 561 - 569, 1970.

ULMER T, MACDOUGAL JM. **Passiflora - passionflowers of the world**. Timber Press, Portland, 2004.

VIANA, A. J. C.; SOUZA, M. M. Identification of the pattern of heterochromatin distribution in *Passiflora* species with C-banding. **Genetics and Molecular Research**. v.9, p. 1908 - 1913, 2010.

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

CAPÍTULO II

4. ANÁLISES MEIÓTICAS EM GENITORES E HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS F₁ e TRIPLOS DE *Passiflora* L.

EXTRATO

A obtenção de híbridos interespecíficos de *Passiflora* para a ornamentação de jardins e interiores tem sido realizada em muitos países da Europa, da América do Norte e no Brasil. Novos híbridos e cultivares são conduzidos principalmente para resistência a doenças e alta produtividade. O Brasil é centro de diversidade do gênero, com recurso genético aplicado ao melhoramento genético, e a hibridação interespecífica utilizada em programas de melhoramento para ornamentação. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo realizar análises meióticas nos genitores e híbridos triplos artificiais de espécies do gênero *Passiflora*, progênie HD29 [HD25 (*Passiflora coccinea* x *P. hatschbachii*) x *P. tholozani*] e HD30 (HD25 x *P. mucronata*), visando inferir sobre a compatibilidade genética entre genitores e implicações da hibridação no genoma dos híbridos. Botões florais foram coletados em diferentes estágios de desenvolvimento e mantidos no fixador Carnoy I. Para os estudos de citogenética clássica (meiose e pós-meiose) uma antera de cada botão floral foi analisada. A antera foi delicadamente macerada em ácido acético 60% e em seguida corada com carmin acético 2%. Para viabilidade polínica, uma antera de cada flor aberta foi utilizada para cada teste: (i) solução de Alexander e (ii) diacetato de fluoresceína. A análise do comportamento meiótico mostrou a existência de pareamento cromossômico nos híbridos triplos e também formação de quiasmas, mas estes em menor quantidade quando comparado aos genitores. Foi observada a falta de pareamento entre alguns cromossomos, o que levou à formação de cromossomos univalentes. Também foram observadas irregularidades tanto em meiose I quanto em meiose II, com formação de cromossomos retardatários, ponte cromossômica, assincronia, irregularidade de fuso e formação de três núcleos. Nos produtos pós-meióticos foram observadas políades, tétrades, tríades, díades e mônades. Os grãos de pólen (GP) observados com solução de Alexander foram classificados em viáveis e inviáveis, sendo encontrados GP inviáveis do tipo vazio, contraído e pulverizado. Com a solução de diacetato de fluoresceína os GP foram classificados em viáveis e inviáveis. A redução no número de quiasmas observada nos híbridos triplos levou a índices meióticos mais baixos e conseqüentemente, à formação de mais irregularidades durante as fases da meiose e diminuição da fertilidade desses híbridos. Porém, os híbridos foram considerados viáveis para o cultivo e para seleção de cultivares ornamentais.

Palavras-chave: Híbridos triplos, Meiose e pós-meiose, *Passiflora* ornamental, Viabilidade polínica.

ABSTRACT

Obtaining interspecific *Passiflora* hybrids for the ornamentation of gardens and interiors has been carried out in many countries in Europe, North America and Brazil. New hybrids and cultivars are driven primarily for disease resistance and high yields. Brazil is the center of diversity of the genus, with genetic resources applied to genetic improvement, and interspecific hybridization used in breeding programs for ornamentation. In this context, the present work aims to carry out meiotic analyzes on the parents and artificial triple hybrids of species of the genus *Passiflora*, progeny HD29 [HD25 (*Passiflora coccinea* x *P. hatschbachii*) x *P. tholozani*] and HD30 (HD25 x *P. mucronata*), aiming to infer about the genetic compatibility between parents and implications of hybridization in the genome of the hybrids. Flower buds were collected at different stages of development and maintained in Carnoy I fixative. For classical cytogenetic studies (meiosis and post-meiosis) one anther of each flower bud was analyzed. The anther was gently macerated in 60% acetic acid and then stained with 2% acetic carmine. For pollen viability, one anther from each open flower was used for each test: (i) Alexander's solution and (ii) fluorescein diacetate. The analysis of meiotic behavior showed the existence of chromosomal pairing in the triple hybrids and also chiasma formation, but these in smaller quantity when compared to the parents. A lack of pairing between some chromosomes was observed, which led to the formation of univalent chromosomes. Irregularities were also observed both in meiosis I and in meiosis II, with formation of laggard chromosomes, chromosome bridge, asynchrony, spindle irregularity and formation of three nuclei. In the post-meiotic products, polyads, tetrads, triads, dyads and monads were observed. The pollen grains (GP) observed with Alexander's solution were classified as viable and non-viable, with empty, contracted and pulverized non-viable GP. With the fluorescein diacetate solution, the GP were classified as viable and non-viable. The reduction in the number of chiasmata observed in the triple hybrids led to lower meiotic indexes and, consequently, to the formation of more irregularities during the phases of meiosis and a decrease in the fertility of these hybrids. However, the hybrids were considered viable for cultivation and selection of ornamental cultivars.

Keywords: Triple hybrids, Meiosis and post-meiosis, Ornamental *Passiflora*, Pollen viability.

4.1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Passiflora* L. são utilizadas como plantas ornamentais em pérgolas e estufas (RUSHING, 2003). Desde o século XVII, na Europa, especificamente duas espécies eram mais comumente utilizadas para ornamentação, *P. caerulea* L. e *P. incarnata* L. (ULMER; MACDOUGAL, 2004). O primeiro híbrido ornamental *P. 'Violacea'* (*P. caerulea* vs. *P. racemosa* Brot.) foi desenvolvido no início do século XIX, em 1819 por Milne, em Fulham, na Inglaterra (VANDERPLANK, 2000). No Brasil, apesar da grande diversidade de espécies e das condições climáticas favoráveis, o mercado de passifloras com a finalidade ornamental ainda é praticamente inexistente (VANDERPLANK, 2000), sendo mais utilizada na comercialização dos frutos. Entretanto, o uso ornamental das passifloras vem sendo cada vez mais ampliado e divulgado (ABREU et al. 2009, DURANTE, 2013; CARINI, 2014).

Assim, existe um grande interesse na produção de híbridos interespecíficos com características únicas nesse mercado de plantas ornamentais (VANDERPLANK, 2000), entretanto, os híbridos podem ser inviáveis, ou ainda completamente ou parcialmente inférteis (ULMER; MACDOUGAL, 2004). A formação de flores exuberantes, mais vistosas e de coloração exótica é a característica mais essencial para criação de híbridos ornamentais. A hibridação artificial de muitas espécies de *Passiflora* pode acontecer sem dificuldades (VANDERPLANK, 2000). Além disso, híbridos podem surgir naturalmente sem interferência humana, como resultado de polinização por insetos, abelhas e morcegos que voam em diferentes áreas com espécies de *Passiflora* ou por haver espécies compatíveis, principalmente entre aquelas com mesmo número cromossômico (MELO, 2014; MELO et al., 2017), como no caso do híbrido natural *P. 'Rosea'*, resultado do cruzamento entre *P. tripartita* (Juss.) Poir. var. *mollissima* (hoje *P. tarminiana* Coppens & V. Barney) vs. *P. pinnatistipula* Cav. (ULMER; MACDOUGAL, 2004).

Desde 2004, a Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus, BA, possui uma Coleção de Trabalho de *Passiflora* (CT-*Passiflora*) (Antes Banco Ativo de Germoplasma [BAG-Passifloras]) com a finalidade de obter híbridos interespecíficos que reúnam características de interesse ornamental (CONCEIÇÃO et al., 2011). Alguns híbridos já foram produzidos com sucesso no CT-*Passiflora*, como *P. 'Alva'*, *P. 'Aninha'*, *P. 'Priscilla'*, resultantes do cruzamento *P. sub lanceolata* (Killip) MacDougal

vs. *P. foetida* L. var. *foetida* (SANTOS et al., 2012), *P.* ‘Gabriela’ e *P.* ‘Bella’, resultantes do cruzamento *P. gardneri* Mast. e *P. gibertii* N. E. Brown (BELO et al., 2018), *P.* ‘Vivis’ e *P.* ‘Jhovi’, resultantes do cruzamento *P. coccinea* Aubl. e *P. hatschbachii* Cervi (SOUZA et al., 2020). Outros híbridos foram obtidos por cruzamentos entre *P. gardneri* vs. *P. alata* Curtis, *P. watsoniana* Mast. vs. *P. alata*, *P. watsoniana* vs. *P. gardneri* e *P. gardneri* vs. *P. gibertii* (CONCEIÇÃO et al., 2011). Híbridos triplos de *Passiflora* foram produzidos com objetivo aumentar o grau de resistência a doenças, através de cruzamentos F_1 (*P. edulis* f. *flavicarpa* O. Deg. x *P. coccinea*) x *P. edulis* f. *flavicarpa*, F_1 (*P. edulis* f. *flavicarpa* x *P. setacea* DC.) x *P. edulis* f. *flavicarpa* e F_1 (*P. coccinea* x *P. setacea*) x *P. edulis* f. *flavicarpa*, sendo necessário conhecer melhor o germoplasma dessas espécies quanto a sua diversidade e compatibilidade genética, para que esses cruzamentos sejam bem sucedidos (JUNQUEIRA et al., 2005).

Considerando a variabilidade genética do gênero, o conhecimento e o estudo sobre o comportamento cromossômico é o que permite a seleção de espécies com genótipos mais favoráveis para os cruzamentos interespecíficos (OHRI, 1998), corroborando com o sucesso das hibridações e da viabilidade do híbrido já observados (Melo et al., 2017). O caráter híbrido de uma planta pode ser determinado de diversas formas, como por exemplo, pelo número, tamanho e forma dos cromossomos e pelo seu comportamento meiótico (SOARES-SCOTT et al., 2005). Assim, as análises meióticas fornecem informações detalhadas sobre o comportamento cromossômico e sobre a fertilidade de uma espécie, e é considerada uma ferramenta importante para auxiliar nos cruzamentos interespecíficos em programas de melhoramento de plantas (KIIHL et al., 2011).

O pareamento entre os cromossomos homeólogos, a recombinação cromossômica, o grau de irregularidades meióticas e a viabilidade dos gametas são informações adquiridas por meio das análises meióticas, importantes para o planejamento de hibridações através de gerações (SOUZA et al., 2003), pois indicam a homologia entre as espécies genitoras e gera indivíduos com variabilidade genética, que podem resultar em características mais desejáveis para o mercado. O pareamento cromossômico é um dos eventos mais importante na meiose, tanto para ocorrência de recombinação, quanto para a exata segregação dos cromossomos (FACHINETTO;

TEDESCO, 2009). Quando ocorre erro no pareamento, na manutenção dos bivalentes ou na formação das fibras do fuso, a segregação pode ocorrer de forma desequilibrada e os gametas podem receber uma quantidade desbalanceada de cromossomos, levando à diminuição da quantidade de gametas viáveis (SOUZA et al., 2003).

