

MARTA DIAS SOARES-SCOTT

**Caracterização Citogenética de Algumas Espécies e
Híbridos Interespecíficos de *Passiflora***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese submetida pelo(a) candidato(a)
Marta Dias Soares-Scott
e aprovada pela Comissão Julgadora
31/08/98 Sndecofimentel

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia, da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas, área de
Biologia Celular.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel

3823417
So11c

35584/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Soares-Scott, Marta Dias

So11c Caracterização citogenética de algumas espécies e híbridos
interespecíficos de *PASSIFLORA* /Marta Dias Soares-Scott .--
Campinas, SP: [s.n.], 1998.
89f.: ilus.

Orientador: Shirlei Maria Recco-Pimentel
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

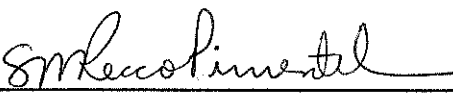
1.Citogenética. 2.Maracujá. 3.Poliformismos. I.Recco-Pimentel,
Shirlei Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 31 de agosto de 1998

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa.Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel


Assinatura

Profa.Dra. Cecília Alzira Ferreira Pinto-Maglio

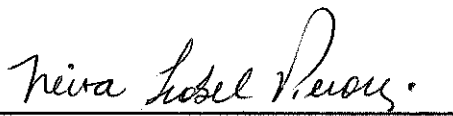

Assinatura

Profa.Dra. Eliana Forni Martins
Eliana Regina Forni Martins


Assinatura

SUPLENTE:

Profa.Dra. Neiva Izabel Pierozzi


Assinatura

**Dedico este trabalho aos meus pais,
João e Antonietta, aos meus filhos,
Beatriz e Felipe, e ao Luiz.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel pela orientação, pelas sugestões , por sua dedicação e interesse constante e principalmente pela amizade.

Às Profas. Dras. Cecília A. Ferreira Pinto-Maglio e Neiva Izabel Pierozzi do Instituto Agronômico de Campinas e à Dra. Eliana Forni-Martins pelas análises prévias deste trabalho, pelas revisão criteriosa do texto e pelas importantes sugestões que ajudaram a melhorar o trabalho.

Aos técnicos Onivaldo Camargo , Valdemir Alvarez e José Luiz Hernandez do Instituto Agronômico de Campinas pelo auxílio , atenção e colaboração durante a realização deste trabalho.

À D.Antonia e D.Eliete, auxiliares técnicos do Instituto Agronômico de Campinas pelo grande auxílio na manutenção do material deste trabalho e principalmente pela amizade.

À colega Laura Meletti do Instituto Agronômico de Campinas pelo auxílio e amizade.

À Dra. Dulcinéia E. Foltran pela revisão do texto em inglês.

Ao Instituto Agronômico de Campinas pelo afastamento concedido para este treinamento e pela oportunidade de desenvolver o trabalho no Instituto.

Aos colegas do Departamento de Biologia Celular, Marco, Márcio, Sérgio, Jairo, Luis Fernando pelo companheirismo.

Aos docentes do Departamento de Biologia Celular que contribuíram para a minha formação.

À Lilian, Sidiney e Cidinha pela atenção, eficiência e simpatia.

Aos amigos Luciana, Klélia, Maurício, Odair, Fernando, Josiane, Bel, Cristina, Márcio, Marco Tiné, Arnaldo, Selma , Guido pela cumplicidade e amizade .

ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
I. Introdução.....	1
1. Características gerais da família Passifloraceae do gênero <i>Passiflora</i>	1
2. Reprodução.....	4
3. Citogenética	8
3.1. Em <i>Passiflora</i>	9
4. Melhoramento genético em <i>Passiflora</i>	12
5. Objetivos.....	16
II. Material e Métodos.....	17
1. As espécies em estudo.....	17
2. Análise citogenética.....	18
3. Viabilidade de pólen.....	20
III. Resultados.....	21
1. Análise citogenética.....	21
1.2 Cariótipo de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i>	22
1.3 Cariótipo de <i>P. setacea</i>	22
1.4 Cariótipo de <i>P. incarnata</i>	23
1.5 Cariótipo de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> X <i>P. setacea</i>	23
1.6 Cariótipo de <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> + <i>P. incarnata</i>	24
1.7 Comportamento meiótico nas espécies e híbridos.....	25
2. Análise de viabilidade de pólen.....	28
3. Aspectos vegetativos.....	29

IV. Discussão.....	65
1. Análise citogenética.....	65
2. Análise da meiose e da viabilidade do pólen.....	70
V. Conclusões.....	75
VI. Apêndice.....	76
VII. Referências Bibliográficas.....	80

RESUMO

A hibridação interespecífica tem sido a melhor alternativa na busca de resistência a doenças, em programas de melhoramento genético de maracujá, principalmente devido a susceptibilidade a doenças da espécie comercial mais cultivada *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*.

Com o objetivo de contribuir com informações básicas para programas de melhoramento neste trabalho, foi feita a caracterização cromossômica e o estudo do comportamento meiótico de três espécies de maracujá, *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. setacea* e *P. incarnata* e de dois híbridos interespecíficos *P. edulis* f. *flavicarpa* X *P. setacea* (híbrido sexual) e *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata* (híbrido somático). O cariótipo das espécies progenitoras e do híbrido sexual apresentam $2n = 18$ cromossomos. A ploidia de $2n=36$ no híbrido somático confirma citologicamente a sua origem por fusão de protoplastos. Os cariótipos das três espécies mostram semelhanças morfológicas entre si, apresentando cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Estes últimos sempre apresentam constrições secundárias. Todas as espécies e híbridos estudados mostram um d par de cromossomos maior, o número 4, com uma constrição secundária na porção final do braço longo. A espécie *P. setacea* e seu híbrido *P. edulis* f. *flavicarpa* X *P. setacea* mostram constrições secundárias em três pares de cromossomos e o híbrido somático em quatro pares.

P. incarnata é a espécie que apresenta maior comprimento absoluto e o híbrido sexual é o que mostra comprimento cariotípico total maior do que todas as espécies analisadas. O híbrido somático apresenta o dobro do comprimento total dos cromossomos em relação às outras espécies e em relação ao híbrido sexual.

A análise meiótica em ambos os híbridos indica a presença de anormalidades na microsporogênese. Há maior homologia entre as espécies *P. edulis* f. *flavicarpa* e *P. setacea* sugerida pelo número de bivalentes mostrado no híbrido entre estas espécies. A presença de multivalentes em ambos os híbridos sugere a ocorrência de recombinação gênica. No híbrido somático foi observada a formação de micronúcleos na segunda divisão da meiose causando um aumento do número de micrósporos na fase de tétrade. Os grãos de pólen mostraram variações no diâmetro. Ambos os híbridos mostraram diminuição na viabilidade polínica.

As alterações meióticas observadas nos híbridos devem ser responsáveis pela diminuição da viabilidade polínica.

ABSTRACT

In passion fruit breeding programs interspecific hybridization has been the best alternative in searching for diseases resistance in the *Passiflora edulis f. flavicarpa*, the most cultivated commercial species.

Studies were carried out on chromosomic characterization and meiotic behavior. The present work aimed to contribute with basic cytogenetic informations to breeding programs in three species of passion fruit, *P. edulis f. flavicarpa*, *P. setacea* and *P. incarnata* and in two interspecific hybrids: *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* (sexual hybrid) and *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata* (somatic hybrid). The karyotypes of the parental species and the sexual hybrid showed $2n = 18$ chromosomes. The somatic hybrid present $2n = 36$, confirming the protoplast fusion.

The species karyotypes showed similar morphology, with metacentric and submetacentric chromosomes. The last ones always presenting secondary constriction . All the studied species and hybrids showed a larger chromosome, number 4 pair, with a secondary constriction in the end of the long arm. The *P. setacea* species and the hybrid *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* showed secondary constrictions in three pairs of chromosomes while the somatic hybrid had them in four pairs.

P. incarnata was the species with the largest average absolute length and the sexual hybrid had the largest karyotype total length when compared with the other species analyzed. The somatic hybrid had twice the karyotype total length when compared with the other species and with the sexual hybrid.

The meiotic analysis in both hybrids showed irregularities during the microsporogenesis. A greater homology represented by the number of bivalents, was observed in the hybrid between *P. edulis f. flavicarpa* and *P. setacea*. The presence of multivalents in the sexual and the somatic hybrids gives evidence of genetic recombination. Micronuclei of the somatic hybrid in the meiosis II was observed as a consequence, the number of microspores in tetrads phase was higher than four and pollen grains with varied sizes were observed.

The pollen viability was low in both hybrids, probably due to the meiotic irregularities.

I. INTRODUÇÃO:

1. Características gerais da família Passifloraceae e do gênero *Passiflora*:

A família Passifloraceae, pertence à ordem *Violales* (Takhajan, 1980; Cronquist, 1988), e apresenta os seguintes gêneros: *Adenia*, *Chlorophoranthus*, *Dilkea*, *Crossostemma*, *Echinothamus*, *Hollungia*, *Machadoa*, *Modecca*, *Paropsia*, *Passiflora*, *Smeathmannia*, *Tetraphathaea*, *Tryphostemma*, *Schlechterina*, *Mitostemma*, *Tetrastylis* e *Deidania* (Killip, 1938; Leitão Filho & Aranha, 1974), abrangendo mais de 530 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. Ocorrem nas Américas, Ásia, Oeste da Índia, Austrália, África, Filipinas, Ilhas do Pacífico Sul, Madagascar e Galápagos, sendo mais de 95% predominantes na América do Sul (Vanderplank, 1991).

Segundo Leitão Filho & Aranha (1974) e Vanderplank (1991), a família Passifloraceae é classificada na ordem Passiflorales.

Há divergências quanto ao número de gêneros da família, presentes no Brasil. Segundo Sacco (1980) e Cervi (1986) ocorrem quatro gêneros: *Passiflora* (em todo o país), *Dilkea* (Amazonas e Pará), *Mitostemma* (Mato Grosso, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul) e *Tetrastylis* (Bahia, Minas Gerais e Rio de Janeiro), mas segundo Leitão Filho & Aranha (1974) e Oliveira (1987), apenas os dois primeiros gêneros ocorrem no Brasil.

O gênero *Passiflora*, é o maior e o mais representativo da família, sendo formado por 430 espécies distribuídas em 23 subgêneros, segundo dados de Vanderplank (1991): *Plectostemma* (140 espécies), *Passiflora* (120 espécies), *Astropheia* (50 espécies), *Tacsonia* (35 espécies), *Dysosmioides* (10 espécies), *Murucuja* (4 espécies), *Psilanthus* (4 espécies), *Tacsoniopsis* (4 espécies), *Thyphostemmatoides* (2 espécies), *Chloropathanthus* (2 espécies) e as demais, *Astephia*, *Calopathanthus*, *Apodogyne*,

Deidamioides, *Adenosepala*, *Rathea*, *Polyanthea* e *Tetrapathaea* com uma única espécie.

Killip (1938) descreveu 354 espécies americanas sendo 101 destas citadas no Brasil. Hoehne (1946) apresentou mais de 150 e Oliveira et al. (1988) aumentaram este número para mais de 200 espécies.

A região Centro-Norte é considerada a maior área de distribuição geográfica do gênero, no Brasil.

O gênero *Passiflora* é caracterizado por trepadeiras herbáceas ou lenhosas, de grande porte, caules com base lenhosa e lignificada, podendo ser cilíndricos ou quadrangulares, dependendo da espécie. A partir do caule surgem as gavinhas, folhas, gemas vegetativas e reprodutivas e brácteas.

As folhas são alternadas, inteiras ou lobadas de margem inteira ou serrilhada, eventualmente com glândulas nectaríferas nos pecíolos, estípulas e brácteas, com forma, número e posição variáveis; as gavinhas nascem nas axilas das folhas, sofrem lignificação à medida que se desenvolvem e vão se enrolando em suportes, permitindo à planta maior sustentação; elas são ausentes em espécies lenhosas.

As flores são hermafroditas, solitárias ou aos pares, ou agrupadas em cachos, nascem nas axilas das folhas e são pedunculadas, sendo protegidas em sua base por brácteas foli-

áceas, geralmente em número de três e são diclamídeas (presença de cálice e corola). O cálice é pentâmero, formado por cinco sépalas; corola com cinco pétalas, de coloração branca, rosada, azulada, púrpura ou violácea, nascendo alternadamente com as sépalas. A corola mostra uma ou várias séries dispostas em círculos, formadas por finos filamentos, de coloração variada.

O androceu é formado por cinco estames, com filetes unidos na base em uma membrana tubular, e livres na parte superior. As anteras são biloculares, com deiscência longitudinal sendo dorsifixas, liberando pólen de diferentes cores como creme, amarelo e alaranjado.

O gineceu é constituído por ovário súpero, globoso, ovóide ou cilíndrico, monolocular e multiovalado, com muitos óvulos presos na parede, com três placentas parietais, estiletes em número de três com estigmas livres.

O fruto é classificado como sendo uma baga globosa, ovóide, com epicarpo às vezes lignificado e mesocarpo com espessura variando de 0,5 à 4,0 mm. O tamanho e formato vão variar de acordo com a espécie. A polpa é mucilagínosa envolvendo as sementes, estas

são ovais e compridas, numerosas, com testa endurecida de aspecto reticulado e arilo sacciforme ou membranoso (Sacco, 1980; Salomão & Andrade, 1987; Vanderplank, 1991; Silva & São José, 1994).

As flores de *Passiflora*, na maioria das espécies, apresentam heterostilia (produção de flores com comprimentos diferentes de estiletos e estames), autoincompatibilidade, protândria (aplica-se à flor em que os estames amadurecem e produzem pólen antes da maturação dos estigmas) que exigem polinização cruzada (Janzen, 1968; Semir & Brown, 1975; Ruggiero, 1987).

A polinização é realizada principalmente por insetos como as mamangavas do gênero *Xylocopa* nas espécies *P. alata*, *P. amethystina*, *P. miersii* (Koschnitzke, 1993) e *P. edulis* (Corbert & Wilmer, 1980; Sazima & Sazima, 1989), por abelhas do gênero *Ptiglissa* em *P. foetidae* (Janzen, 1968), por vespas em *P. suberosa* e mariposas em *P. capsularis* (Koschnitzke, 1993). Pode ser realizada também por beija-flores em *P. vitifolia* (Janzen, 1968; Snow, 1982) e *P. coccinea* (Benson et al., 1975), e por borboletas do gênero *Heliconius* em *P. kermesina* e *P. coccinea*. O primeiro relato de polinização por morcegos em *Passiflora* foi feito por Sazima & Sazima (1978).

Pereira et al. (1971) identificaram cerca de 70 espécies com frutos comestíveis. Existem também espécies utilizadas como plantas ornamentais e outras como plantas medicinais.

De acordo com Manica (1981) e Oliveira (1987), as principais espécies cultivadas são: *P. edulis* Sims. (maracujá roxo), *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. (maracujá amarelo), *P. alata* Ait. (maracujá guaçu), *P. laurifolia* (maracujá-loureiro), *P. maliformis* (maracujá maçã), *P. quadrangularis* (maracujá mamão), *P. caerulea* (maracujá mirim) e *P. vitifolia*.

2. Reprodução

A reprodução sexuada é um mecanismo capaz de aumentar a variabilidade genética, permitindo aos indivíduos uma melhor resposta a ambientes em transformação (Willson, 1983).

As plantas, de modo geral, mostram uma diversidade de sistemas reprodutivos, variando da autopolinização obrigatória associada à auto-compatibilidade, à polinização cruzada obrigatória associada à auto-incompatibilidade (De Nettancourt, 1977), o que possibilita variações na transição entre a autogamia e a alogamia.

Segundo Faegri & van der Pijl (1971), a reprodução sexuada em plantas possui três fases distintas que agem em conjunto, e formam a estratégia reprodutiva da planta: a. polinização, que ocorre com a transferência de pólen para o estigma com fertilização subsequente; b. dispersão da progênie após a fertilização; c. germinação da semente e estabelecimento da plântula.

A eficiência de cada fase vai limitar o processo reprodutivo e os indivíduos têm de alocar recursos em cada uma, buscando a otimização da reprodução como um todo (Lloyd, 1980a).

Dentro do sistema reprodutivo sexual, no caso de plantas com flores hermafroditas, haverá autopolinização se o pólen da flor aderir e germinar no estigma receptivo desta flor e inexistir mecanismo de incompatibilidade genética, ou seja autogamia. Por outro lado, se o estigma de uma flor receber o pólen de outra flor, ocorre a polinização cruzada e portanto alogamia.

Na maioria das plantas com flores, a polinização cruzada (alogamia) é o mecanismo que comumente ocorre impedindo os efeitos deletéreos da consanguinidade e promove heterozigosidade, variabilidade genética e fluxo gênico, promovendo um aumento na sobrevivência, perpetuação e adaptação das espécies (Lloyd, 1980b).

Considerando as flores hermafroditas, alguns mecanismos foram desenvolvidos para promover a alogamia, como incompatibilidade, heterostilia, dicogamia e hercogamia, possibilitando que as espécies hermafroditas alógamas se expandissem,

correspondendo à quase 72% do total das espécies existentes. A adaptação das flores a diferentes mecanismos de polinização como por insetos (entomofilia), vento (anemofilia) ou água (hidrofilia) também promovem a alogamia.

A auto-incompatibilidade, de acordo com Becerra & Lloyd (1992) é a inabilidade de uma planta, funcionalmente bissexual, de produzir zigotos após uma autopolinização. Este fenômeno muito comum entre as angiospermas foi observado em mais de 50% das espécies (De Nettancourt, 1977).

A incompatibilidade é um mecanismo importante que determina a alogamia, pois impede que as plantas produtoras de gametas masculinos e femininos funcionais produzam sementes quando auto-polinizadas. A incompatibilidade pode ser heteromórfica quando se baseia em diferenças morfológicas entre as estruturas florais, ou homomórfica quando essas diferenças estão ausentes (Lewis, 1954; De Nettancourt, 1977).

No caso de auto-incompatibilidade, a auto-fertilização é bloqueada por uma reação de rejeição entre o pólen e o estigma do mesmo indivíduo. A germinação ou penetração do tubo polínico é impedida por uma barreira fisiológica (Bateman, 1952). A inibição do crescimento do tubo polínico é devida a presença de um gene S, que determina as relações de compatibilidade-incompatibilidade e, muitas formas alélicas diferentes deste gene são possíveis em diferentes plantas da mesma espécie (De Nettancourt, 1977).

Na incompatibilidade homomórfica (não aparecem diferenças entre as estruturas florais), importante nas plantas cultivadas (Allard, 1971), duas situações estão presentes promovendo a ação de sistemas genéticos de auto-incompatibilidade.

A primeira é o sistema gametofítico, determinado pelo alelo S, de uma série de alelos múltiplos. Estes alelos estão presentes no grão de pólen e no estigma, determinando, geralmente, a inibição do crescimento do tubo polínico no estilete. Neste caso, a incompatibilidade é determinada pelo genótipo do grão de pólen que é haplóide.

A segunda é o sistema esporofítico, onde a incompatibilidade é semelhante à gametofítica, porém é determinada pelo genótipo diplóide do esporófito que produziu o grão de pólen, podendo haver relação de dominância entre diferentes alelos. A reação de incompatibilidade ocorre, geralmente, na superfície estigmática, resultando na inibição da

germinação do grão de pólen (Brewbaker, 1957). Segundo Bruckner (1994) o sistema esporofítico, ao contrário do gametofítico, pode apresentar diferenças em cruzamentos recíprocos e possuir homozigotos normais dentro do sistema.

Em virtude da similaridade entre os dois sistemas, esporofítico e gametofítico, as diferenças podem ser interpretadas em função do tempo de ação gênica. No sistema gametofítico, os fatores inibidores ou precursores são produzidos pelos alelos S, após a citocinese da primeira divisão, na meiose dos microsporócitos. No sistema esporofítico, esta ação gênica deve ocorrer antes da anáfase I. Deste modo, no sistema gametofítico, são produzidos dois pares de esporos diferentes na tétrade, enquanto no sistema esporofítico todos os esporos são fenotipicamente idênticos (Brewbaker, 1957; Bruckner, 1994).

A reação de auto-incompatibilidade pode ocorrer em diferentes níveis das estruturas florais, ou seja, no estigma, no estilete ou no ovário. No sistema gametofítico, a inibição ocorre geralmente no desenvolvimento do tubo polínico. Na incompatibilidade esporofítica, há inibição da germinação do grão de pólen, ou do crescimento inicial do tubo polínico.

Existe a presença ocasional de plantas auto-compatíveis em populações auto-incompatíveis, sendo explicada pela presença de alelos S que permitem autocompatibilidade no sistema esporofítico (Imrie & Knowles, 1971; Zuberi *et al.*, 1981), pela presença de alelos S de baixo nível de dominância (Ockendon, 1974) e pela presença de um simples gene que é expresso dependendo dos alelos da série S presentes (Lewis *et al.*, 1988; Zuberi & Lewis, 1988).

Este sistema de incompatibilidade procura impossibilitar a autofecundação e atuam promovendo a troca de genes entre as plantas (Bateman, 1952). A incompatibilidade é um sistema que favorece a alogamia em espécies hermafroditas.

Os sistemas em que prevalecem a autoincompatibilidade estão em maioria permitido a manutenção da variabilidade genética e garantindo um alto nível de heterozigosidade (Bawa, 1974; Heslop-Harrison, 1975; Frankel & Galun, 1977 ; Douglas & Cruden, 1994).

Embora a incompatibilidade em *Passiflora* tenha sido relatada por Munro em 1868 (De Nettancourt, 1977), até recentemente não existiam referências sobre o sistema

de incompatibilidade envolvido. Segundo Bruckner (1994), o sistema de auto-incompatibilidade ativo no maracujá é esporofítico, sendo possível realizar autofecundações apenas no estágio de botão .

Em *Passiflora* há diferenças no grau de incompatibilidade em cruzamentos recíprocos envolvendo o maracujá amarelo (*P. edulis f. flavicarpa*) os quais foram também verificadas por Akamine e Girolami (1959), Knight Jr. & Winters (1962) e Chang (1974) e Bruckner (1994). Akamine e Girolami (1959), estudando polinização e frutificação em cruzamentos recíprocos encontraram diferenças na frutificação dependendo do cruzamento. Chang (1974), obteve frutificação de 1,35% e 16,67% nos respectivos cruzamentos recíprocos. Knight Jr. & Winters (1962), obtiveram em autofecundações, alguns frutos com baixo peso e raras sementes.

Nas espécies cultivadas, o mecanismo de auto-incompatibilidade se torna menos frequente em consequência da pressão de seleção contrária causada pela domesticação. Em maracujá podemos perceber que apesar dos mecanismos de autoincompatibilidade estarem presentes, esses, muitas vezes, com certo esforço, conseguem ser quebrados, tanto em nível interespecífico como intraespecífico. Assim, podemos supor que o sistema atuante seja de auto-incompatibilidade mas com tolerância à compatibilidade (Bruckner, 1994).

3. Citogenética

Estudos cromossômicos têm sido utilizados na determinação das relações filogenéticas e evolutivas entre grupos de plantas (Raven, 1975). A análise de cariótipos, envolvendo a avaliação de dados como tamanho de cromossomos, relação entre os braços, presença de constrição secundária e satélites, podem trazer informações valiosas (Ruas, 1989).

A análise citogenética comumente utilizada na citotaxonomia inclui basicamente o número e morfologia dos cromossomos mitóticos, o aspecto do núcleo interfásico e o comportamento de cromossomos meióticos (Vosa, 1985; Guerra, 1988). Técnicas já muito utilizadas na citogenética animal, tais como a distribuição e diferenciação dos tipos de heterocromatina, a localização de regiões organizadoras de nucléolo, através da impregnação pele prata, identificação de DNAs satélite, têm sido aos poucos introduzidas, ainda com dificuldade, na citogenética vegetal. A divisão meiótica tem sido descrita e estudada em diferentes organismos, mostrando alta estabilidade evolutiva. Alterações cromossômicas, quando aparecem podem ser barradas pela complexidade destes eventos, pela dificuldade no pareamento dos cromossomos, na formação e manutenção de quiasmas e na coorientação dos centrômeros (Moraes-Fernandes *et al.*, 1985). Alguns estudos têm mostrado a ocorrência de irregularidades meióticas em células-mães de pólen, que estão relacionadas com o comportamento e distribuição dos cromossomos. A fertilidade dos gametas masculinos e femininos é dependente da normalidade meiótica.

A poliploidia é o tipo de variação cromossômica predominante na evolução das plantas, sendo de fundamental interesse para o melhoramento vegetal. Diferentes tipos de células podem sofrer ciclos endomitóticos ou mesmo sofrer um erro meiótico (não redução cromossômica) e tornam-se poliplóides (Guerra, 1988).

Dentro de um gênero ou mesmo de uma espécie podem ocorrer diversos números gaméticos que são múltiplos perfeitos, denominados de série poliplóide, sendo

considerado como número básico o menor número haplóide desta série, representado por X (Rieger et al., 1976; Guerra, 1988).

3.1. Em *Passiflora*

O gênero *Passiflora*, bem como os demais gêneros de passifloráceas, tem sido muito pouco estudado do ponto de vista citogenético. Segundo Oliveira (1996) existem informações citogenéticas registradas na literatura para 65 espécies do gênero *Passiflora*, além de 8 subespécies e 13 híbridos interespecíficos, mostrando que das 430 espécies conhecidas, menos de 20% apresentam identificação cromossômica (Apêndice 1). Este apêndice foi feito baseado no trabalho de Snow & MacDougal (1993) e complementado.

A maioria dos trabalhos compilados neste levantamento cita apenas o número cromossômico, raramente com análises cariotípicas e medidas cromossômicas. A escassez de tais dados pode ser, em parte, justificada pelo pequeno tamanho dos cromossomos em algumas espécies do gênero.