O presente trabalho teve como objetivo analisar o comportamento meiótico e a viabilidade polínica dos genitores *P. tholozanii* Sacco, *P. mucronata* Lam., híbrido F₁ HD25 e de dois híbridos triplos HD29 e HD30 visando inferir sobre a compatibilidade genética entre os genitores e quais as implicações da hibridação no genoma dos híbridos triplos.

4.2 MATERIAL E MÉTODO

4.2.1 Material vegetal

A hibridação interespecífica entre as espécies *P. coccinea* Aubl. (Acesso 505) e *P. hatschbachii* Cervi (Acesso 446) deu origem ao híbrido simples F₁ HD25 (SOUZA et al. 2020). Alguns genótipos das progênes HD25 foram cruzados com as espécies *P. tholozanii* Sacco (Acesso 133) e *P. mucronata* Lam. (Acesso 509) dando origem a dois híbridos triplos denominados de HD29 e HD30, respectivamente (SANCHÊS, 2018) (Figura 1). As espécies e os híbridos triplos vêm sendo mantidos em cultivo protegido (sombreamento de 50%) e em pleno sol, no CT-*Passiflora* da Universidade Estadual Santa Cruz (UESC), localizado em 14° 39` S, 30° 10` W; 78m de altitude; Ilhéus, BA, Brasil.

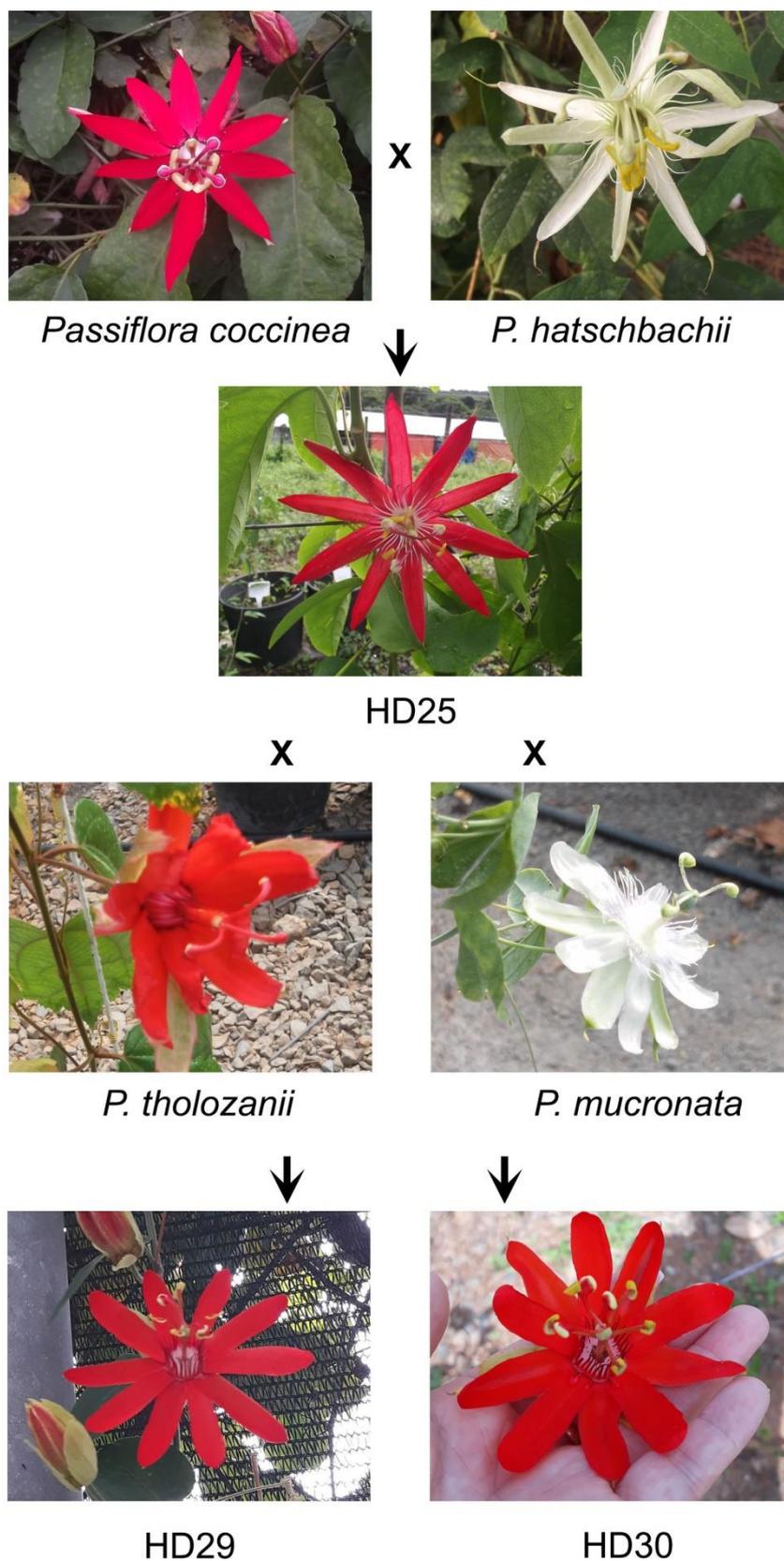


Figura 1. - Esquema de hibridações realizadas com sucesso em espécies de *Passiflora* ($2n = 18$).

4.2.2 Condições de Cultivo

Estacas foram obtidas para manutenção dos genótipos e coleta de botões florais. As estacas foram mantidas em sacos de polietileno com volume de 1 L, contendo areia lavada. Em seguida, foram transferidas para vasos de 10 L, contendo terra peneirada e o nematicida Furadan[®]. O controle de pragas foi realizado com o defensivo agrícola Decis[®]. Fungos foram controlados com pulverização de produtos a base de cobre (Fungitol). As plantas foram podadas mensalmente e regadas todos os dias. A nutrição das plantas foi realizada todo mês com 23,3 g/L de uréia e uma solução de micronutrientes (1,019 g/L Bo; 2,5 g/L Cu; 0,14 g/L Mo; 8,4 g/L Zn; 5,58 g/L Mn); a cada três meses foi utilizado 15g/L de KCl e a cada seis meses foi utilizado 34,3 g/L de fosfato de amônia (MAP).

4.2.3 Comportamento meiótico e pós-meiótico

Botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletados e fixados em Carnoy I (etanol: ácido acético 3:1, v/v; JOHANSEN, 1940), com trocas realizadas nos períodos de 30 e 180 minutos em temperatura ambiente (TA), e estocados a -20 °C por 24 horas. Os botões foram transferidos para etanol 70% e mantidos a ± 10 °C até a análise. Foi utilizada apenas uma antera de cada botão floral para análise. Lâminas temporárias foram preparadas pela técnica de esmagamento. As anteras foram amaciadas com duas gotas de ácido acético 60% por 7 minutos e, depois de retirado o ácido com papel de filtro, coradas com carmim acético 2% (SOUZA; PEREIRA, 2011). Foram observadas 50 células de cada fase meiótica, por genitor e planta híbrida. Foi analisada a frequência de quiasmas terminal, intersticial e total para o cálculo do índice de recombinação ($IR = [\sum n^\circ \text{ total de quiasmas} \div n^\circ \text{ de células analisadas}] + \text{valor de } n$) (DARLINGTON, 1958), sendo considerado um quiasma para os bivalentes associados em bastão (*rod*) e dois quiasmas para os bivalentes associados em anel (*ring*) (SENDA et al., 2005). Os números dos produtos pós-meióticos (mônades, díades, tríades, tétrades e políades) foram registrados para o cálculo do índice meiótico ($IM (\%) = [n^\circ \text{ de tétrades normais} \times 100] \div n^\circ \text{ de produtos pós-meióticos contados}$) (LOVE, 1951) e para a análise de variância (ANOVA), considerando-se

delineamento inteiramente ao acaso, com repetições de quatro lâminas por genótipo. Foi utilizado o programa computacional SISVAR (*open source*).

Para registro das fases meióticas e pós-meióticas, as lâminas temporárias foram mergulhadas em ácido acético 60% por 1 hora e em etanol 70% para retirada do carmim acético e por 30 minutos para retirada da lamínula. As lâminas foram secas em TA, coradas com 2 μ L DAPI (Sigma, D9542; 2 μ g/mL) detectado com o filtro U-MWU (330-385 nm de excitação/emissão > 420 nm) e fotografadas em microscópio de epifluorescência Olympus BX41 equipado com câmera digital de 5M Olympus DP25 e com o *software* DP2-BSW.

4.2.4 Viabilidade polínica

Para análise da viabilidade polínica, flores abertas foram coletadas ao acaso em diferentes horários e os grãos de pólen (GP) foram testados com dois corantes: (i) solução de Alexander (ALEXANDER, 1969), que utilizou a tripla coloração com laranja G (intensificador), fucsina básica (cora o citoplasma de vermelho; Sigma, P1528) e verde malaquita (cora de verde a parede do grão de pólen) que proporcionou a reatividade da parede/citoplasma, sendo considerados viáveis os GP corados e com citoplasma íntegro; os GP inviáveis foram classificados em três tipos: tipo 1 (T1), vazio (ausência de citoplasma); tipo 2 (T2), citoplasma contraído (SOUZA et al., 2004) e tipo 3 (T3), citoplasma pulverizado (ABREU, 2008); (ii) diacetato de fluoresceína (Sigma, F7378) (HESLOP-HARRISON; HESLOP-HARRISON, 1970), fluorocromo que indica presença de atividade da enzima esterase relacionada com a integridade da plasmalema, sendo considerado viável o GP cujo citoplasma tenha corado de amarelo-esverdeado fluorescente, observando-se apenas os tipos viável e inviável.

Para o teste com solução de Alexander, uma antera aberta foi delicadamente colocada sobre uma gota do corante para liberar os GP e, em seguida, os GP foram observados em microscópio de luz quanto ao aspecto morfológico e corabilidade. Para o teste com diacetato de fluoresceína, uma antera foi delicadamente colocada sobre o fluorocromo em lâmina, incubada em câmara úmida por 10 min no escuro em TA. Os GP foram contados e observados quanto à corabilidade utilizando-se o microscópio de epifluorescência Olympus BX41 com filtro U-MWB (450-480 nm de excitação/emissão > 515 nm), equipado com câmera digital de 5M Olympus DP25 e com

o *software* DP2-BSW. Foram analisadas quatro plantas (repetições) por acesso e 1000 GP foram contados por repetição/acesso.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Meiose e pós-meiose

As espécies genitoras, *P. tholozanii* e *P. mucronata*, o híbrido F₁ HD25 e os dois híbridos triplos HD29 e HD30 estudados apresentaram número cromossômico $2n = 18$ e número haploide $n = 9$. Em diacinese foram observadas diferentes associações cromossômicas nos genótipos com predominância de associações bivalentes (um par de cromossomos homólogo e homeólogos), mas também foram encontradas associações tetravalentes (4 cromossomos ou 2 pares de cromossomos) e muitos cromossomos univalentes (ausência de pareamento) (Figura 2). Nessa mesma fase, foram observados quiasmas terminais e intersticiais, com predominância de quiasmas intersticiais em todos os genótipos. A frequência de quiasmas foi menor nos híbridos triplos HD29 e HD30, de 6,24 e 5,98 respectivamente, comparados aos genitores (Tabela 1).