As espécies estudadas no gênero *Passiflora* possuem uma amplitude significativa para o tamanho e o número de cromossomos, podendo ser agrupadas segundo o número básico (haplóide) de cromossomos (x) em três grupos: $x = 6$, $x = 9$ e $x = 9$ ou 10 . O número cromossômico $2n$ varia no grupo $x = 6$, havendo espécies com $2n = 12$, $2n = 24$, $2n = 36$ e $2n = 84$ cromossomos; no grupo $x = 9$ com espécies onde $2n = 18$ cromossomos, e no grupo $x = 9$ ou 10 com espécies $2n = 18$, $2n = 20$, $2n = 22$.

Em *P. foetida* foram identificados vários números cromossômicos, $2n = 18$, $2n = 28$ e $2n = 22$. Estes resultados parecem indicar a ocorrência de aneuploidia na evolução desta espécie, o que nos permite acreditar que este processo também faz parte do processo evolutivo no gênero *Passiflora*.

O menor número haplóide é $x = 6$ ($n = 6$) e sugere a ocorrência de poliploidia nos processos evolutivos. Uma possível triploidia foi sugerida para a origem das espécies

com $2n = 18$ (Storey, 1950), hexaploidia nas espécies com $2n = 36$ (Meletti et al., 1992) e poliploidia na espécie *P. lutea* com $2n = 84$ (Bowden, 1940, 1945).

No gênero constata-se uma variação no nível de ploidia que vai até $14x$ ($14n$).

Todas as espécies horticulturalmente importantes mostram $2n = 18$, inclusive *Passiflora edulis f. flavicarpa* (Lopes, 1994).

Há variações numéricas intraespecíficas em *P. suberosa* e *P. foetida*. Em *P. suberosa* são descritos três números cromossômicos, $2n = 12$, $2n = 24$ e $2n = 36$ e estas diferenças estão associadas a grandes diferenças morfológicas neste grupo. Na região da Austrália e do Havaí, a espécie mostra $2n = 24$, sugerindo que o nível de ploidia é de grande importância na distribuição de *P. suberosa* na região dos trópicos (Lopes, 1991).

Há indicações sugerindo que as espécies com $2n = 18$ poderiam ter evoluído através da poliploidia ou pelo processo inverso, a partir de espécies com $2n = 24$ por sucessivas perdas de pares cromossômicos. Esta segunda hipótese de perdas cromossômicas, pode ser sustentada pela existência de espécies com números cromossômicos intermediários, com $2n = 18$ (Heitz, 1927; Janaki Ammal, 1945), $2n = 20$ (Nishiyama & Kondo, 1942; Guerra, 1986) e $2n = 22$ (Bowden, 1945; Harvey, 1966) em *P. foetida* e $2n = 20n$ (Bowden, 1945), $2n = 18$ (La Cour, 1952) em *P. gracilis*.

Todas as espécies estudadas mostram cromossomos pequenos, com comprimento médio variando de 2,3 a 3,7 μm . Possuem cariótipo simétrico, com centrômero em posição mediana ou sub-mediana, com relação de braços variando de 1,3 a 1,5 μm (Lopes, 1991).

O grupo de espécies de *Passiflora* com $2n = 18$ possui cromossomos somáticos de tamanho muito semelhante entre eles. O grupo com $2n = 12$ mostra maior falta de uniformidade entre o tamanho dos cromossomos (Lopes, 1994).

Foram detectados a presença de cromossomos com satélite em várias espécies (Beal, 1973). Alguns cromossomos com satélite foram identificados por Mayeda & Vieira (1995) no par 8 das espécies *P. edulis f. flavicarpa*, *P. edulis*, *P. amethystina*, *P. alata* e *P. giberti*.

As espécies *P. maliformis*, *P. seemanni* e *P. quadrangularis* possuem cromossomos muito pequenos sendo três pares com satélites (Beal, 1969a; 1969b).

Estudos citogenéticos em híbridos interespecíficos de *Passiflora*, tanto zigóticos como somáticos são muito pouco freqüentes. É importante considerar que a maioria dos híbridos obtidos, mesmo os que não foram analisados citogeneticamente é originada de progenitores com $2n = 18$ cromossomos sempre envolvendo espécies de interesse agrônomo como : *P. edulis* X *P. giberti* (Priolli, 1991), *P. edulis* X *P. coccinea* (Tomioka, 1990), *P. edulis* f. *flavicarpa* X *P. setacea* , *P. edulis* X *P. quadrangularis*, *P. edulis* X *P. alata* (Oliveira & Ferreira, 1991) e híbridos somáticos. A obtenção destes indica que as barreiras de incompatibilidade são frágeis (Oliveira & Ferreira, 1991). Estes híbridos sexuais mostraram compatibilidade interespecífica, já que apresentaram alguma fertilidade na parte masculina ou feminina, apesar de não produzirem frutos sugerindo que podem ser espécies relacionadas e com origens em comum.

Foram identificados nas espécies *P. giberti* e *P. setacea* fatores de resistência a doenças como a MPP (morte prematura da planta) (Oliveira et al., 1986) .

Buscando a transferência de fatores de resistência a essas doenças, híbridos interespecíficos foram obtidos por fusão de protoplastos também por D'Utra Vaz (1992) entre *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata*, e por Dornelas (1995) em *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. alata*, *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. giberti*, *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. amethystina*, *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. cincinnata* .

Subsequentemente foram feitas análises citológicas na fase de plântula naqueles híbridos obtidos por Dornelas (1995), indicando $2n = 36$ cromossomos. Após esta etapa inicial, algum destes híbridos foram plantados em diferentes locais e algumas destas plantas perderam suas características fenotípicas de híbridos. Acredita-se que estas fusões aparentemente não permaneceram estáveis. Assim o número cromossômico destas plantas deverá ser avaliado novamente.

Em *Passiflora* e outras espécies vegetais, pouco se conhece sobre as diferenças de fertilidade de híbridos somáticos e sexuais.

Frente a ampla variabilidade genética no gênero, os híbridos interespecíficos são uma opção à busca de resistência a doenças. Porém, há a esterilidade limitando o progresso do melhoramento do fruto. A tetraploidização, poderá ser atenuada, no caso de híbridos zigóticos, pelo processo de poliploidização com o uso de colchicina (Knight,

1991). Portanto, a compreensão das bases citológicas da esterilidade e genéticas dos sistemas de incompatibilidade nas espécies e híbridos poderão auxiliar o melhoramento genético em *Passiflora*.

4. Melhoramento genético em *Passiflora*

Pouco se conhece da ampla variabilidade encontrada no gênero *Passiflora*, no que diz respeito à morfologia da planta, ao florescimento, caracteres do fruto, resistência à pragas e doenças. Existem poucos estudos também sobre a origem das espécies, filogenia do gênero, número cromossômico e mecanismos de incompatibilidade. Estes estudos são básicos como suporte a um programa de melhoramento genético. O melhoramento de plantas alógamas se dá essencialmente, a partir do aumento das frequências de genes favoráveis ou pela heterose. A frequência de genes é aumentada pela seleção massal. A heterose é obtida através de híbridos naturais ou de variedades sintéticas.

Apesar do grande número de espécies e da variabilidade genética, inter e intra-específica observada, a espécie *P. edulis* Sims. e sua variedade botânica *P. edulis* f. *flavicarpa* Deg. são consideradas as mais importantes do ponto de vista comercial, tanto no Brasil como em outros países (Oliveira, J.C. et al., 1991).

A espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (maracujá amarelo) é de origem incerta, podendo ter sido derivada do cruzamento de *P. edulis* (maracujá roxo) com alguma espécie relacionada ou de mutação em *P. edulis*, segundo Martin & Nakasone (1970).

P. edulis Sims. é popularmente conhecido como maracujá roxo pela pigmentação da casca do fruto, sendo cultivado comercialmente em regiões mais frias e de altitudes elevadas.

Passiflora edulis f. flavicarpa Deg. é conhecido como maracujá amarelo pois possui a pigmentação da casca do fruto amarela e é cultivado em regiões mais quentes.

Além da coloração diferente do fruto, existem relatos de que em *P. edulis* a antese (abertura da flor) ocorre no período da manhã e, em *P. edulis f. flavicarpa*, no período da tarde (Akamine & Girolami, 1959; Carvalho, 1974; Manica, 1981; Oliveira, 1980).

No campo de manutenção e multiplicação de progênies da FCAVJ/UNESP em Jaboticabal, todos os acessos de maracujá roxo e amarelo florescem no período da tarde (Oliveira, 1987).

Em Jundiaí, S.Paulo, na Estação Experimental do IAC, a antese para ambos os maracujás, amarelo e roxo, ocorre no período da tarde (Meletti et al., 1992). Bruckner (1994) confirma estes resultados em Viçosa, MG.

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá e as variedades de maior interesse comercial são, em sua maioria, susceptíveis a doenças causadas por diversos agentes patogênicos (fungos, bactérias e vírus) e a diversas pragas (insetos, ácaros e nematóides) causando diminuição na produtividade e morte da planta (Ferraz, 1987; Steinberg, 1988; Brandão et al., 1991; Yamashiro, 1991 e St.Hill, 1992).

O Estado de São Paulo é o maior produtor de maracujá do país e tem apresentado um grande potencial para o desenvolvimento desta cultura, tanto pela diversidade de climas quanto pela oportunidade criada pela substituição de áreas ocupadas pela cultura cafeeira.

Assim, a cultura vem se expandindo abrangendo atualmente 5.000 ha (Meletti et al., 1992).

Em São Paulo as doenças que têm afetado a cultura do maracujá são: a murcha, a morte prematura da planta (MPP) e “woodness”. A murcha é causada pela fusariose, que é uma doença vascular que mata a planta por impedir o transporte de água, sendo causada por fungo, que está espalhado na maioria das regiões produtoras do Estado e que permanece no solo por muitos anos. A “woodness” é causada por vírus provocando o endurecimento do fruto. A MPP causa a morte da planta, mas seu agente ainda não foi identificado. Acredita-se que mais de um patógeno cause a doença. Todas estas doenças

têm causado o deslocamento constante das áreas de produção e comprometido a expansão da cultura.

Oliveira et al. (1986), observaram fatores de resistência à MPP (Morte Prematura da Planta) nas espécies *P. giberti* e *P. setacea*.

A hibridação interespecífica tem sido a melhor alternativa na busca de resistência a doenças, principalmente considerando-se a susceptibilidade à doenças da espécie comercial mais cultivada *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. Nesse sentido vários trabalhos têm sido realizados buscando aumentar a resistência a doenças nesta espécie, bem como procurar transferir fatores de resistência desejáveis das espécies selvagens para as cultivadas (Martin & Nakasone, 1970; Ruberté-Torres & Martin, 1974; Payán & Martin, 1975; Oliveira, 1980; Oliveira et al., 1988; Oliveira & Ferreira, 1991), pois de acordo com Martin & Nakasone (1970), as barreiras reprodutivas interespecíficas presentes não devem ser tão fortes, mesmo entre espécies pouco relacionadas.

São escassos os relatos de melhoramento de maracujá realizados no Brasil e demais países (Bruckner, 1994). Híbridos zigóticos interespecíficos são importantes em programas de melhoramento genético de maracujá e alguns têm sido obtidos apesar das dificuldades. Segundo Oliveira & Ferreira (1991), a ocorrência de mecanismos de auto-incompatibilidade, protandria e variações na morfologia floral e a distância genética entre as espécies dificultam o melhoramento genético através dos cruzamentos.

Apesar do intenso esforço em um programa de melhoramento em *Passiflora*, iniciado em 1983, Oliveira et al. (1991) obtiveram apenas alguns indivíduos, por hibridação interespecífica, a saber: *P. edulis* f. *flavicarpa* X *P. giberti*, *P. alata* X *P. quadrangularis* e *P. edulis* f. *flavicarpa* X *P. setacea*.

Outra técnica que vem sendo utilizada para a obtenção de híbridos interespecíficos é a hibridação somática. O isolamento de protoplasto, o desenvolvimento de cultura e fusão de protoplastos, com regeneração de plantas foram otimizados em algumas espécies de *Passiflora* (d'Utra Vaz et al., 1993; Dornelas, 1995). Esta técnica permite que sejam ultrapassadas as barreiras genéticas existentes nos cruzamentos entre espécies sexualmente incompatíveis, além da possibilidade de manutenção e multiplicação de alguns genótipos desejados, bem como do aumento de variabilidade genética. Quando da obtenção de híbridos somáticos estéreis (masculina e ou feminina),

retrocruzamentos com os indivíduos parentais, como doadores ou receptores de pólen, permitirão possivelmente a restauração da fertilidade .

As técnicas de micropropagação “in vitro” de clones selecionados permitem a aplicação de outros métodos de melhoramento (Vieira & Dornelas, 1996), como a transformação genética (Dornelas & Vieira, 1991; 1993).

Os híbridos somáticos poderão apresentar alta fertilidade, no caso de serem alotetraplóides, principalmente quando forem formados à partir de espécies com complementos cromossômicos bastante diferentes. Estes poderão ter a possibilidade de uma meiose regular com formação de bivalentes (Futuyma, 1992). Já no caso de retrocruzamentos com espécies parentais diplóides, apresentarão uma tendência à formação de progênies triplóides e conseqüentemente estéreis (Soost & Cameron, 1975; Evans & Davies , 1982).

Uma das maiores vantagens na hibridação de espécies, no gênero *Passiflora*, é o fato de que ela ocorre entre indivíduos heterozigotos, permitindo um aumento direto na produção baseado simplesmente na heterose (Strickberger, 1985).

5. Objetivos

Considerando a importância econômica do gênero *Passiflora*, ainda existem poucos estudos sobre a caracterização cromossômica, o comportamento meiótico e biologia da reprodução nas espécies do gênero. Estes conhecimentos são importantes, não só para a compreensão das relações interespecíficas e filogenia do gênero, mas contribuiriam com informações básicas para programas de melhoramento genético das espécies cultivadas. Este trabalho tem portanto como objetivos:

a. caracterizar citogeneticamente as espécies progenitoras *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. incarnata* e *P. setacea* e os híbridos, *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata* e *P. edulis* f. *flavicarpa* X *P. setacea*.

b. analisar o comportamento dos cromossomos na microsporogênese destas espécies e dos híbridos para verificar a capacidade de combinação das mesmas e o grau de fertilidade de seus híbridos.

c. avaliar a viabilidade polínica dos progenitores e híbridos.

d. contribuir com mais dados para avaliar a posição filogenética destas espécies no gênero *Passiflora*.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. As espécies em estudo

Foram analisadas três espécies de maracujá: *Passiflora edulis f. flavicarpa*, *Passiflora setacea* e *Passiflora incarnata*. Estas espécies foram selecionadas por apresentarem interesse agrônomo, sendo que *Passiflora edulis f. flavicarpa* é a espécie comercial mais cultivada e *Passiflora setacea* apresenta resistência a diversas doenças (Oliveira, 1986). *Passiflora incarnata* tem interesse por possuir características morfológicas, de potencial agrônomo, próximas às espécies comerciais. Além disso, as três espécies foram usadas como progenitoras dos dois híbridos analisados:

- a) Um híbrido somático *Passiflora edulis f. flavicarpa* + *Passiflora incarnata*, obtido por Otoni et al.(1995) por técnica de fusão de protoplastos (células somáticas);
- b) Um híbrido sexual (cruzamento interespecífico) de *Passiflora edulis f. flavicarpa* X *P. setacea*, obtido pelo Dr. João Carlos de Oliveira, UNESP, Jaboicabal.

As plantas utilizadas neste trabalho foram mantidas inicialmente em estufa e plantadas posteriormente na Estação Experimental de Jundiaí do Instituto Agrônomo de Campinas. Elas mostraram diferenças de desenvolvimento vegetativo e por isso foram plantadas com diferença de meses, tendo sido plantadas durante o período de fevereiro a abril de 1994.

Durante três anos consecutivos, 1994 a 1996, foram feitas observações nesses materiais quanto ao desenvolvimento vegetativo, época e período de floração, frutificação e características morfológicas, e foram realizadas coletas nas espécies progenitoras e em seus híbridos, para análise citogenética.

2. Análise citogenética

Para os estudos meióticos foram coletados botões florais de diversos tamanhos e em diferentes épocas do ano para analisar as diferentes fases da microsporogênese. Este material foi coletado no campo e fixado em solução de Carnoy (etanol:ácido acético / 3:1) por 24 horas a 4 °C e guardadas a -20 °C em álcool 70%.

A análise meiótica foi feita por esmagamento de anteras (Darlington & La Cour, 1977) e coradas convencionalmente por carmin propiônico a 1,2%, segundo técnica de Medina e Conagin (1964).

Para obtenção de metáfases mitóticas foram coletadas pontas de meristema de raiz. As raízes das três espécies foram obtidas pela germinação de sementes. Para os híbridos (que não produzem sementes), foram coletadas estacas das plantas originais que estavam no campo e colocadas para enraizar em estufa. No híbrido somático o enraizamento das estacas foi escasso dificultando a obtenção de raízes; a planta progenitora deste material morreu no campo, o que dificultou a obtenção de uma amostra maior. Alguns exemplares deste material ainda existem, e estão sendo mantidos na Estação. Experimental. de Monte Alegre do Sul (IAC) e, oportunamente deverão ser replantados.

Foram testados vários bloqueadores de divisão celular por diferentes períodos de tempo, como solução aquosa saturada de PDB (Paradiclorobenzeno), solução de 0,5% colchicina e solução de 0,002M de 8-hidroxiquinoleína. O bloqueador que apresentou melhor resultado foi a solução de 8-hidroxiquinoleína, a 0,002M, conforme Mayeda & Vieira (1994), mas com adaptação do tempo de tratamento que foi diminuído para 2 horas e 30 minutos. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução de Carnoy (3:1) por 30 minutos e mantidas em álcool 70%, a -20 °C. As raízes foram submetidas à hidrólise em HCl 1 N a 60° por 5 minutos e em solução de pectinase 2% diluída em tampão citrato de sódio por 60 minutos, lavadas em água destilada e transferidas para solução de ácido acético 50%.

Para a preparação das lâminas, as raízes foram esmagadas entre lâmina e lamínula e aquecidas na chama de lamparina. As lâminas foram congeladas em

nitrogênio líquido por segundos e as lamínulas foram em seguida removidas com auxílio de uma lâmina Gillete, colocadas em álcool absoluto (100 °) por 10 segundos e secas por 24 horas. As lâminas foram coradas com solução de Giemsa à 2% em tampão fosfato pH 6,8.

Para montagem do cariótipo foram analisadas 10 células de cada espécie progenitora e no híbrido sexual *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea*. No híbrido somático, *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata*, apenas 5 células foram analisadas. As metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio Vanox Olympus, utilizando-se filme AgfaCopex Pan 25 ASA, FujiHR11 25 ASA e KodakT-MAX 100 ASA. As fotomicrografias foram confeccionadas em papel Kodabrome print RC (F3).

As medidas foram realizadas com um compasso de ponta seca e régua milimetrada, em fotografias com ampliação de 4.000X. A partir destes valores, foram identificados os parâmetros que permitiram a identificação dos cromossomos: a) comprimento absoluto em micrômetros de cada cromossomo e dos respectivos braços, longo e curto; b) proporção de braços; c) comprimento relativo, expresso em porcentagem em relação ao lote haplóide; d) comprimento médio total do genoma.

Os valores obtidos, a partir do cálculo da proporção de braços, permitiram a classificação conforme a posição do centrômero, segundo Levan et al.(1964) e Guerra (1988). As médias do comprimento absoluto e relativo de cada cromossomo, nas três espécies de maracujá e no híbrido sexual, foram comparadas pelo teste paramétrico de Tuckey em nível de 5% de probabilidade, segundo modelo descrito por Gomes (1985).

A partir dos dados do comprimento total médio dos cromossomos, foram elaborados os ideogramas dos materiais analisados.

3. Viabilidade do pólen

A análise de viabilidade de pólen foi feita segundo técnica de coloração de Alexander (1980). Foram coletadas 10 flores por coleta efetuada, sendo que foram feitas três coletas por ano e analisados 300 grãos de pólen por flor. Para uma análise mais precisa da viabilidade polínica (V)

foram feitas três coletas, em nov/dez 94, em abr/95 e nov/95.

A análise de viabilidade e estimativa de frequência de tipos de pólen foi feita nos híbridos utilizando-se a câmara de Neubauer.

O tamanho do grão de pólen foi medido com o auxílio de ocular micrométrica, com ampliação de 625X.

Foram realizados testes de germinação de grãos de pólen nas espécies progenitoras e em seus híbridos, utilizando-se pólen fresco de flores recém abertas, semeadas em lâmina de gota pendente em meio líquido segundo técnica de Daulta & Chauhan (1987) e em meio semi - sólido, de agar 2% e sacarose 10%, pH 6,0, em lâminas comuns segundo adaptação de Broglia & Brunori (1994).

As placas foram incubadas em câmara úmida, sob luz incandescente, por até 72 horas.

III. RESULTADOS

1. Análise Citogenética

Há grande dificuldade na obtenção de metáfases mitóticas em pontas de raiz de maracujá, provavelmente por apresentarem baixo índice de divisão. A visualização das poucas metáfases é prejudicada pela grande dificuldade de espalhamento dos cromossomos. Mesmo selecionando-se raízes novas e macias, fez-se necessário a hidrólise com HCl e pectinase que promovem o clareamento do citoplasma e o amolecimento da parede celular. Muitas vezes este tratamento provoca danos nas células e nos cromossomos.

Os progenitores *P. edulis f. flavicarpa*, *P. setacea*, *P. incarnata* e o híbrido sexual *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* apresentaram $2n = 18$, o híbrido somático *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata* mostrou $2n = 36$ cromossomos.

Foram feitas medidas do comprimento total e dos braços longos e curtos dos cromossomos de cada uma das células analisadas e estabelecida a razão entre os braços e o comprimento relativo.

Os valores das médias (X), com os respectivos desvios padrões (DP), bem como o comprimento total médio do genoma para cada espécie e híbrido, são mostrados nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5.

1.2. Cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa*

O cariótipo de *P. edulis* f. *flavicarpa* foi determinado pelos valores das medidas cromossômicas realizadas em dez células (Tabela 1). Os valores médios do comprimento dos braços cromossômicos mostraram uma variação de 0,82µm (par 9) a 1,21µm (par 1) no braço curto e de 0,85µm (par 9) a 2,12µm (par 7) no braço longo. A variação das médias dos comprimentos absolutos (total) foi de $1,67 \pm 0,04\mu\text{m}$ para o cromossomo 9 a $3,15 \pm 0,13\mu\text{m}$ para o cromossomo 4. Os valores médios dos comprimentos relativos variaram de $7,75 \pm 0,17 \%$ para o cromossomo 9 a $14,55 \pm 0,61 \%$ para o cromossomo 4. O comprimento total do genoma foi de 21,59µm.

As razões de braços indicaram que os cromossomos de número 1, 2, 3, 5, 6, 8 e 9 são metacêntricos, enquanto que os de número 4 e 7 são submetacêntricos. Os pares cromossômicos 4 e 7 mostram, no braço longo, uma constrição secundária (Figuras 1 e 6a).

1.3. Cariótipo de *P. setacea*

O cariótipo de *P. setacea* foi determinado pela análise de dez células cujas medidas cromossômicas são mostradas na tabela 2.

O comprimento do braço longo mostrou valores médios entre 0,76µm (par 9) e 2,02µm (par 4) e o braço curto entre 0,74µm (par 9) e 1,23µm (par 1). Com relação ao comprimento absoluto dos cromossomos desta espécie, os valores médios variaram de $1,50 \pm 0,09\mu\text{m}$ para o cromossomo 9 e $3,11 \pm 0,13\mu\text{m}$ para o cromossomo 4, enquanto que o comprimento relativo ficou entre $6,87 \pm 0,33 \%$ (cromossomo 9) e $14,19 \pm 0,45 \%$ (cromossomo 4). O comprimento total do genoma foi 22,04µm. Pelo cálculo da razão de braços, os cromossomos de número 1, 2, 3, 5, 6 e 9 são metacêntricos e os de número 4, 7 e 8 são submeta-

cêntricos. Estes três últimos pares mostram constrição secundária no seu braço longo (Figuras 2 e 6b).

1.4. Cariótipo de *P. incarnata*

Em *P. incarnata* foram medidas dez células e os resultados estão na tabela 3. Os valores do comprimento do braço cromossômico longo variaram de 0,91 μ m (par 9) a 2,41 μ m (par 4) e do braço curto, de 0,95 μ m (par 9) a 1,40 μ m (par 1). Os valores das médias dos comprimentos absolutos dos cromossomos variaram de $1,86 \pm 0,07\mu$ m para o cromossomo 9 a $3,91 \pm 0,20\mu$ m para o cromossomo 4. Já os valores dos comprimentos relativos variaram de $7,56 \pm 0,60 \%$ para o cromossomo 9 a $15,94 \pm 0,07 \%$ para o cromossomo 4. O lote haplóide apresentou um comprimento total de 24,42 μ m.

A proporção entre os braços mostra que os cromossomos de número 1, 2, 3, 5, 6, 8 e 9, são metacêntricos enquanto que os de número 4 e 7, são submetacêntricos. Estes pares cromossômicos, 4 e 7, possuem também, uma constrição secundária no braço longo (Figuras 3 e 6c).

1.5. Cariótipo de *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea*

As medidas cromossômicas realizadas em dez células do híbrido sexual *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* encontram-se na tabela 4. Os valores do comprimento do braço longo mostraram uma variação de 0,92 μ m (par 9) a 2,73 μ m (par 4) e o braço curto de 0,82 μ m (par 9) a 1,35 μ m (par 1). A variação do comprimento absoluto foi de $1,74 \pm 0,06\mu$ m

(par 9) a $4,01 \pm 0,18\mu\text{m}$ (par 4). Para o comprimento relativo, os valores extremos foram $6,19 \pm 0,23\mu\text{m}$ (par 9) a $15,62 \pm 0,36\mu\text{m}$ (par 4). O comprimento total do genoma foi de $25,75\mu\text{m}$.

Os valores observados de razão de braços indicam que os pares cromossômicos 1, 2, 3, 5, 6 e 9 são metacêntricos, e os pares 4, 6 e 7 são submetacêntricos. Os pares 4, 6 e 7 apresentam uma constrição secundária no braço longo (Figuras 4 e 7a).