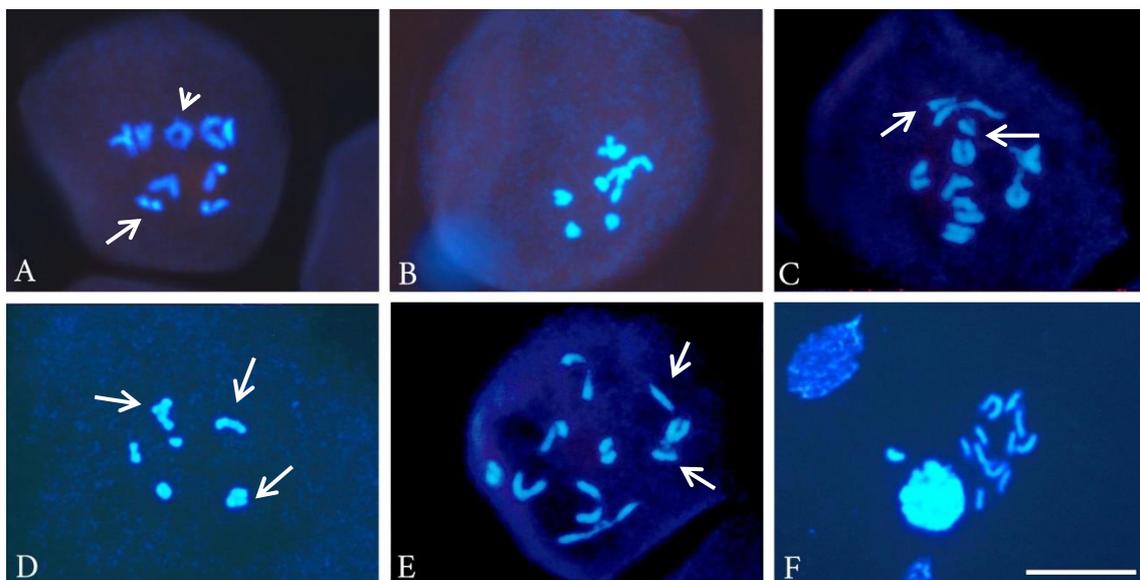


Figura 2. Configuração do pareamento cromossômico e de quiasmas em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* ($n = 9$) corados com DAPI. (A) *P. mucronata* com formação de 9 bivalentes e formação de quiasma intersticial (seta) e quiasma terminal (ponta de seta) (B) *P. tholozanii* com formação de 9 bivalentes (C) Híbrido F₁ HD25 com 8 bivalentes e 2 univalentes (setas) (D) Híbrido triplo HD29 com 3

bivalentes e 3 tetravalentes (setas) (E) Híbrido triplo HD30 com 8 bivalentes e 2 univalentes (setas) (F) HD29 com cromossomos univalentes. Barra = 20 μm .

Tabela 1. Número e localização de quiasmas observados por célula em diacinese e índice de recombinação (IR) em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* ($n = 9$).

Genótipos	Terminal		Intersticial		TQ Média	IR
	Média	(Min-Max \pm dp)	Média	(Min-Max \pm dp)		
<i>P. tolozanii</i>	3,95a	(1-7 \pm 1,33)	5,7a	(2-8 \pm 1,48)	9,64	18,6
<i>P. mucronata</i>	3,94a	(1-7 \pm 1,82)	6,92b	(4-9 \pm 1,24)	10,86	19,8
HD25	3,24a	(1-5 \pm 1,30)	4,42c	(2-7 \pm 1,23)	7,66	16,6
HD29	2,38b	(0-4 \pm 1,15)	3,86c	(2-6 \pm 0,85)	6,24	15,2
HD30	2,18b	(0-5 \pm 1,24)	3,8c	(2-5 \pm 1,01)	5,98	14,9

Genitores: *P. tholozanii*, *P. mucronata*; híbrido F_1 : HD25; híbridos triplos: HD29 e HD30.

Min = mínimo; Max = máximo; dp = desvio padrão; TQ = total de quiasmas.

Valores seguidos pelas mesmas letras nas colunas não difere estatisticamente pelo teste de Tukey.

A análise de variância mostrou diferença significativa tanto para localização de quiasmas terminais quanto para os quiasmas intersticiais ($P < 0,05$) entre os genitores e híbridos (Tabela 2).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para os tipos de quiasmas (Q) em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* ($n = 9$).

Fonte de variação	GL	Quadrado médio	
		Q Terminal	Q Intersticial
Genótipos	4	34,8*	90,4*
Erro	245	1,6	1,5
Coeficiente de variação (%)		41,1	25,1

Genitores: *P. tholozanii*, *P. mucronata*; híbrido F_1 : HD25; híbridos triplos: HD29 e HD30. GL = graus de liberdade, * $P < 0,05$.

Irregularidades no comportamento meiótico dos genitores e, principalmente, dos híbridos foram observadas durante as fases da meiose I e II (Figuras 3 e 4; Tabela 3). Foi encontrado maior quantidade de células com cromossomos precoces e retardatários

em metáfase I, anáfase I e telófase I em todos os genótipos (Figura 3D e 3F), porém observados em menor quantidade na meiose II (Tabela 3). Apenas nos híbridos triplos foram encontradas a formação de ponte cromossômica durante a segregação cromossômica em anáfase I (Figura 3E). Na meiose II foram encontradas irregularidades na orientação das fibras do fuso em meiose II, onde grupos cromossômicos de uma mesma célula se posicionaram na placa metafásica de forma irregular, dando origem à formação de fuso tripolar em formato de “V” (Figura 4E) ou fuso transversal em formato de “T” (Figura 4F e 4G). Em algumas células também foram observadas assincronia durante a divisão celular, com células apresentando um grupo cromossômico em metáfase e outro em anáfase, ou um grupo cromossômico na placa metafásica e outro grupo desorganizado (Figura 4H), o que leva a formação de produtos pós-meióticos irregulares.

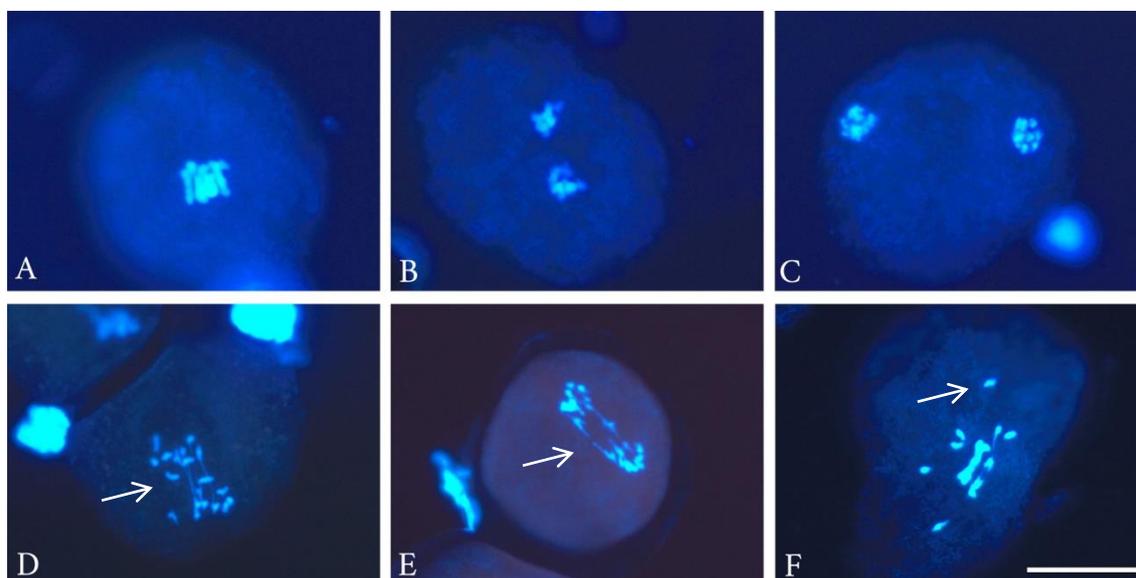


Figura 3. Comportamento meiótico em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* ($n = 9$) corados com DAPI. A – C meiose I regular. (A) Metáfase I em *P. tholozanii* (B) Anáfase I em *P. mucronata* (C) Telófase I em híbrido F_1 HD25. D – F meiose I irregular. (D) Anáfase I com cromossomos retardatários em híbrido triplo HD29 (E) Ponte cromossômica em híbrido triplo HD30 (F) Anáfase I com cromossomos retardatários em HD30. Irregularidades indicadas com setas. Barra = 20 μ m.

Tabela 3. Irregularidades no comportamento meiótico em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* ($n = 9$).

Genótipos	Cromossomos	Ponte	Assincronia	Irregularidade	Três
-----------	-------------	-------	-------------	----------------	------

	preoces/retardatários						cromossômica						de fuso		núcleos	
	MI	AI	TI	MII	AII	TII	AI	AII	MII	AII	MII	AII	TII	TII		
<i>P. tolozanii</i>	15	8	7	7	5	4	-	-	7	6	5	5	4	3		
<i>P. mucronata</i>	11	8	7	5	6	4	-	-	4	5	4	8	7	4		
HD25	15	9	8	8	5	9	-	-	8	7	7	8	8	3		
HD29	21	14	11	14	10	9	2	-	7	5	15	16	14	7		
HD30	17	14	15	9	18	12	3	-	11	8	14	11	16	9		

Genitores: *P. tholozanii*, *P. mucronata*; híbrido F₁: HD25; híbridos triplos: HD29 e HD30.

M = metáfase; A = anáfase; T = telófase; I = meiose I; II = meiose II.

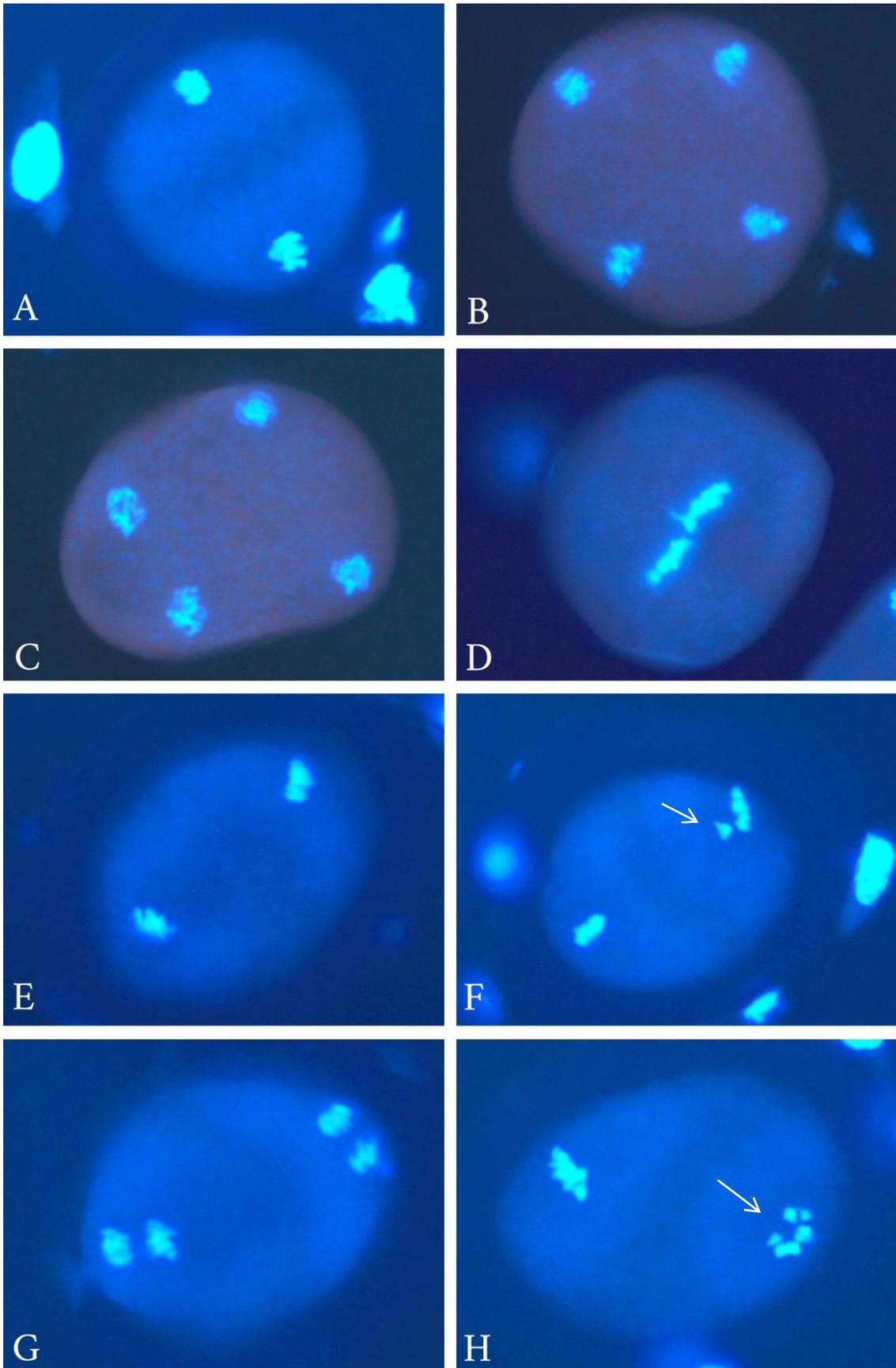


Figura 4. Comportamento meiótico em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* ($n = 9$) corados com DAPI. A – C meiose II regular. (A) Metáfase II em *P. tolozanii* (B) Anáfase final II em *P. mucronata* (C) Telófase II em híbrido F₁ HD25. D – H meiose II irregular. (D) Metáfase II com irregularidade no alinhamento na placa metafásica em híbrido triplo HD29 (E) Metáfase II irregular com formação de fuso tripolar (V) em híbrido triplo HD30 (F) Metáfase II irregular com formação de fuso transverso (T) e cromossomo retardatário (seta) em HD29 (G) Anáfase II com formação de fuso transverso em HD30 (H) Metáfase com assincronia em HD30 (seta). Barra = 20 μ m.

Nos produtos pós-meióticos foram observados maior formação de tétrades normais, porém com outras irregularidades encontradas como tríades, díades, mônades e políades, sendo a tríade a mais frequente (Figura 5, tabela 4). O IM ficou acima de 90% para as espécies genitoras e 86% para o híbrido F₁ HD25, porém com percentual mais baixo para os híbridos triplos HD29 e HD30, de 70,8% e 69,6% respectivamente (Tabela 4). A análise de variância mostrou diferença significativa ($P < 0,05$) para todos os produtos pós-meióticos observados (Tabela 5).

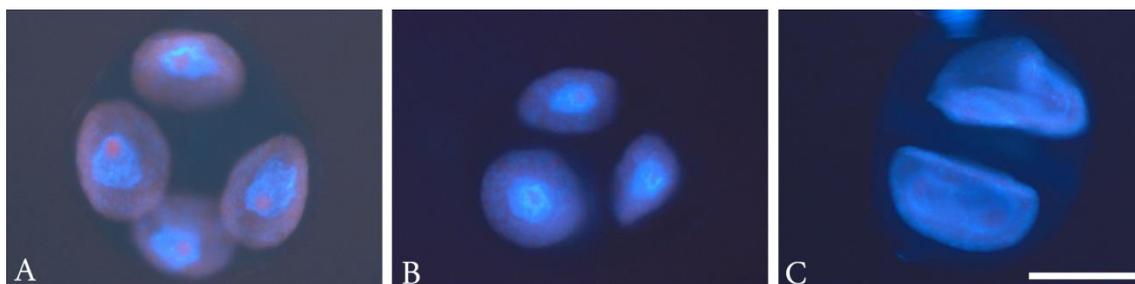


Figura 5. Pós-meiose em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* ($n = 9$) corados com DAPI. (A) Tétrade normal em *P. mucronata* (B) Tríade em híbrido triplo HD29 (C) Díade em híbrido triplo HD30. Barra = 20 μ m.

Tabela 4. Valores médios de produtos pós-meióticos (tétrades normais e irregularidades) e índice meiótico (IM) em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* ($n = 9$).

Genótipos	Produtos pós-meiótico						IM (%)
	Tétrades normal	Irregularidades				Total PPM	
		mónades	díades	tríades	políades		
<i>P. tolozanii</i>	1275a	0a	5,5a	32,2a	2,5a	1315	96,9
<i>P. mucronata</i>	1349a	0a	3a	38,7a	4,2a	1395	96,7
HD25	746b	5b	8,5b	98,5b	21b	879	86,9
HD29	438c	7c	12,7c	128c	32c	618	70,8
HD30	478c	9c	20,2c	137c	42,5d	686,7	69,6

Genitores: *P. tholozanii*, *P. mucronata*; híbrido F₁: HD25; híbridos triplos: HD29 e HD30.

IM = índice de recombinação, PPM = produtos pós-meióticos.

Valores seguidos pelas mesmas letras nas colunas não difere estatisticamente pelo teste de Tukey.

Tabela 5. Resumo da análise de variância para os diferentes tipos de produtos pós-meióticos em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* ($n = 9$).

FV	GL	QM				
		Tétrades	Tríades	Díades	Mônades	Políades
Genótipos	4	748310,8*	9638,8*	184,1*	66,8*	1204,5*
Erro	15	2006,8	109,1	14,3	2,9	15,3
CV (%)		5,2	12	37,9	40,7	19,1

Genitores: *P. tholozanii*, *P. mucronata*; híbrido F₁: HD25; híbridos triplos: HD29 e HD30.

FV = Fonte de variação; GL = grau de liberdade; CV = coeficiente de variação; QM = quadrado médio; *P < 0,05.

4.3.2 Viabilidade polínica

Os grãos de pólen dos genitores, do híbrido F₁ HD25 e dos híbridos triplos HD29 e HD30 reagiram positivamente aos dois testes utilizados (Figura 6). Com a solução de Alexander, os genitores *P. tholozanii*, *P. mucronata* apresentaram maiores percentuais de GP viáveis, com parede e citoplasma íntegros, de 84,5 e 86,5% respectivamente (Figura 6A). No genitor híbrido F₁ HD25 o percentual médio de GP viáveis foi de 43,8% e nos híbridos triplos HD29 e HD30 de 35,4 e 32,5% respectivamente (Figura 6B). Foram observados três tipos de GP inviáveis. O maior percentual de GP T1 (vazio) foi encontrado no genitor híbrido F₁ HD25 (16,8%), o GP T2 (citoplasma contraído) foi encontrado no híbrido triplo HD30 (16%) e o GP T3 (citoplasma fragmentado) foi observado somente nos híbridos, com maior percentual em HD29 (41,3%) (Figura 6C, 6D, 6E e Tabela 6). Para análise da viabilidade polínica utilizando o fluorocromo diacetato de fluoresceína foram observados altos percentuais de grãos de pólen viáveis para os genitores, acima de 80%, porém no híbrido F₁ HD25 e nos híbridos triplos HD29 e HD30 esse percentual foi bem reduzido, de 10,6%, 6,9% e 9,7% respectivamente (Figura 6F e Tabela 6). A análise de variância mostrou haver diferenças bem significativas (P < 0,05) para viabilidade polínica em ambos os testes e

para os diferentes tipos de inviabilidade, vazio (T1), contraído (T2) e pulverizado (T3) (Tabela 7).

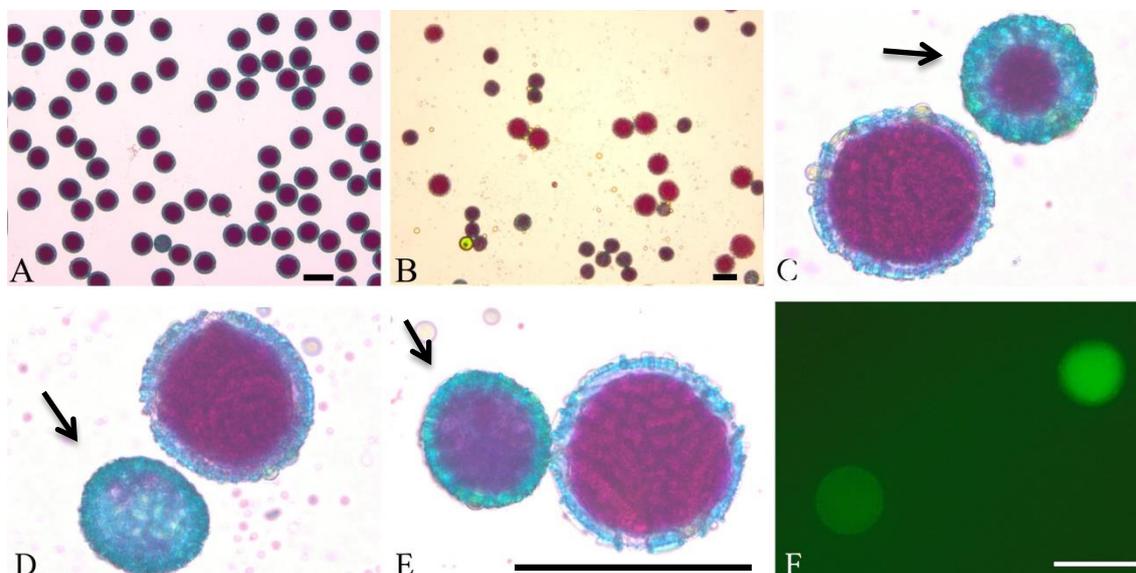


Figura 6. Grãos de pólen (GP) em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* ($n = 9$). A – E teste com solução de Alexander. (A) GP viáveis e vazios (seta) em *P. mucronata* (B) GP inviáveis e viáveis em HD29. Barra = 100 μm . (C) GP tipo contraído (seta) em *P. tholozanii* (D) GP tipo vazio (seta) em híbrido F_1 HD25 (E) GP tipo pulverizado (seta) em híbrido triplo HD30. Barra = 25 μm . (F) teste com diacetato de fluoresceína em híbrido triplo HD29, com GP viável fluorescente e inviável sem fluorescência. Barra = 50 μm .