1.6. Cariótipo de *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata*

O cariótipo do híbrido somático *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata* foi determinado pelos valores das médias cromossômicas realizadas em cinco células (Tabela 5). Os valores médios do comprimento dos braços cromossômicos mostram no braço curto uma variação de $0,75\mu\text{m}$ (par 18) a $1,58\mu\text{m}$ (par 1) e o braço longo de $1,00\mu\text{m}$ (par 18) a $2,45\mu\text{m}$ (par 5). A variação das médias do comprimento absoluto foi de $1,75 \pm 0,09\mu\text{m}$ para o par 18 a $4,82 \pm 0,23\mu\text{m}$ para o par 4. Os valores médios dos comprimentos relativos variaram de $3,18 \pm 0,21\%$ para o par 18 a $8,73 \pm 0,19\%$ para o par 4. O comprimento total médio do genoma foi de $55,22\mu\text{m}$.

Os valores observados para a razão de braços indicam que os cromossomos de número 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17 e 18 são metacêntricos e os pares de número 4, 5, 13 e 14 são submetacêntricos. Foi verificada a presença de constrição secundária no braço longo dos pares 4, 5, 13 e 14 (Figura 5 e 7b).

Foi realizado o teste de Tuckey, com 5% de probabilidade, entre as médias dos comprimentos absolutos e relativos das três espécies estudadas, *P. incarnata*, *P. setacea* e *P. edulis f. flavicarpa*. O resultado (Tabelas 6 e 7) não mostrou diferenças significativas entre as mesmas. Estas diferenças são mais claras quando se consideram os valores médios dos

comprimentos absolutos dos cromossomos, com diferenças maiores entre as espécies *P. edulis f. flavicarpa* e *P. incarnata*.

O teste de Tuckey, com 5% de probabilidade, foi realizado também para comparação das médias dos comprimentos absolutos e relativos entre as duas espécies progenitoras e seu híbrido, ou seja entre *P. edulis f. flavicarpa*, *P. setacea* e *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* (Tabelas 8 e 9). As diferenças são maiores quando se considera os valores médios dos comprimentos absolutos dos cromossomos com diferenças entre as espécies progenitoras e o híbrido. Os valores do comprimento relativo (%) são mais homogêneos e não apresentam diferenças entre a espécie *P. setacea* e o híbrido *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea*.

Os resultados indicam que, entre as três espécies, *P. incarnata* é a que apresenta o maior comprimento absoluto dos cromossomos.

O híbrido sexual mostra um comprimento total de 25,75µm, que é superior ao das espécies progenitoras. Os resultados do híbrido somático mostram quase o dobro de tamanho do comprimento total dos cromossomos em relação às outras espécies e também em relação ao híbrido sexual.

1.7. Comportamento meiótico nas espécies e híbridos

A análise meiótica realizada nas espécies *P. edulis f. flavicarpa* e *P. setacea* permitiu a observação de nove bivalentes normais na fase de metáfase I.

Em *P. incarnata* foi verificado a presença de nove bivalentes no final da prófase.

A análise meiótica nos híbridos *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata* (somático), *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* (sexual) indica a presença de diversas anormalidades no processo de microsporogênese. Em *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata*, irregularidades meióticas foram observadas desde as fases iniciais da microsporogênese. Na fase de paquíteno foi detectada a presença de dois núcleos em algumas células, sendo que um deles

encontrava-se condensado (Figura 8A). Foi observada a presença de multivalentes no diplóteno/diacinese (Figura 8B), de trivalentes e tetravalentes na metáfase I (Figura 8C), não formação de bivalentes na metáfase I, mostrando apenas 8 II (Figura 8D), multivalentes na metáfase I (Figuras 9A e 9C), multivalentes e univalentes em MI (Figura 9B) a existência de cromossomos retardatários na placa da anáfase II (Figura 9D) e micronúcleos na telófase II (Figura 9E e Tabela 10).

Em *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* estas alterações na meiose também aparecem em metáfase I presença de multivalentes (Figuras 10B e 10C), cromossomos retardatários em anáfase II (Figura 10D) e diferenças do número de cromossomos em cada polo ao final da anáfase (Figura 10E, 10F e Tabela 11).

O resultado da análise da meiose para o híbrido somático *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata* encontra-se na tabela 10. Esta análise foi realizada em 100 células em MI, mostrando diversas configurações cromossômicas. A presença dos 18 II que indica um pareamento normal ocorreu em 9% das células. Células mostrando 17II + 2I foram observadas, em 8%, 13II + 4I + multivalente em 5% e 9II + 2I + multivalente em 9%. Multivalentes também foram encontrados em células com 16II + 1 multivalente (11%), com 15II + 1 multivalente, (6%), com 14II + 1 multivalente, (15%), com 10 II + 1 multivalente (11%) e com 8 II + 2 multivalentes (8%). Assim, bivalentes + multivalentes ocorreram em 55% e bivalentes + univalentes em 30% das células analisadas.

Foram analisadas 40 células em anáfase I (AI). A quantidade de anáfase-I com 18 cromossomos em cada polo ocorreu em 9% das células, sendo que células em anáfase-I com 19 cromossomos em um dos polos foram detectadas em 35% e com 17 cromossomos em um dos polos em 20% das células analisadas. Foi verificado também que 20% das células apresentavam-se com 16/15 e 35% com 14/12 cromossomos distribuídos nos polos.

A frequência de irregularidades na microsporogênese para o híbrido sexual, *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea*, encontra-se na Tabela 11. Em um total de 100 células em metáfase I (MI) analisadas, neste híbrido verificou-se um número de 9 bivalentes, em 29% das células analisadas. Em 58% das células foi verificado diferentes números de bivalentes (7II, 6II e 5II) com um multivalente (Figuras 10A - 10C). Diferentemente do híbrido somáti-

co, neste híbrido não foi observada a presença de univalentes em MI. Na anáfase I (AI) foram analisadas 76 células (Tabela 11). A análise indicou a presença de 9 cromossomos em ambos os polos em 28,95% das células analisadas. O número de combinações existentes nos polos em anáfase I, no híbrido sexual, é maior do que no híbrido somático, tendo sido detectados 6 tipos diferentes de distribuição de cromossomos nos polos (Tabela 11, Figuras 10D e 10E). Pode-se observar, em 82,5% das células analisadas em AI, a presença de nove cromossomos em pelo menos um dos polos.

O híbrido sexual *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* não mostrou alterações na formação das tétrades, seja no número, seja no tamanho destas. Não foram observados micronúcleos ou presença de mais de um núcleo neste híbrido.

No híbrido somático *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata*, as irregularidades meióticas foram observadas nos estádios finais da divisão, principalmente nas tétrades. No final da telófase II pôde-se detectar a presença de micronúcleos, além dos 4 núcleos normais (Figura 9E). Foram observadas também alterações do número de micrósporos que são formados no microsporócito, com um aumento do número destes na fase de tétrade (Figura 11A e 11B). Os micrósporos mostraram também variações de tamanho, mostrando micrósporos com diâmetros maiores e menores que das espécies progenitoras e mesmo em relação ao híbrido sexual (Figura 11E).

Estas variações do número de micrósporos em cada microsporócito foi amostrada (Tabela 12) tendo sido observados: 5 micrósporos (péntade) em 40% das células, 6 micrósporos (hêxade) em 22,50% das células e 7 micrósporos (hêptade) em 12,5% das células.

Foi detectada também presença de número variável de pequenos núcleos (micronúcleos) em cada micrósporo formados anteras, na fase de tétrade, deste híbrido somático como consta da tabela 13. Esta variação mostra de um a três micronúcleos no interior de cada micrósporo (Figuras 11C e 11D).

2. Análise de Viabilidade de pólen

A análise realizada para verificar a viabilidade de pólen segundo método de Alexander (1980), nas espécies progenitoras *P. edulis f. flavicarpa*, *P. setacea* e *P. incarnata* confirmam processos meióticos normais, pela alta viabilidade mostrada nestas espécies.

Os resultados (Tabela 14) indicaram viabilidade de 90% para a espécie parental *P. edulis f. flavicarpa* (Figura 12), $V = 55\%$ para *P. incarnata* e $V = 78,5\%$ para *P. setacea*. A baixa viabilidade apresentada por *P. incarnata* levou ao replante deste material que foi novamente analisado nos meses de novembro de 1995 mostrando $V = 85,3\%$ e no decorrer de 1996, em abril $V = 78,2\%$ e, em novembro, $V = 86,1\%$.

Nos híbridos *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata*, a viabilidade média em 3 coletas foi de $V = 37,2\%$. Em *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* a análise inicial, em dezembro de 1994, mostrou uma $V = 90\%$, e esta viabilidade baixou para $V = 43,3\%$ em dezembro de 1995 (Tabela 14).

O pólen do híbrido somático *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata* (Figura 13 e 14 A) mostrou um alto polimorfismo quanto ao diâmetro, tanto em grãos viáveis como em inviáveis, o que não foi observado no híbrido sexual *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* (Figura 14 B). Foi feita então uma análise comparativa do diâmetro de grãos de pólen viáveis e inviáveis das espécies progenitoras e dos híbridos. Foram medidos 1.800 grãos de pólen, sendo 300 de cada espécie progenitora e do híbrido sexual, e 600 do híbrido somático (Tabela 15). Foi observada a existência de dois diâmetros diferentes de grãos viáveis e de três diâmetros diferentes de inviáveis no híbrido somático aparecendo um tipo de grão inviável com tamanho reduzido, com diâmetro médio de $24,76\mu\text{m}$.

O híbrido *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* mostrou variação na viabilidade polínica em diferentes épocas de florescimento conforme mostra a Tabela 14. Esta análise foi feita novamente durante 1996, e mostrou nova queda na viabilidade polínica (V) para $31,2\%$.

A análise feita utilizando a câmara de Neubauer permitiu uma amostragem da quantidade de grãos de pólen viáveis e inviáveis presentes nas anteras do híbrido somático (Tabela 16). Esta análise permitiu a confirmação da existência do polimorfismo de grãos anteriormente detectado e mostrado na Tabela 15. Foram detectados dois valores de viabilidade para pólen grandes e médios, que somados indicam uma viabilidade média de 36,38% (Tabela 16), muito próxima à mostrada na Tabela 15 ($V = 37,2\%$). Esta análise permitiu também que se estimasse a frequência de tipos de pólen em uma amostra de 567.500 pólenes. Dentre estes, os viáveis “médios” e os inviáveis “médios” estão em maior número.

Para complementar a análise de viabilidade, outra metodologia utilizada foi a de germinação de grãos de pólen que avalia a capacidade de crescimento do tubo polínico. Foram analisados grãos de pólen de *P. edulis f. flavicarpa*, *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* e *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata* (Figuras 15 A-C). Foram utilizados dois meios de cultura diferentes para a germinação (Dempsey, 1962; Daulta & Chauhan, 1987 e Broglia & Brunori, 1994). Em ambos os meios, tanto o híbrido somático como o sexual, mostraram índices relativamente baixos de emissão e crescimento de tubos polínicos. A espécie *P. edulis f. flavicarpa*, que foi usada como controle, mostrou um grau relativamente alto de emissão de tubos (Figura 15A). Estes resultados mostraram a baixa viabilidade dos pólenes dos híbridos analisados (Figuras 15B e 15C).

3. Aspectos vegetativos

Foi verificado em ambos os híbridos, somático e sexual, que há um aumento no desenvolvimento vegetativo geral da planta, que apresenta um maior número de folhas e aumento do tamanho das folhas e do pedúnculo dos botões florais (Figura 16). Outras características relacionadas à morfologia floral que não estão presentes nas espécies progenitoras foram observadas em ambos os híbridos.

As flores do híbrido sexual *P. edulis* f. *flavicarpa* X *P. setacea* (Figura 18) mostram as sépalas com morfologia muito parecida com *P. setacea* (Figura 17). As flores do híbrido somático *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata* (Figura 19), mostraram coloração e morfologia bem próximas à espécie progenitora *P. edulis* f. *flavicarpa* (Figura 17). Houve um aumento significativo na quantidade de flores produzidas em ambos os híbridos. Foi observada a ocorrência de frutos apenas no híbrido *P. edulis* f. *flavicarpa* X *P. setacea*, porém sem a presença de sementes (Figura 20).

Tabela 1 . Medidas cromossômicas de *P. edulis f. flavicarpa**

Pares de cromossomos	Braços dos cromossomos		Comprimento total L + C	Comprimento relativo L+C / X	Razão de braços L / C	Tipo
	L	C				
1	1,54	1,21	2,75 ± 0,09	12,73 ± 0,26	1,28 ± 0,03	M
2	1,49	1,13	2,62 ± 0,11	12,40 ± 0,32	1,33 ± 0,09	M
3	1,30	1,11	2,41 ± 0,07	12,16 ± 0,17	1,12 ± 0,05	M
4	1,97	1,18	3,15 ± 0,13	14,55 ± 0,61	1,67 ± 0,06	SM
5	1,22	1,00	2,22 ± 0,08	10,41 ± 0,27	1,25 ± 0,08	M
6	1,07	0,97	2,04 ± 0,08	9,50 ± 0,18	1,15 ± 0,07	M
7	2,12	0,84	2,96 ± 0,16	13,70 ± 0,53	2,52 ± 0,08	SM
8	0,94	0,84	1,78 ± 0,07	8,22 ± 0,26	1,16 ± 0,05	M
9	0,85	0,82	1,67 ± 0,04	7,75 ± 0,17	1,16 ± 0,06	M

* (Média de 10 células, em μm) Comprimento total médio do genoma = 21,59 μm

L= braço longo; C= braço curto; X = comprimento total médio do genoma (Classificação segundo Levan et al., 1964).

Tabela 2. Medidas cromossômicas de *P. setacea**

Pares de cromossomos	Braços dos cromossomos		Comprimento total L + C	Comprimento relativo L+C / X	Razão de braços L / C	Tipo
	L	C				
1	1,60	1,23	2,83 ± 0,17	12,78 ± 0,04	1,21 ± 0,03	M
2	1,55	1,17	2,72 ± 0,17	12,32 ± 0,12	1,35 ± 0,09	M
3	1,41	1,16	2,57 ± 0,14	11,64 ± 0,16	1,23 ± 0,06	M
4	2,02	1,09	3,11 ± 0,13	14,19 ± 0,45	1,92 ± 0,90	SM
5	1,41	1,01	2,42 ± 0,19	10,94 ± 0,50	1,14 ± 0,04	M
6	1,05	0,96	2,01 ± 0,13	9,11 ± 0,27	1,09 ± 0,03	M
7	1,69	0,97	2,66 ± 0,21	12,04 ± 0,70	2,13 ± 0,14	SM
8	1,39	0,84	2,23 ± 0,18	10,53 ± 0,70	1,72 ± 0,14	SM
9	0,76	0,74	1,50 ± 0,09	6,87 ± 0,33	1,08 ± 0,07	M

* (Média de 10 células, em μm) Comprimento total médio do genoma = 22,04 μm

L = braço longo; C = braço curto; X = comprimento total médio do genoma (Classificação segundo Levan et al., 1964).

Tabela 3. Medidas cromossômicas de *P. incarnata**

Pares de cromossomos	Braços dos cromossomos		Comprimento total L + C	Comprimento relativo L+C / X	Razão de braços L / C	Tipo
	L	C				
1	1,85	1,40	3,25 ± 0,10	13,28 ± 0,26	1,35 ± 0,06	M
2	1,57	1,40	2,97 ± 0,08	12,17 ± 0,23	1,12 ± 0,05	M
3	1,43	1,29	2,72 ± 0,11	11,14 ± 0,26	1,12 ± 0,01	M
4	2,41	1,5	3,91 ± 0,20	15,94 ± 0,07	1,83 ± 0,13	SM
5	1,29	1,16	2,45 ± 0,09	9,99 ± 0,04	1,17 ± 0,06	M
6	1,24	1,13	2,37 ± 0,09	9,64 ± 0,20	1,09 ± 0,05	M
7	1,95	0,97	2,92 ± 0,15	11,97 ± 0,60	1,84 ± 0,15	SM
8	1,29	0,98	2,27 ± 0,07	8,27 ± 0,18	1,00 ± 0,02	M
9	0,91	0,95	1,86 ± 0,07	7,56 ± 0,60	0,88 ± 0,10	M

* (Média de 10 células, em μm) Comprimento total médio do genoma = 24,42 μm

L = braço longo; C = braço curto; X = comprimento total médio do genoma (Classificação segundo Levan et al., 1964).

Tabela 4. Medidas cromossômicas de *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea**

Pares de cromossomos	Braços dos cromossomos		Comprimento total L + C	Comprimento relativo L+C / X	Razão de braços L / C	Tipo
	L	C				
1	2,07	1,34	3,41 ± 0,08	13,31 ± 0,26	1,31 ± 0,06	M
2	1,86	1,35	3,21 ± 0,11	12,48 ± 0,17	1,39 ± 0,10	M
3	1,81	1,18	2,99 ± 0,13	11,58 ± 0,22	1,29 ± 0,16	M
4	2,73	1,28	4,01 ± 0,18	15,62 ± 0,36	2,09 ± 0,15	SM
5	1,36	1,16	2,52 ± 0,13	9,74 ± 0,27	1,18 ± 0,08	M
6	1,20	1,09	2,29 ± 0,12	8,80 ± 0,23	1,20 ± 0,11	M
7	2,09	0,95	3,04 ± 0,17	11,66 ± 0,50	2,52 ± 0,19	SM
8	1,72	0,82	2,54 ± 0,09	9,78 ± 0,27	2,06 ± 0,04	SM
9	0,92	0,82	1,74 ± 0,06	6,19 ± 0,23	1,14 ± 0,05	M

* (Média de 10 células, em μm) Comprimento total médio do genoma = 25,75 μm

L = braço longo; C = braço curto; X = comprimento total médio do genoma (Classificação segundo Levan et al., 1964).

Tabela 5. Medidas cromossômicas de *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata**

Pares de cromossomos	Braços dos cromossomos		Comprimento total L + C	Comprimento relativo L+C / X	Razão de braços L / C	Tipo
	L	C				
1	2,28	1,58	3,86 ± 0,09	7,00 ± 0,09	1,43 ± 0,24	M
2	1,93	1,58	3,51 ± 0,16	6,31 ± 0,45	1,22 ± 0,19	M
3	2,01	1,32	3,33 ± 0,23	6,02 ± 0,18	1,53 ± 0,24	M
4	3,33	1,49	4,82 ± 0,23	8,73 ± 0,19	2,32 ± 0,37	SM
5	3,02	1,32	4,34 ± 0,27	7,83 ± 0,36	2,45 ± 0,38	SM
6	1,85	1,40	3,25 ± 0,17	5,87 ± 0,14	1,32 ± 0,21	M
7	1,65	1,49	3,16 ± 0,29	5,69 ± 0,37	1,13 ± 0,18	M
8	1,53	1,36	2,89 ± 0,30	5,23 ± 0,15	1,13 ± 0,17	M
9	1,40	1,40	2,80 ± 0,09	5,10 ± 0,06	1,07 ± 0,16	M
10	1,49	1,36	2,85 ± 0,19	5,16 ± 0,24	1,25 ± 0,19	M
11	1,50	1,22	2,72 ± 0,23	4,96 ± 0,58	1,15 ± 0,17	M
12	1,30	1,22	2,54 ± 0,09	4,60 ± 0,05	1,08 ± 0,16	M
13	2,56	1,05	3,61 ± 0,08	6,52 ± 0,30	2,42 ± 0,37	SM
14	1,93	1,05	2,98 ± 0,18	5,39 ± 0,17	2,08 ± 0,36	SM
15	1,31	1,20	2,54 ± 0,09	4,62 ± 0,29	1,08 ± 0,17	M
16	1,19	0,96	2,15 ± 0,12	3,96 ± 0,22	1,28 ± 0,23	M
17	1,16	0,96	2,12 ± 0,16	3,80 ± 0,21	1,19 ± 0,18	M
18	1,00	0,75	1,75 ± 0,09	3,18 ± 0,21	1,00 ± 0,14	M

* (Média de 5 células, em μm) Comprimento total médio do genoma = 55,22 μm

L = braço longo; C = braço curto; X = comprimento total médio do genoma (Classificação segundo Levan et al., 1964).

Tabela 6. Teste de Tukey para comparação das médias dos comprimentos absolutos (em μm) dos cromossomos de *Passiflora incarnata*, *P. setacea* e *P. edulis f. flavicarpa*. *

Par cromossômico	<i>P. incarnata</i>	<i>P. setacea</i>	<i>P. ed. f. flavicarpa</i>
1	$3,25 \pm 0,10^a$	$2,83 \pm 0,17^b$	$2,75 \pm 0,09^b$
2	$2,97 \pm 0,08^a$	$2,72 \pm 0,17^a$	$2,62 \pm 0,10^a$
3	$2,72 \pm 0,11^a$	$2,57 \pm 0,14^a$	$2,40 \pm 0,07^a$
4	$3,91 \pm 0,20^a$	$3,11 \pm 0,13^b$	$3,15 \pm 0,13^b$
5	$2,45 \pm 0,09^a$	$2,42 \pm 0,19^a$	$2,22 \pm 0,08^a$
6	$2,37 \pm 0,09^a$	$2,01 \pm 0,13^a$	$2,04 \pm 0,08^a$
7	$2,92 \pm 0,15^a$	$2,66 \pm 0,21^a$	$2,96 \pm 0,16^a$
8	$2,27 \pm 0,07^a$	$2,23 \pm 0,18^a$	$1,78 \pm 0,07^b$
9	$1,86 \pm 0,07^a$	$1,50 \pm 0,09^b$	$1,67 \pm 0,04^c$

* Médias seguidas por letras diferentes diferem em nível de 5%.

Médias seguidas por letras iguais não diferem em nível de 5%.

Tabela 7. Teste de Tukey para comparação das médias dos comprimentos relativos (%) dos cromossomos de *Passiflora incarnata*, *P. setacea* e *P. edulis f. flavicarpa*. *

Par cromossômico	<i>P. incarnata</i>	<i>P. setacea</i>	<i>P. ed. f. flavicarpa</i>
1	13,28 ± 0,17 ^a	12,78 ± 0,04 ^a	12,73 ± 0,26 ^a
2	12,17 ± 0,23 ^a	12,32 ± 0,12 ^a	12,11 ± 0,32 ^a
3	11,14 ± 0,26 ^a	11,64 ± 0,16 ^a	11,16 ± 0,17 ^a
4	15,94 ± 0,70 ^a	14,19 ± 0,45 ^a	14,58 ± 0,51 ^a
5	9,99 ± 0,04 ^a	10,94 ± 0,50 ^a	10,25 ± 0,27 ^a
6	9,64 ± 0,20 ^a	9,11 ± 0,27 ^a	9,42 ± 0,18 ^a
7	11,97 ± 0,60 ^a	12,04 ± 0,70 ^a	13,68 ± 0,53 ^a
8	8,27 ± 0,18 ^a	10,13 ± 0,70 ^b	8,24 ± 0,26 ^a
9	7,56 ± 0,60 ^a	6,87 ± 0,33 ^a	7,76 ± 0,17 ^a

* Médias seguidas por letras diferentes diferem em nível de 5%.

Médias seguidas por letras iguais não diferem em nível de 5%.

Tabela 8. Teste de Tukey para comparação das médias dos comprimentos absolutos (em μm) dos cromossomos de *P. edulis f. flavicarpa*, *P. setacea* e *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* *

Par cromossômico	<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	<i>P. setacea</i>	<i>P.ed.f.flav</i> x <i>P.setacea</i>
1	$2,75 \pm 0,09^a$	$2,83 \pm 0,17^a$	$3,41 \pm 0,08^b$
2	$2,62 \pm 0,10^a$	$2,72 \pm 0,17^a$	$3,21 \pm 0,11^b$
3	$2,40 \pm 0,07^a$	$2,57 \pm 0,14^a$	$2,99 \pm 0,13^b$
4	$3,15 \pm 0,13^b$	$3,11 \pm 0,13^b$	$4,01 \pm 0,18^b$
5	$2,22 \pm 0,08^a$	$2,42 \pm 0,19^a$	$2,52 \pm 0,13^a$
6	$2,04 \pm 0,08^a$	$2,01 \pm 0,13^a$	$2,29 \pm 0,12^a$
7	$2,96 \pm 0,16^a$	$2,66 \pm 0,21^a$	$3,04 \pm 0,17^a$
8	$1,78 \pm 0,07^a$	$2,23 \pm 0,18^b$	$2,54 \pm 0,09^b$
9	$1,67 \pm 0,04^a$	$1,50 \pm 0,09^b$	$1,74 \pm 0,06^a$

* Médias seguidas por letras diferentes diferem em nível de 5%.
Médias seguidas por letras iguais não diferem em nível de 5%.

Tabela 9. Teste de Tukey para comparação das médias dos comprimentos relativos (%) dos cromossomos de *P. edulis f. flavicarpa* , *P. setacea* e *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea* *

Par cromossômico	<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	<i>P. setacea</i>	<i>P.ed.f.flav</i> x <i>P.setacea</i>
1	12,73 ± 0,26 ^a	12,78 ± 0,04 ^a	13,31 ± 0,26 ^a
2	12,11 ± 0,32 ^a	12,32 ± 0,12 ^a	12,48 ± 0,17 ^a
3	11,16 ± 0,17 ^a	11,64 ± 0,16 ^a	11,58 ± 0,22 ^a
4	14,58 ± 0,51 ^a	14,19 ± 0,45 ^a	15,62 ± 0,35 ^a
5	10,25 ± 0,27 ^a	10,94 ± 0,50 ^a	9,74 ± 0,27 ^a
6	9,42 ± 0,18 ^a	9,11 ± 0,27 ^a	8,80 ± 0,23 ^a
7	13,68 ± 0,53 ^a	12,04 ± 0,70 ^a	11,66 ± 0,50 ^a
8	8,24 ± 0,26 ^a	10,13 ± 0,70 ^b	9,78 ± 0,27 ^b
9	7,76 ± 0,17 ^a	6,87 ± 0,33 ^b	6,90 ± 0,23 ^b

* Médias seguidas por letras diferentes diferem em nível de 5%.