Tabela 6. Valores percentuais médios de GP viáveis e inviáveis T1, T2 e T3 utilizando diacetato de fluoresceína e solução de Alexander em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* ($n = 9$).

Genótipos	Diacetato de fluoresceína		Solução de alexander			
	% GP viável	% GP inviável	% GP T1	% GP T2	% GP T3	% GP viável
<i>P. tholozanii</i>	83,5a	16,5a	7,4a	8,1a	0,0a	84,5a
<i>P. mucronata</i>	82a	18a	8,3a	5,2a	0,0a	86,5a
HD25	10,6b	89,4b	16,8b	13,3b	26,1b	43,8b
HD29	6,9b	93,1b	10,9c	12,4b	41,3c	35,4c
HD30	9,7b	90,3b	11,7c	16c	39,8c	32,5c

Genitores: *P. tholozanii*, *P. mucronata*; híbrido F_1 : HD25; híbridos triplos: HD29 e HD30.

GP = grão de pólen; T1 = vazio; T2 = contraído; T3 = pulverizado.

Valores seguidos pelas mesmas letras nas colunas não difere estatisticamente pelo teste de Tukey.

Tabela 7. Resumo da análise de variância para o total de GP viável (V) e inviável (Iv) com diacetato de fluoresceína e solução de Alexander em espécies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* ($n = 9$).

FV	GL	QM					
		Diacetato de fluoresceína		Solução de Alexander			
		GP V	GP Iv	GP V	GP Iv T1	GP Iv T2	GP Iv T3
Genótipos	4	652365,2*	652365,2*	286649,2*	5438,8*	7430*	167257,2*
Erro	15	1358,1	1358,1	730	316,2	668,8	490,6
CV (%)		9,5	6	4,7	16,1	23,5	10,3

Genitores: *P. tholozanii*, *P. mucronata*; híbrido F₁: HD25; híbridos triplos: HD29 e HD30.

FV = fonte de variação; GL = grau de liberdade; CV = coeficiente de variação; QM = quadrado médio; GP = grão de pólen; T1 = vazio; T2 = contraído; T3 = pulverizado; *P < 0,05.

4.4 DISCUSSÃO

O processo meiótico regular produz células pós-meióticas normais e gametas viáveis, e a compreensão da fertilidade de uma espécie aumenta as chances de sucesso em cruzamentos para a produção de híbridos intra e interespecíficos e em programas de melhoramento genético (MARTINS et al., 2010). O estudo da meiose em plantas é relevante para o melhoramento genético, considerando que na meiose ocorre a recombinação de alelos, podendo resultar em variabilidade genética. Essa recombinação acontece por meio do *crossing over* e é essencial na adaptação das populações e na evolução dos seres vivos (GUERRA, 1988). O pareamento cromossômico é um dos eventos mais importantes da meiose. Em híbridos interespecíficos, onde a célula carrega no núcleo genomas de genitores diferentes, pode ocorrer ausência de pareamento entre os genomas durante as fases da meiose afetando diretamente o seu potencial reprodutivo.

Nas espécies genitoras *Passiflora tholozanii*, *P. mucronata*, no híbrido F₁ HD25 e nos híbridos triplos HD29 e HD30 o número haploide foi confirmado $n = 9$ com pareamento cromossômico e formação de bivalentes. A presença de bivalentes é indicativo de recombinação meiótica entre os cromossomos homólogos e os homeólogos em híbridos (SOARES-SCOTT et al., 2003). Algumas irregularidades como a formação de tetravalentes e principalmente univalentes também foram

encontradas, com maior frequência nos híbridos triplos. Cruzamento entre espécies com genomas semelhantes tendem a produzir híbridos com altos índices de pareamento entre os cromossomos homeólogos, em contrapartida, espécies que estão geneticamente distantes podem originar híbridos com baixa formação de pareamento levando à infertilidade total ou parcial (LEE et al., 2011). A distância genética pode ser um fator limitante em cruzamentos e a utilização de dados sobre o pareamento cromossômico é útil na seleção de genótipos para programas de melhoramento, já que o grau de similaridade entre cromossomos homeólogos nos híbridos demonstra o grau de proximidade entre os genitores (TECHIO; DAVIDE, 2007). Todas as espécies envolvidas nos cruzamentos interespecíficos para produção dos híbridos triplos pertencem ao subgênero *Passiflora* e apenas a espécie *P. tholozanii* pertence ao subgênero *Distephana* (Juss.) Killip (FEUILLET; MACDOUGAL, 2004). Apesar das diferentes configurações cromossômicas encontradas nesse estudo, o pareamento entre cromossomos homeólogos indica algum grau de similaridade estrutural e genômica, demonstrando uma proximidade filogenética entre elas e fornecendo evidências de fluxo gênico entre as espécies genitoras e conseqüentemente, ganho genético (TECHIO; DAVIDE, 2007; OLIVEIRA et al., 2020). Estudos aprofundados sobre a diversidade genética permite a seleção de diferentes espécies com características desejáveis e que apresentem divergência suficiente para gerar variabilidade genética (OLIVEIRA et al., 2020).

Outros híbridos de *Passiflora* já foram estudados quanto ao pareamento cromossômico, como os da progênie F_1 , resultantes do cruzamento de *P. gardneri* vs *P. gibertii*, que demonstraram pareamento com formação de bivalentes e outras configurações como univalentes, tetravalentes e multivalentes (BELO et al., 2018; LAVINSCKY et al., 2021). Em plantas tetraploides de *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. ($2n = 4x = 28$), *Paspalum notatum* Flüggé ($2n = 4x = 40$) e em híbridos F_1 tetraploides, também foram observados diferentes associações cromossômicas, incluindo trivalentes, porém a formação de bivalentes foi predominante e tende a ser regular em plantas tetraploides (KRYCHI et al., 2016; TOLOMEOTTI et al., 2018; KRYCHI et al., 2020).

A quantidade de quiasmas foi observada nas células em diacinese em todos os genótipos e demonstrou a formação de quiasmas terminais e quiasmas intersticiais. O total de quiasmas variou com média de 9,64 em *P. tholozanii* e 5,98 no híbrido triplo

HD30. A média total de quiasmas foi menor para os híbridos triplos comparados às espécies genitoras e em todos os genótipos foram observados maior formação de quiasmas intersticiais, corroborando com outros estudos de espécies e híbridos de passifloras (SOUZA et al., 2003; SOUZA; PEREIRA, 2011; BELO et al., 2018; LAVINSCKY et al., 2021). A formação de quiasma terminal mantém a estrutura física do bivalente para a perfeita segregação cromossômica e o quiasma intersticial é indicador de recombinação genética (LOPES, 2006; SOUZA et al., 2012). A quantidade de quiasmas influenciou diretamente no índice de recombinação nesse estudo, com IR mais alto nas espécies, entretanto, apesar da baixa frequência de quiasmas e menor IR nos híbridos triplos, a formação de bivalentes e a ocorrência de quiasmas intersticiais sugerem que houve pareamento e recombinação entre os cromossomos homeólogos das espécies genitoras nos híbridos.

Os fenômenos que ocorrem na meiose requerem mecanismos geneticamente controlados para pareamento cromossômico, formação de *crossing over* e disjunção de todos os cromossomos corretamente (KARSBURG; BATTISTIN, 2006), sendo assim, são passíveis de mutação e responsáveis por algumas irregularidades meióticas, como os cromossomos retardatários (CONSOLARO et al., 1996) e a formação anormal das fibras do fuso (SHAMINA, 2005). Irregularidades foram observadas em todas as fases da meiose nos genitores e híbridos triplos. A formação de cromossomos retardatários ou precoces foi observada na meiose I e se caracteriza pela presença de um ou mais cromossomos univalentes que não se alinham na placa metafásica e não são capturados pelas fibras do fuso em anáfase, devido à separação precoce dos bivalentes como consequência da baixa frequência de quiasmas. Nos híbridos triplos essa irregularidade foi mais encontrada e isso se deve à ocorrência principalmente de poucos quiasmas terminais, pois eles mantêm a estrutura física do bivalente para a perfeita segregação cromossômica (LOPES, 2006; SOUZA et al., 2012) e a baixa ocorrência de quiasmas leva à formação de univalentes. Cromossomos precoces e retardatários podem levar à formação de micronúcleos e uma segregação irregular, como observado no híbrido somático de *P. edulis* f. *flavicarpa* vs. *P. incarnata* e em híbrido sexuado de *P. edulis* f. *flavicarpa* vs. *P. setacea* (SOARES-SCOTT et al., 2003), em híbridos F₁ denominados progênie HD15 (LAVINSCKY et al., 2021) e em outras espécies como *Paspalum*

notatum (KRYCHI et al., 2016) e *Tropaeolum pentaphyllum* (TOLOMEOTTI et al., 2018), ambas espécies tetraploides.

A formação de fusos anormais em forma de “T” (transverso) ou “V” (tripolar) foi a segunda irregularidade mais observada no presente estudo, principalmente nos híbridos triplos e ocorre devido à desorientação das fibras do fuso, que não se alinham de forma paralela e se organizam de forma transversa ou convergente (GROSSI et al., 2011). Irregularidades na orientação das fibras do fuso foram observadas em diversas espécies de *Passiflora* e híbridos interespecíficos (SOARES-SCOTT et al., 2003; SOUZA; PEREIRA, 2011; SOUZA et al., 2003; SOUZA et al., 2008, LAVINSCKY et al., 2021) e ambas as formas de irregularidade levam a alterações na posição dos quatro núcleos formados ao final da meiose, na telófase II, dando origem a gametas desbalanceados com duplicação do material genético (euploidia), formando gametas não reduzidos ou causando perda do material genético (aneuploidia).

Outra irregularidade encontrada foi a assincronia, observada em metáfase II e anáfase II e caracteriza-se pela presença de dois grupos cromossômicos em fases diferentes da meiose, dentro de uma mesma célula. A assincronia foi encontrada em todos os genótipos, porém com maior frequência no híbrido triplo HD30 e pode ser consequência da despolimerização das fibras do fuso acromático levando à formação de três núcleos em telófase II (SOUZA et al, 2003). Essa irregularidade é caracterizada pela presença de células apresentando um grupo cromossômico em metáfase e outro em anáfase, ou um grupo cromossômico alinhado na placa metafásica e outro grupo desorganizado ou ainda em início de prometáfase.

A formação de ponte cromossômica foi observada apenas nos híbridos triplos e em anáfase I. Essa irregularidade já foi relatada em outros estudos e observada em espécies silvestres de *Passiflora*, como *P. gibertii* (SOUZA; PEREIRA, 2011), *P. gardneri*, em híbridos F₁ da progênie HD15 (LAVINSCKY et al., 2021) e em outras espécies, como *Paspalum notatum* (KRYCHI et al., 2016). Ponte cromossômica é a irregularidade menos observada em estudos com passifloras e pode ser consequência de erros no *crossing over*, surgindo em momentos de quebra e fusão espontâneas entre cromossomos homólogos ou pode estar relacionada com inversões paracêntricas ou falhas na terminalização dos quiasmas (ELLIOTT, 1958; LEVIN, 2002; ORTIZ et al., 2011).

As irregularidades cromossômicas observadas durante as fases da meiose são responsáveis por originar produtos pós-meióticos anormais, como tríades, díades, mônades e políades. Tríade foi à irregularidade mais observada em todos os genótipos, mas em maior quantidade no híbrido F₁ HD25 e nos híbridos triplos, provavelmente pela quantidade maior de irregularidades encontradas durante o curso da meiose, corroborando com outros estudos envolvendo híbridos F₁ (BELO et al., 2018; SOUZA et al., 2020; LAVINSCKY et al., 2021). Ao final da telófase II, a posição e o número de núcleos formados determinam a citocinese e o alinhamento na região central, e a divisão do citoplasma é regulado pela localização dos cromossomos (LORSON et al., 2000). Assincronia, formação de fuso transversal ou tripolar e cromossomos precoces ou retardatários causam em grande parte desbalanceamento cromossômico resultando em tríades e díades com células não reduzidas (euploidia) ou com número cromossômico irregular (aneuploidia). A formação de mônades foi encontrada apenas no híbrido F₁ HD25 e nos híbridos triplos, e pode ter sido resultado da ausência de citocinese ao final da telófase II, como observado em outras espécies do gênero *Passiflora* e em híbridos F₁ (SOUZA; PEREIRA, 2011; LAVINSCKY et al., 2021). Políades foram bastante encontradas nos híbridos triplos e podem estar relacionadas com a presença de cromossomos precoces e retardatários dando origem a células com aneuploidia. Análises envolvendo híbridos F₁ HD13 do cruzamento de *P. subblanceolata* vs *P. foetida* var. *foetida* permitiu a observação de híbridos com aneuploidias e uma das hipóteses relatadas para a perda cromossômica foi a existência de assincronia (SANTOS et al., 2012).

O IM ficou acima de 90% nas espécies genitoras, indicando regularidade na meiose e na pós-meiose. Segundo Love (1951), IM acima de 90% indica estabilidade meiótica. Muitas espécies de *Passiflora* possuem IM acima de 90% como em *P. edulis* Sims, *P. alata*, *P. rubra* L., *P. cincinnata* Mast., *P. edmundoi* Sacco, *P. gibertii*, *P. gardneri* (SOUZA et al., 2003; SOUZA; PEREIRA, 2011; BELO et al., 2018; LAVINSCKY et al., 2021). Entretanto, foram observados IM mais baixos no híbrido F₁ HD25 e nos híbridos triplos, o que resultou em muitos produtos pós-meióticos e instabilidade meiótica, produzindo gametas aneuploides e poliploides.

Os GP dos genitores e híbridos reagiram positivamente aos dois testes aplicados. Altos percentuais de grãos de pólen viáveis são esperados como resultado de grandes

quantidades de tétrades normais observadas na pós-meiose, em consequência de uma meiose regular (CORRÊA et al., 2005). Porém a formação de GP inviáveis pode ocorrer devido a anomalias na segregação cromossômica na androgametogênese e irregularidades durante a fase da pós-meiose (TWEL, 1995; SOUZA et al., 2004). Utilizando a solução de Alexander, foi observado viabilidade polínica acima de 80% nas espécies genitoras, corroborando com outros estudos envolvendo espécies de *Passiflora*, como *P. alata*, *P. capsularis* L., *P. foetida* (MELETTI et al., 2003; SOUZA et al., 2004), *P. edmundoi* (SOUZA et al., 2003), *P. edulis* (SOUZA et al., 2004; MORENO et al., 2015), *P. cincinnata*, *P. quadrangularis* L. (BRITTO et al., 2018), *P. coccinea*, *P. hatschbachii* (SOUZA et al., 2020), *P. gibertii* e *P. gardneri* (BELO et al., 2018; LAVINSCKY et al., 2021). Em espécies alógamas, como a maioria das passifloras, quanto maior a viabilidade polínica, maior a variabilidade genética decorrente de recombinação meiótica, gerando diferentes combinações alélicas (SOUZA et al., 2002).

Para o híbrido F₁ HD25 e os híbridos triplos HD29 e HD30 foram observados baixa viabilidade polínica, com formação de grãos de pólen inviáveis. Em outros estudos envolvendo híbridos F₁, também foram observados baixo percentuais de GP viáveis (ABREU, 2009; SOARES-SCOTT et al., 2003; SAMPAIO et al., 2013; LAVINSCKY et al., 2021) e que erros na meiose tem interferência direta na viabilidade. Nos híbridos triplos, foi observado o maior percentual de GP inviáveis T3 (pulverizado), não muito comum em espécies de *Passiflora*, mas foram observados em *P. palmeri* var. *sublanceolata* (ABREU, 2009) e em alguns híbridos interespecíficos F₁ de *Passiflora* (LAVINSCKY et al., 2020). O GP T3 pode ter sido originado durante a pós-meiose, sugerindo a ação de fatores genéticos. O teste utilizando diacetato de fluoresceína confirmou os resultados obtidos com o teste de solução de Alexander, com viabilidade polínica alta para os genitores *P. tholozanii* e *P. mucronata* e baixos percentuais de GP viáveis para o híbrido F₁ HD25 e os híbridos triplos HD29 e HD30. Os estudos de viabilidade polínica que indicaram completa ou parcial esterilidade observada em híbridos F₁ ocorreram devido às irregularidades meióticas (STOREY, 1950; BARBOSA, VIEIRA, 1997; ABREU, 2009; LAVINSCKY et al., 2020).

4.5 CONCLUSÃO

As análises meióticas em espécies e híbridos de *Passiflora* fornecem informações relevantes quanto ao comportamento cromossômico, fertilidade da planta e quais as implicações da hibridação no genoma dos híbridos. O grau de similaridade genética entre as espécies genitoras foi comprovado pela ocorrência de pareamento cromossômico entre homeólogos e formação de quiasmas observados nos híbridos triplos HD29 e HD30. A hibridação interespecífica envolvendo três genomas afetou diretamente o comportamento meiótico dos híbridos triplos, com muitos cromossomos univalentes e irregularidades durante todas as fases da meiose. Essas irregularidades estão relacionadas com a formação de produtos pós-meióticos anormais e índice meiótico mais baixo que dos genitores e, conseqüentemente, com a formação de grãos de pólen inviáveis. O índice meiótico, acima de 90%, e o alto percentual de grãos de pólen viáveis observados nas espécies genitoras, indica estabilidade meiótica e possibilita a utilização dessas duas espécies como genitores masculinos em programas de melhoramento. Os híbridos triplos podem ser considerados citologicamente estáveis por apresentarem formação de bivalentes, quiasmas e células com regularidades na meiose, e apesar do baixo percentual de grãos de pólen viáveis, causando esterilidade parcial, eles são úteis para o cultivo e para seleção de cultivares ornamentais.

4.6. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) pela infraestrutura do Laboratório de Melhoramento de Plantas (LAMEP), onde foi realizada toda a parte de citogenética clássica e molecular e da Casa de Vegetação onde estão as espécies silvestres e os híbridos de *Passiflora*.

4.7 REFERÊNCIAS

- ABREU, P.P. **Análise em *Passiflora palmeri*, *Passiflora foetida* e híbridos F₁ ornamentais: relação citogenética e caracterização fisiológica.** 2008, 188 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – 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. **Stain Technology**, v. 44, p. 117 - 122, 1969.

BARBOSA, L. V.; VIEIRA M. L. C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystina* Mikan. **Euphytica**, v. 98, 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, p. 1–13, 2018.

BRITTO, F.F.; DIAS, D.L.O.; AMARAL, C.L.F.; MAFFEI, E.M.D.; LIBARINO, V.D. Determinação do sistema reprodutivo de parentais para produção de híbridos entre *P. cincinnata* Mast. e *P. quadrangularis* Lima. **Cultura agrônômica**, v. 27, n. 4, p. 407 – 423, 2018.

CARINI, M. Dentro do apê, cresce um jardim. **Casa Cláudia**, v. 629, n. 1, p. 122 - 126, 2014.

CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; SOUZA, M.M.; BELO, G.O.; SANTOS, S.F.; FREITAS, J.C.O. Hybridization among wild passionflower species. **Rev. Bras. Bot.**, v. 34, p. 237 - 240, 2011.

CONSOLARO, M.E.; PAGLIARINI, M.S.; CHAVES, L.J. Meiotic behavior, pollen fertility and seed production in Brazilian populations of *Centella asiatica* (L.) Urban (Umbelliferae). **Cytologia**, v. 61, p. 375 – 381, 1996.

CORRÊA, M.G.S.; VIÉGAS, J.; SILVA, J.B.; ÁVILA, P.F.V.; BUSATO, G.R.; LEMES, J.S. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. **Acta bot. Bras.**, v. 19, n. 2, p. 295 - 303, 2005.

DARLINGTON, C.D. **Evolution of genetic systems**. London: Oliver and Boyd, 1958.

DURANTE, S. Flores em escalada. **Casa e Jardim**, n. 706, p. 160 - 168, 2013.

ELLIOTT, F.C. **Plant breeding and cytogenetics**. New York: Mcgraw-Hill Book Company, INC., 1958.

FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Número cromossômico, análise meiótica e estimativa da viabilidade polínica em populações de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 110 – 116, 2009.

GROSSI, J.A.; GODOY, S.M.; MACEDO, C.R.; PAULA, G.B.N.; ROMAGNOLO, M.B.; RISSO-PASCOTTO, C. Comportamento meiótico durante a microsporogênese

em espécies da família Meliaceae. **Arq. Ciência Vet. Zool.**, v. 14, n. 1, p. 51 – 56, 2011.

GUERRA, M.S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1988.

HESLOP-HARRISON, J.; HESLOP-HARRISON, Y. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. **Stain Technology**, v. 45, p. 115 - 120, 1970.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill, 523 p., 1940.

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

KARSBURG, I. V.; BATTISTIN, A. Meiose e número cromossômico de cinco espécies da família Urticaceae do Rio Grande do sul. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 4, n. 1, p. 47 - 60, 2006.

KIIHL, P.R.P.; PEREIRA, A.R.A.; GODOY, S.M.; STENZEL, N.M.C.; RISSO-PASCOTTO, C. Chromosome stickiness during meiotic behavior analysis of *Passiflora serrato-diditata* L. (Passifloraceae). **Ciência Rural**, v. 41, p. 1018 - 1023, 2011.

KRYCHI, K.C.; TESDESCO, M.; RODRIGUES, V.; WEILER, R.L.; BRUNES, A.P.; DALL'AGNOL, M.; SIMIONI, C. Reproductive analyses of intraspecific *Paspalum notatum* Flüggé hybrids. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, 2020.

KRYCKI, K.C.; SIMIONI, C.; DALL'AGNOL, M. Cytoembryological evaluation, meiotic behavior and pollen viability of *Paspalum notatum* tetraploidized plants. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, p. 282-288, 2016.

LEE, Y.; CHANG, F.C.; CHUNG, M.C. Chromosome pairing affinities in interspecific hybrids reflect phylogenetic distances among lady's slipper orchids (*Paphiopedilum*). **Annals of Botany**, v. 108, p. 113 - 121, 2011.