Médias seguidas por letras iguais não diferem em nível de 5%.

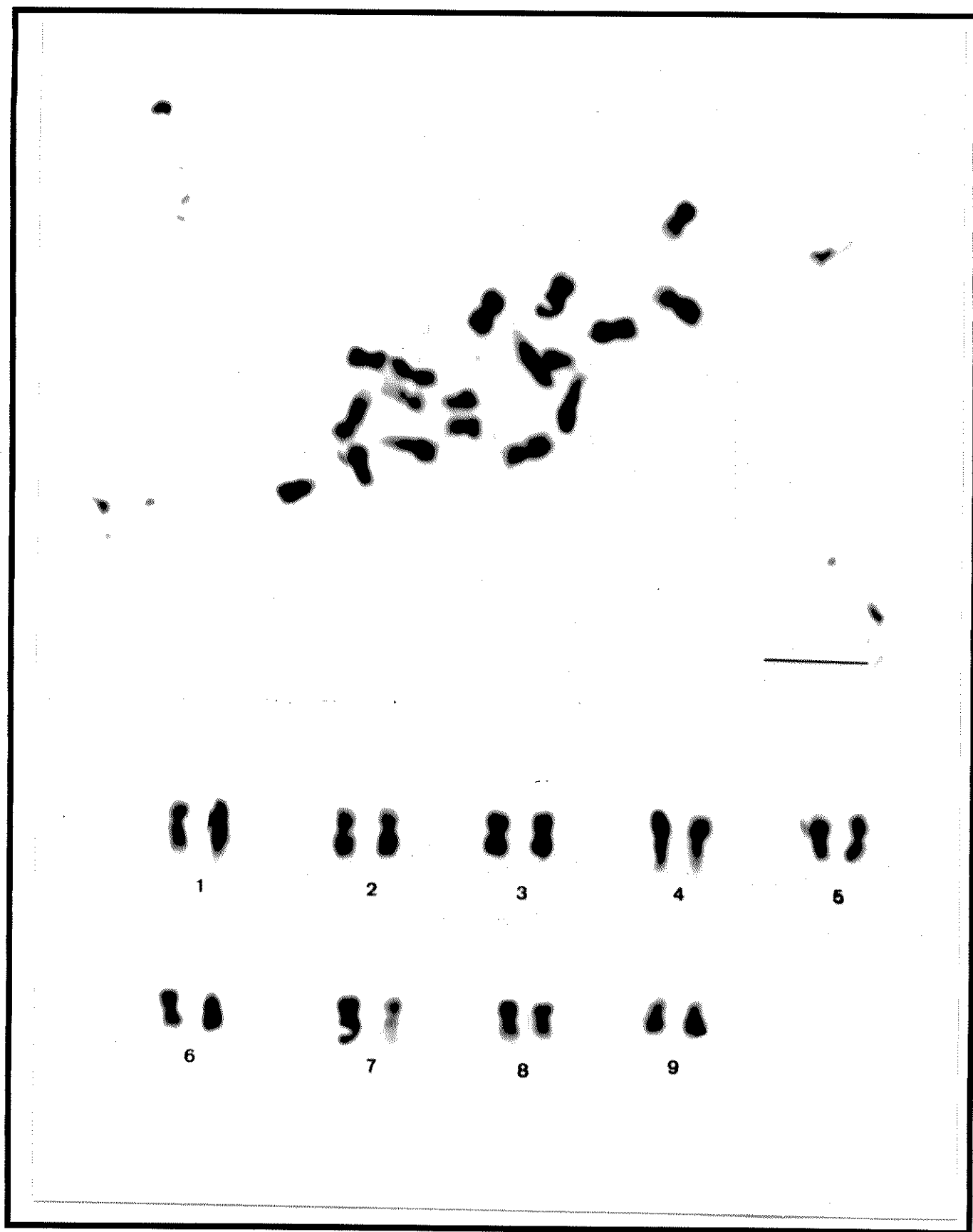


Figura 1. Metáfase e cariótipo dos cromossomos mitóticos de raiz *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, $2n = 18$. (Barra = 5 μm)

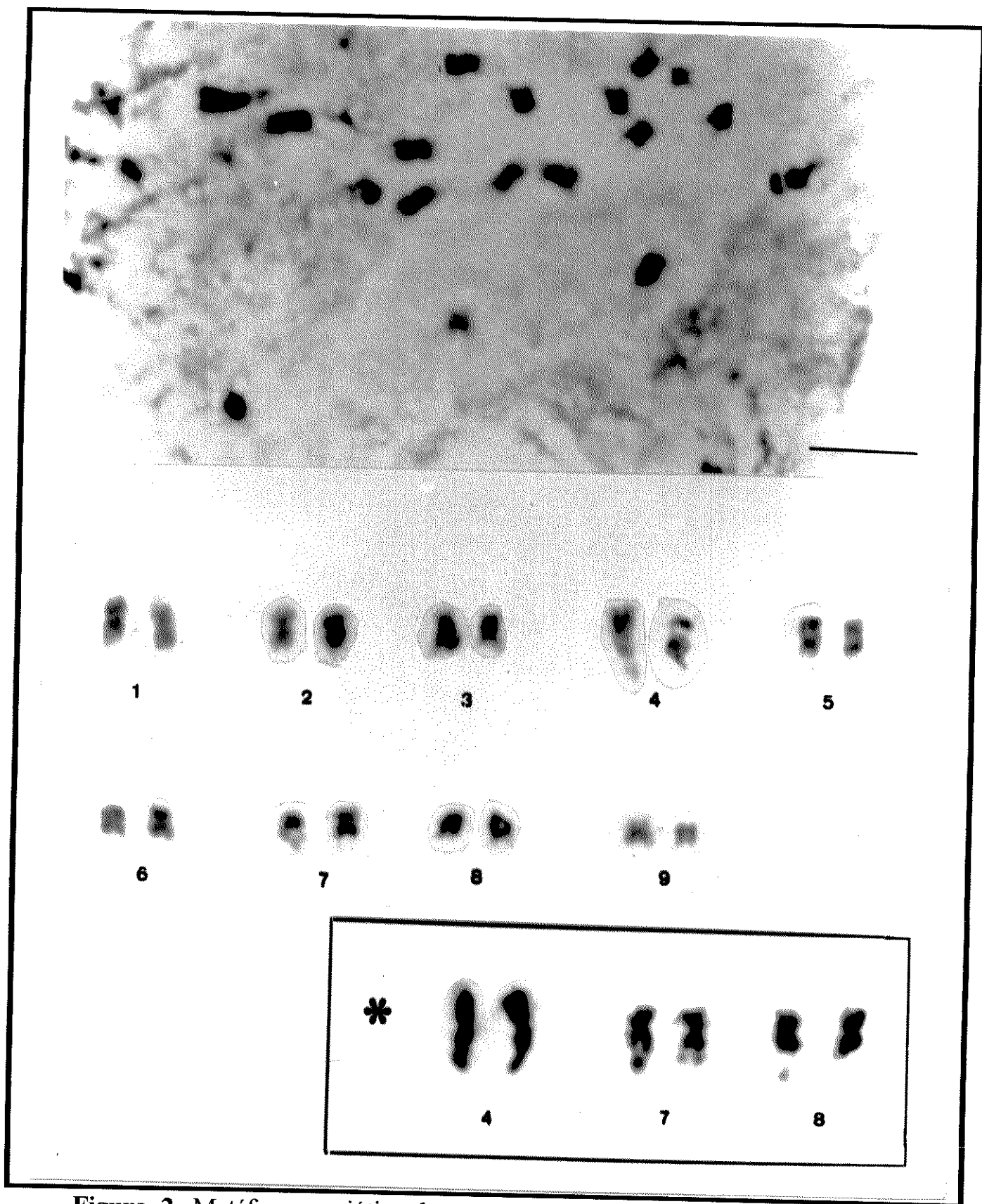


Figura 2. Metáfase e cariótipo dos cromossomos mitóticos de raiz de *Passiflora setacea*, $2n = 18$. (Barra = 5 μm) * Pares de cromossomos com satélite

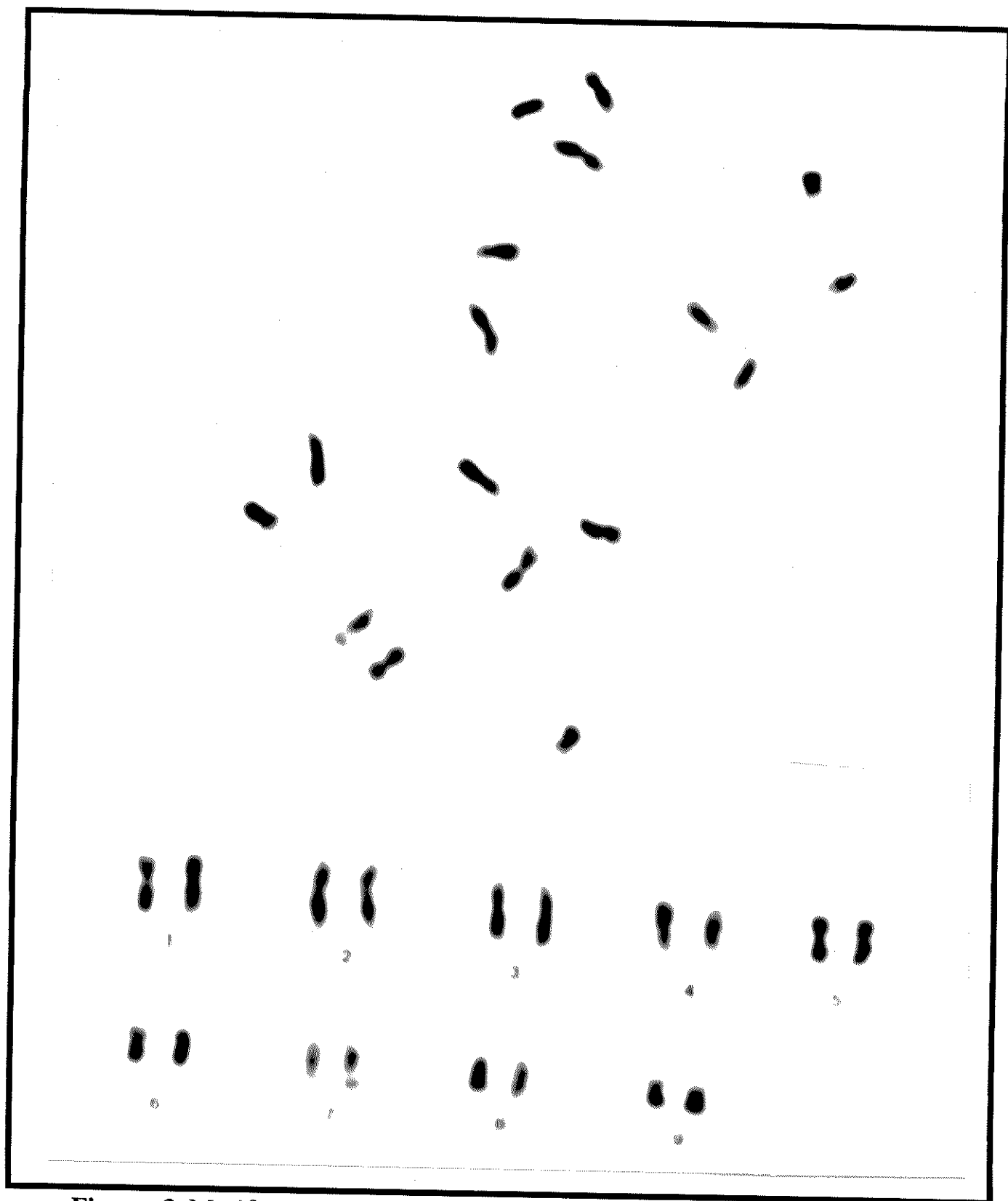


Figura 3. Metáfase e cariótipo dos cromossomos mitóticos de raiz de *Passiflora incarnata*, $2n = 18$. (Barra = 5 μm) .