LEVIN, D.A. **The role of chromosomal change in plant evolution**. Oxford, University Press, p. 23 – 44, 2002.

LOPES, E.F. **Avaliação do comportamento meiótico de milho-pipoca (*Zea mays* L.) durante o processo de endogamia**. 2006. 30 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

LORSON, M.A.; HORVITZ, R.H.; HEUVEL, S.V. LIN – 5 is a novel component of the spindle apparatus required for chromosome segregation and cleavage plane specification in *Caenorhabditis elegans*. **The J. Cell Biol.**, v. 48, n. 1, p. 73 – 86, 2000.

LOVE, R.M. Varietal differences in meiotic chromosomes behavior of Brazilian wheats. **Agronomy Journal**, v. 43, p. 72 - 76, 1951.

MARTINS, K.C.; PEREIRA, T.N.S.; SOUZA, S.A.M.; COSTA, F.R. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annum* e *Capsicum baccatum*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1746 – 1751, 2010.

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

MELO, C.A.F. **Caracterização morfológica, citogenética e confirmação molecular de híbridos interespecíficos retrocruzados de *Passiflora* L.** 2014. 184 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 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 subanceolata* (Killip) MacDougal (Passifloraceae). **Euphytica**, v. 213, p. 161, 2017.

MORENO, E.C.; TIAGO, A.V.; ROSSI, F.S.; ROSSI, A.A.B. Biologia floral, morfometria e viabilidade polínica do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Enciclopédia Biosfera**, Centro científico Conhecer, n. 11, n. 21, p. 2094 – 2104, 2015.

OLIVEIRA, J.S.; FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V. Diversidade genética inter e inraespecífica de acessos do banco de germoplasma de *Passiflora* 'Flor da Paixão'. In: FALEIRO, F.G.; OLIVEIRA, J.S.; WALTER, B.M.T.; JUNQUEIRA, N.T.V. (Eds.). **Banco de germoplasma de *Passiflora* L. 'Flor da Paixão': caracterização fenotípica, diversidade genética, fotodocumentação e herborização.** Brasília, DF: 2020.

OHRI, D. Genome size variation and plant systematics. **Annals of Botany**, v. 82, p. 75 - 83, 1998.

ORTIZ, A.M.; SEIJO, J.G.; FERNANDEZ, A.; LAVIA, G.I. Meiotic behavior and pollen viability *Arachis glabrata* and *A. nitida* species (Section *Rhizomatosae*, Leguminosae): implications concerning their polyploid nature and seed set production. **Plant Syst Evol.**, v. 292, p. 73 - 83, 2011.

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

- SAMPAIO, S.R.; SOARES, T.L.; OLIVEIRA, E.D.; JESUS, O.N. **Hibridação interespecífica e viabilidade polínica em Passiflora com potencial ornamental**. 7ª Jornada Científica, Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2013.
- SANTOS, E.A.; SOUZA, M.M.; ABREU, P.P.; CONCEIÇÃO, L.D.C.S.; ARAÚJO, I.S.; VIANA, P.A.; ALMEIDA, A-A.F.; FREITAS, J.C.O. Confirmation and Characterization of interspecific hybrids of *Passiflora* L. (Passifloraceae) for ornamental use. **Euphytica**, v. 184, p. 389 – 399, 2012.
- SENDA, T.; HIRAOKA, Y.; TOMINAGA, T. Cytological affinities and interfertilities between *Lolium temulentum* and *L. persicum* (Poaceae) accessions. **Hereditas**, v. 142, p. 45 -50, 2005.
- SHAMINA, N.V. A catalogue of abnormalities in the division spindles of higher plants. **Cell Biology International**, v. 29, p. 384 – 391, 2005.
- SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 213 - 240, 2005.
- SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.; RECCO-PIMENTEL, S. Meiotic behavior and pollen fertility in sexual and somatic hybrids of *Passiflora* species. **Caryologia**, v.56, p. 129 - 138, 2003.
- SOUZA, M.M.; PEREIRA, T. N. S. Meiotic behavior in wild and domesticated species of *Passiflora*. **Revista Brasil. Bot.** v. 34, p. 63 – 72, 2011.
- SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MATINS, 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). **Ciênc. Agrotec.**, v. 26, n. 6, p. 1209 – 1217, 2002.
- SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; SUDRÉ, C.P.; RODRIGUES, R. Meiotic irregularities in *Capsicum* L. species. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 12, p. 138 – 144, 2012.
- 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**, v. 56, p. 161 - 169, 2003.
- SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; VIANA, A.P.; SILVA, L.C. Pollen viability and fertility in wild and cultivated *Passiflora* species (Passifloraceae). **Beiträge zur Biologie der Pflanzen**, v. 73, p. 359 – 376, 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, p. 247 – 258, 2008.

SOUZA, V.O.; SOUZA, M.M.; SILVA, G.S.; MELO, C.A.F.; FREITAS, J.C.O.; SOUZA, A.C. Morphological and cytogenetic characterization of new ornamental *Passiflora* hybrids (*P.* ‘Vivis’ and *P.* ‘Jhovi’). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, p. 1 - 8, 2020.

STORY, W.B. Chromosome numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. **Pacific Science**, v. 4, 1950.

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.

TOLOMEOTTI, K.R.; FELIPPI, M.; DONAZZOLO, J. Cytogenetic characterization of *Tropaeolum pentaphyllum* Lam. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 18, p. 65 – 71, 2018.

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

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

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

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação da diversidade genética de espécies ameaçadas de extinção implica diretamente na manutenção da variabilidade intra e interespecífica de populações, contribuindo para maiores sucessos em programas de conservação, em especial a conservação *ex-situ*. A análise cariotípica permitiu a identificação de marcadores cromossômicos importantes para a delimitação citogenética entre as espécies silvestres *P. racemosa* e *P. malacophylla*, estabelecendo o cariótipo e fornecendo informações sobre a diversidade interespecífica. As espécies apresentam estabilidade em termos citológicos relacionada ao número cromossômico, morfologia e marcadores citogenéticos como DNAr45S, 5S e telomérico, corroborando com a posição taxonômica atual de ambas as espécies analisadas. O uso da técnica de Hibridação fluorescente *in situ* (FISH) permitiu visualizar que os sítios de hibridação de sondas para DNAr 45S, são regiões restritas a satélites e constrições secundárias, fato comumente observado no gênero *Passiflora* e geralmente colocados com os blocos de CMA₃⁺/DAPI. O comportamento meiótico de ambas as espécies foi estável, com formação de bivalentes, regularidade na meiose e produtos pós-meióticos normais, tendo como resultado, alta viabilidade polínica.

Os híbridos triplos de *Passiflora* são considerados estáveis citologicamente e apesar da hibridação ter afetado diretamente o comportamento meiótico e a viabilidade polínica, eles podem ser utilizados para o cultivo e como planta ornamental. A análise meiótica mostrou pareamento entre cromossomos homeólogos e formação de quiasmas, indicando que as espécies genitoras possuem algum grau de proximidade e que houve recombinação genética, gerando variabilidade.

6. REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

- ABREU, P.P. **Análise em *Passiflora palmeri*, *Passiflora foetida* e híbridos F₁ ornamentais: relação citogenética e caracterização fisiológica**. 188 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – 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. Passionflower 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.
- AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, Consultoria & Agroinformativos, p. 345-350, 2011.
- ALLARD, R. W. **Princípios do melhoramento genético das plantas**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Edgard Blücher Ltda, 381-485 p. 1960.
- BARBOSA, L. V.; VIEIRA M. L. C. Meiotic behavior of passion fruit somatic hybrids, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener + *P. amethystina* Mikan. **Euphytica**, v. 98, p. 121-127, 1997.
- BASS, H.W.; BORDOLI, S.J.; FOSS, E.M. The desynaptic (dy) and desynaptic1 (dysl) mutations in maize (*Zea mays* L.) cause distinct telomere-misplacement phenotypes during meiotic prophase. **Journal of Experimental Botany**, Tallahassee, v. 54, n. 380, p. 39-46, 2003.
- BELO, G. O. **Análise morfológica e genética em progênie híbrida F1 do cruzamento *Passiflora gardneri* MAST x *Passiflora gibertii* N.E. BROW**. 2010. 112 f. Dissertação (Mestrado em produção vegetal) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2010.
- 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. 1–13, 2018.
- BENEVIDES, C. R.; GAGLIANONE, M. C.; HOFFMANN, M. Visitantes florais do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Passifloraceae) em áreas de cultivo com diferentes proximidades a fragmentos florestais na 117 Região Norte Fluminense, RJ. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 3, p. 415–421, 2009.
- BERNACCI, L. C., MELETTI, L. M. M., SOARES-SCOTT, M. D., PASSOS, I. R. S., JUNQUEIRA, N. T. V. Espécies de maracujá: caracterização e conservação da biodiversidade. In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V., BRAGA, M. F. (Eds), **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p.559-586, 2005.

BERNACCI, L.C.; SOUZA, M. M. *Passiflora cacao* (Passifloraceae), a New Species from Southern Bahia, Brazil. **A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 22, n. 1, p. 1-7, 2012.

BERNACCI, L.C.; CERVI, A.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; NUNES, T. S.; IMIG, D. C.; MEZZONATO, A. C. Passifloraceae In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB128567>. 2013.

BOATENG, K.A.; YANG, X.; DONG, F.; OWEN, H.A.; MAKAROFF, C.A. **SWI1 is required for meiotic chromosome remodeling events**. *Molecular Plant*, v. 1, n. 4, p. 620 - 633, 2008.

BRUCKNER, C. H.; OTONI, W. C. Hibridação em maracujá. In: BORÉM, A. (Ed). **Hibridação artificial de plantas**. UFV – Viçosa, p. 379 - 399, 1999.

BRUCKNER, C.H.; SUASSUNA, T.M.F.; RÊGO, M.M.; NUNES, E.S. Auto-incompatibilidade do maracujá – implicações no melhoramento genético. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 317 - 338, 2005.

CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; FALEIRO, F.G.; JESUS, O.N.; SANTOS, E.S.L.; SOUZA, A.P. The Genetic Diversity, Conservation, and Use of Passion Fruit (*Passiflora* spp.). in: AHUJA, M.R.; JAIN, S.M. (Eds.) **Genetic Diversity and Erosion in Plants**. Suíça, p. 215 - 231, 2016.

CERVI A. C. **Passifloraceae do Brasil. Estudo do Gênero *Passiflora* L. subgênero *Passiflora***. Fontqueria, v. 45, 95p, 1997.

CERVI, A. C.; SANTOS, E. P. Flórua do Morro dos Perdidos, Serra de Araçatuba, estado do Paraná, Brasil: Passifloraceae. **Estudos de Biologia**, n. 46, p. 25-47, 2000.

CORRÊA, M.G.S.; VIÉGAS, J.; SILVA, J.B.; ÁVILA, P.F.V.; BUSATO, G.R.; LEMES, J.S. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. **Acta bot. Bras.**, v. 19, n. 2, p. 295 - 303, 2005.

CORLETT, R.T. Plant diversity in a changing world: Status, trends, and conservation needs. **Plant diversity**, v. 38, p. 10 - 16, 2016.

CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S.; SOUZA, M.M.; BELO, G.O.; SANTOS, S.F.; FREITAS, J.C.O. Hybridization among wild passionflower species. **Rev. Bras. Bot.**, v. 34, p. 237 - 240, 2011.

CUCO, S.M.; VIEIRA, M.L.C.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Localização de sítios de rDNA 45S em híbridos somáticos e espécies parentais de *Passiflora*. Resumos do Congresso Nacional de Genética, 47, Águas de Lindóia, SP: Sociedade Brasileira de Genética, CD Rom, 2001.

- ESCOBAR, L. K. Passifloraceae. In : PINTO, P.; LOZANO, G. (eds). **Flora de Colombia**. Universidade Nacional da Colombia, Bogotá. v. 10, p. 1-138, 1988.
- FACHINETTO, J.M.; TEDESCO, S.B. Número cromossômico, análise meiótica e estimativa da viabilidade polínica em populações de *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 110 – 116, 2009.
- FERREIRA, F. R. Germoplasma de *Passiflora* no Brasil. In: SÃO JOSÉ, A. R. (Ed.) **Maracujá: produção e mercado**. UESB, Vitória da Conquista, BA. p. 24- 26, 1994.
- FERREIRA, F. R. Recursos genéticos de *Passiflora* no Brasil. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 41-78, 2005.
- FERREIRA, F. R., RANGEL, P. H. N. Emprego de espécies silvestres no melhoramento genético vegetal: experiência em outras espécies com análise de retrocruzamento avançado de QTLs (AB-QTL) In: FALEIRO, F. G., JUNQUEIRA, N. T. V., BRAGA, M. F. (ed.), **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.109-140, 2005.
- GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1988, 142 p.
- GUERRA, M.; SOUSA, M. J. **Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. FUPEC, Ribeirão Preto, 131p, 2002.
- 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, p. 138-150, 2006.
- HERBÁRIO INSTITUTO AGRONÔMICO - IAC. Disponível em: <<http://herbario.iac.sp.gov.br>>. Acesso em: 14 novembro 2021.
- IBGE – Produção Agrícola Municipal. Produção Brasileira de Maracujá em 2020. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Acessado em 02 de março de 2022 em: http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b1_maracuja.pdf
- INDEX TO PLANT CHROMOSOME NUMBERS (IPCN). Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/40002275?projectid=9>>. Acesso em: 31 jan. 2014.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. **Plant Systematics: A Phylogenetic Approach**. **Sinauer Associates, inc. Sunderland, Massachusetts**, 464 p. 1999.
- JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNACCI, L. C. Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de

resistência a doenças. In: FALEIRO F. G., JUNQUEIRA, N. T. V., BRAGA M. F. (Eds.), **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 81-108, 2005.

JUNQUEIRA, N. T. V., LAGE, D. A. C., BRAGA, M. D., PEIXOTO, J. R., BORGES, T. A., ANDRADE, S. R. M. Reação a doenças e produtividade de um clone de maracujazeiro-azedo propagado por estaquia e enxertia em estacas herbáceas de *passiflora* silvestre. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 97-100, 2006.

JUNQUEIRA, K. P.; FALEIRO, F. G.; RAMOS, J. D.; BELLON, G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Variabilidade genética de acessos de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 571-575, 2007.

KIIHL, P.R.P.; PEREIRA, A.R.A.; GODOY, S.M.; STENZEL, N.M.C.; RISSO-PASCOTTO, C. Chromosome stickiness during meiotic behavior analysis of *Passiflora serrato-diditata* L. (Passifloraceae). **Ciência Rural**, v. 41, p. 1018 - 1023, 2011.

KILLIP, E. P. The American species of Passifloraceae. Field Museum of Natural History. **Botanical series**, v. 19, p. 1-613, 1938.

KUSWANTO, L.; CHUSNA, N.A.; PURNOMO, E.; KRISANTINI; AHMAD, M.U. Identification and documentation of wild plant species with ornamental potentials at Mount Prau, Central Java, Indonesia. **Ornamental Horticulture**, v. 28, p. 110 - 119, 2022.

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, 2017.

LAVINSCKY, M.P.; SOUZA, M.M.; SILVA, G.S.; SOUZA, V.O.; MELO, C.A.F. Meiotic analyses of *Passiflora* L. parents and interspecific F1 hybrids (HD15 progeny). **Euphytica**, v. 217, n. 68, 2021.

LIMA, D. M.; GOLOMBIESKI, E. R.; AYUB, R. A. Aplicação de técnicas de biotecnologia à cultura e melhoramento do maracujazeiro. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 359-363, 2000.

LOSS, A. C. C.; LEITE, Y. L. R.; LOURO, L. D.; BATITUCCI, M. D. P. Diversidade genética de populações de maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis) no estado do Espírito Santo, Brasil. **Natureza on line**, v. 4, n. 2, p. 55-61. 2006.

MACDOUGAL, J.M. Revision on *Passiflora*, Subgenus *Decaloba*, Setion Pseudodysosmia (pasifloraceae). **Systematic Botany Monographs**, v. 41, p. 1-146, 1994.

MARTINS, K.C.; PEREIRA, T.N.S.; SOUZA, S.A.M.; COSTA, F.R. Meiose e viabilidade polínica em acessos de *Capsicum annum* e *Capsicum baccatum*. **Ciência Rural**, v. 40, n. 8, p. 1746 – 1751, 2010.

MAYEDA, L. Y. **Estudo citogenético em dez taxons do gênero *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. 1997. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 1997.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 55-78, 2005.

MELETTI, L.M.M.; BRÜCKNER, C.H. Melhoramento genético. In: BRÜCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. (Eds.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 345 - 385, 2001.

MELO, C.A.F. **Caracterização morfológica, citogenética e confirmação molecular de híbridos interespecíficos retrocruzados de *Passiflora* L.** 2014. 184 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 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*. *Genetics and Molecular Research*, 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**, v. 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 subanceolata* (Killip) MacDougal (Passifloraceae). **Euphytica**, v. 213, p. 161, 2017.

MELO, C.A.F.; SOUZA, M.M.; VIANA, A.P.; SANTOS, E.A.; SOUZA, V.O.; CÔRREA, 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, N. F.; CERVI, A. C.; GUERRA, M. Karyology and cytotaxonomy of the genus *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 226, 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, p. 309-316, 2003.

MUSCHNER, V. C.; LORENZ, A. P.; CERVI, A. C.; BONATTO, S. L.; SOUZA-CHIES, T. T.; SALZANO, F. M.; FREITAS, L. B. A first molecular phylogenetic analysis of *Passiflora* (passifloraceae) **Annals of Botani**, v. 90, p. 1229-1238, 2003.

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

OHRI, D. Genome size variation and plant systematics. **Annals of Botany**, v. 82, p. 75 - 83, 1998.

OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C. Aspectos sobre o melhoramento do maracujazeiro amarelo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A CULTURA DO MARACUJAZEIRO, **Anais**. Jaboticabal: FUNEP, p. 291 - 310, 1998.

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**, 5: 863–865, 2005.

PAGLIARINI, M.S. Citogenética aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos Genéticos e Melhoramento – Plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p. 871 - 910, 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.

PEREIRA, M.G.; PEREIRA, T.N.S.; VIANA, A.P. Marcadores moleculares aplicados ao melhoramento genético do maracujazeiro In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.) **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, p. 277 - 292, 2005.

SAKALEM, M.; NEGRI, G.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from five species of the *Passiflora* genus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p.1219–1232, 2012.

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

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

SCHWARZACHER, T. Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent in situ hybridization data in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, p. 11 – 23, 2003.

- SHARROCK, S.; JACKSON, P.W. Plant Conservation and the Sustainable Development Goals: A Policy Paper Prepared for the Global Partnership for Plant Conservation. **BioOne Research Evolved**, v. 102, n.2. p. 290 - 302, 2017.
- SILVA, G.S.; SOUZA, M.M.; 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, p. 26, 2018.
- SIQUEIRA, W.J.; FONSECA, M.I.S.; SONDHAL, M.R. Regeneração de plantas híbridas entre *Lycopersicon esculentum* e *L. peruvianum* a partir de calor com dois anos de cultura in vitro. **Bragantia**, v. 47, n. 1, p. 1 - 8, 1988.
- SILVA, M.A.A.; SOUZA, M.M.; SILVA, G.S.; MELO, C.A.F.; CORRÊA, R.X.; ARAÚJO, I.S.; CONCEIÇÃO, L.D.H.C.S. Analysis of transferability of microsatellite primers (SSR) in wild *Passiflora* species and intraspecific genetic diversity in *Passiflora alata*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 5908-5918, 2014.
- SNOW, N.; MACDOUGAL, J. M. New chromosome reports in *Passiflora* (Passifloraceae). **Systematic Botany**, 18, 261-273, 1993.
- SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.; RECCO-PIMENTEL, S. Meiotic behavior and pollen fertility in sexual and somatic hybrids of *Passiflora* species. **Caryologia**, v.56, p. 129 - 138, 2003.
- SOUZA, M.M., PALOMINO, G., PEREIRA, T.N.S., PEREIRA, M.G., VIANA, A.P. Flow cytometric analysis of genome length variation in some *Passiflora* species. **Hereditas**, 141, 31–38, 2004.
- 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 Agrotec.**, v. 26, n. 6, p. 1209 – 1217, 2002.
- SOUZA, M.M.; PEREIRA, T. N. S. Meiotic behavior in wild and domesticated species of *Passiflora*. **Revista Brasil. Bot.** v. 34, p. 63 – 72, 2011.
- SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S.; VIVIANA, A. P.; SILVA L. C., SUDRÉ, C. P. Comportamento meiótico em espécies de *Passiflora* Associação cromossômica, frequência de quiasmas e segregação irregular. Simpósio brasileiro sobre a cultura do Maracujazeiro. Goytacazes, Rio de Janeiro. 2003.
- 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. p. 247-258, 2008.
- SOUZA, V.O.; SOUZA, M.M.; SILVA, G.S.; MELO, C.A.F.; FREITAS, J.C.O.; SOUZA, A.C. Morphological and cytogenetic characterization of new ornamental *Passiflora* hybrids (*P.* ‘*Vivis*’ and *P.* ‘*Jhovi*’). **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, p. 1 - 8, 2020.

STEBBINS, G. L. **Chromosomal evolution in higher plant**. Edward Arnold, London, p. 216, 1971.

STOREY, W.B. Chromosome numbers of some species of *Passiflora* occurring in Hawaii. **Pacific**. 1950.

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.

VANDERPLANK, J. **Passion Flowers**, 2. ed. Cambridge: The MIT Press, 224p. 2000.

VENCOVSKY, R. Herança quantitativa. In: PATERNIANI, E. (Ed.) **Melhoramento e produção de milho**. Piracicaba: Fundação Cargill, 1987. p. 137-214. 1987.

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

VIEIRA, M. L. C.; BARBOSA, L. V.; MAYEDA, L. Y. Citogenética dos Maracujazeiros . In: Adeline de Almeida Lima; Mario Augusto Pinto da Cunha. (Eds). **Maracujá: produção e qualidade na Passicultura**. 1ªed.Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, p. 47-65, 2004.