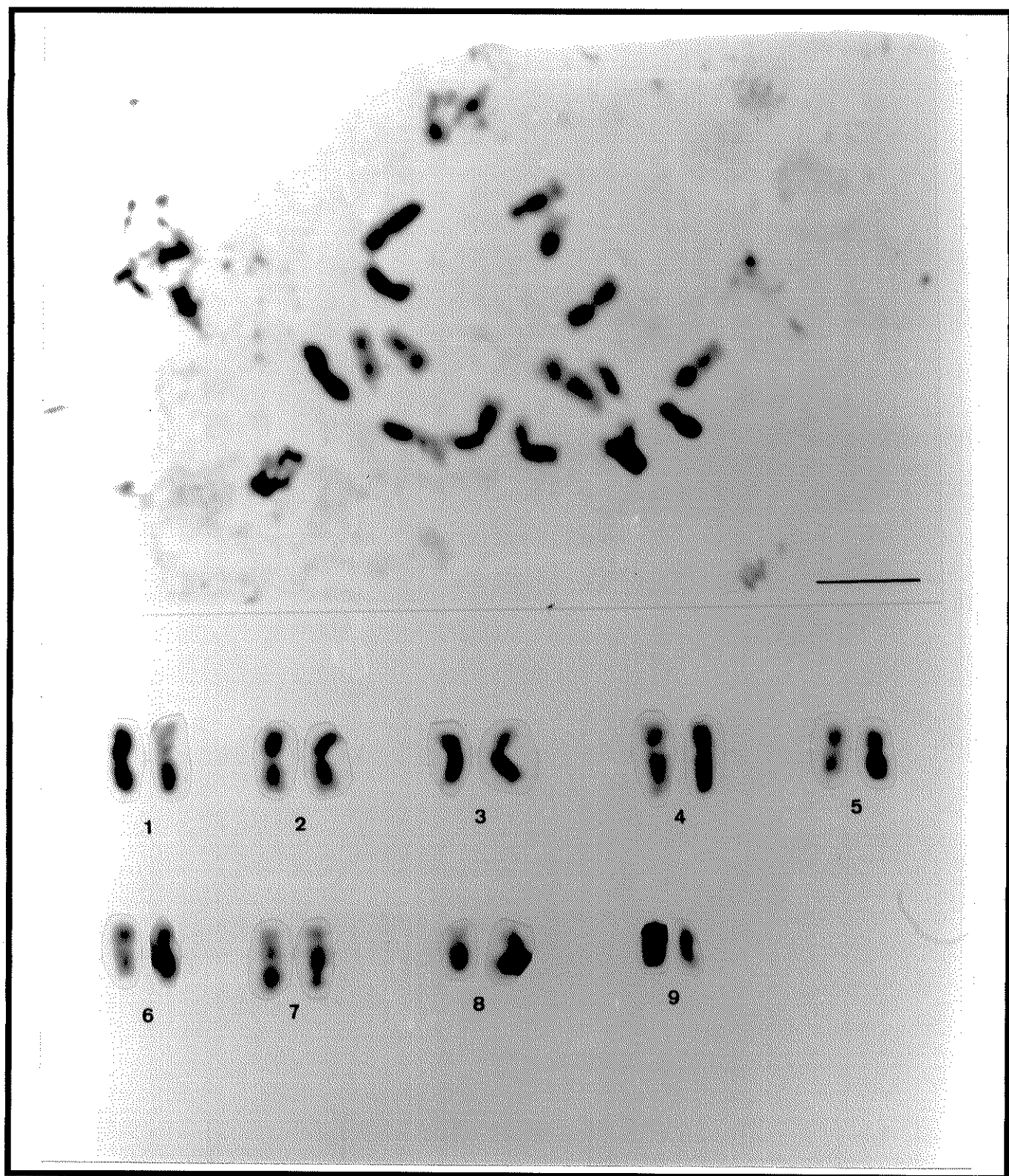


Figura 4. Metáfase e cariótipo dos cromossomos mitóticos de raiz do híbrido sexual *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* X *Passiflora setacea*, $2n = 18$ (Barra = 5 μm)

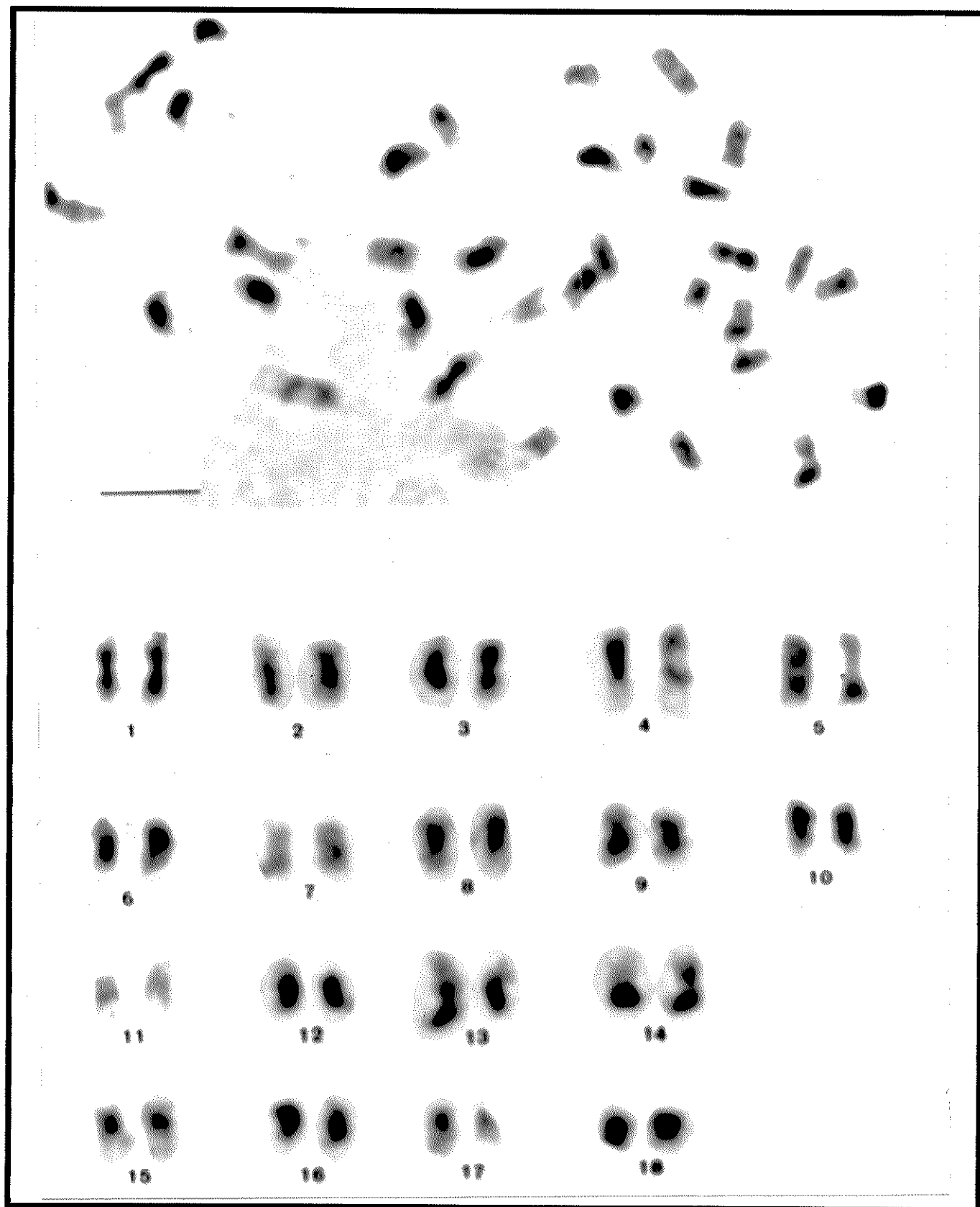
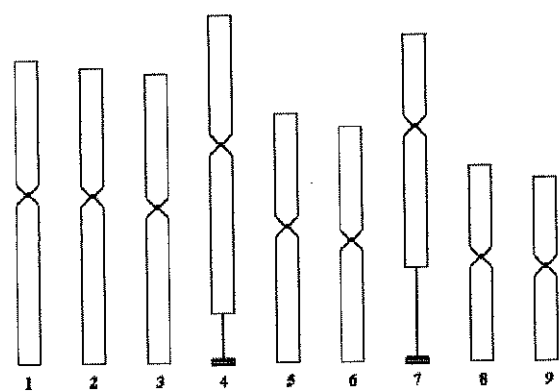
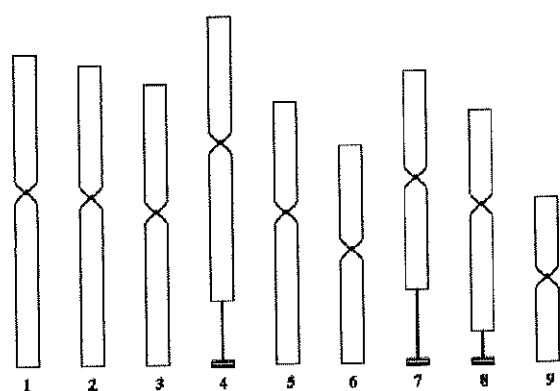


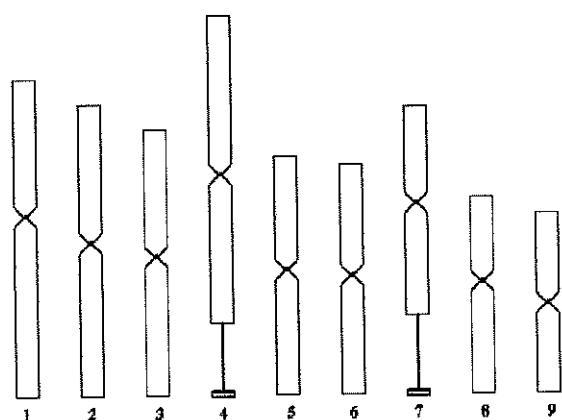
Figura 5. Metáfase e cariótipo dos cromossomos mitóticos de raiz do híbrido somático *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* + *Passiflora incarnata*, $2n = 36$. (Barra = 5μ)



A

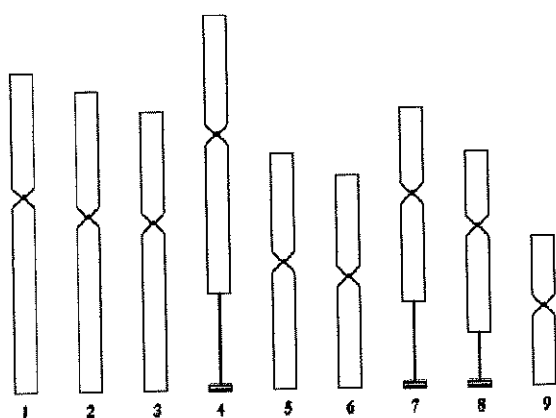


B

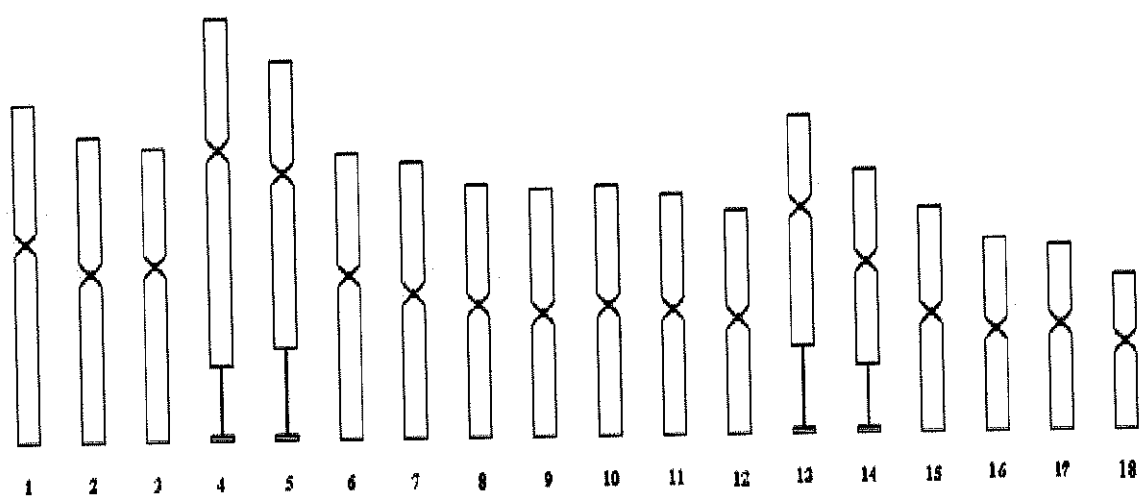


C

Figura 6. Ideograma representando os cromossomos de *Passiflora edulis f. flavicarpa* (A), *Passiflora setacea* (B), *Passiflora incarnata* (C).



D



E

Figura 7. Ideograma representando os cromossomos de *Passiflora edulis f. flavicarpa* X *Passiflora setacea* (D), *Passiflora edulis f. flavicarpa* + *Passiflora incarnata* (E).

Tabela 10. Configurações cromossômicas em MI e segregação cromossômica em AI no híbrido somático *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata*.

Estágio Meiose	Associação Cromossômica	Nº de células observadas	%
MI	18 II	9	9
	17 II + 2 I	8	8
	16 II + 1 multivalente	11	11
	15 II + 1 multivalente	6	6
	14 II + 1 multivalente	15	15
	13 II + 4 I + multiv.	5	5
	13 II + 1 multivalente	10	10
	12 II + 2 I + 2multiv.	8	8
	10 II + 1 multivalente	11	11
	9 II + 2 I + 1multiv.	9	9
	8 II + 2 multivalente	8	8
	TOTAL	100	100%
AI	18 : 17	8	20
	18 : 19	12	35
	16 : 15	8	20
	14 : 12	12	35
	TOTAL	40	100%

* MI = metáfase I, AI = anáfase I, I = monovalente, II = bivalente

Tabela 11. Frequência das configurações cromossômicas em MI e segregação cromossômica em AI no híbrido sexual *P. edulis f. flavicarpa* X *P. setacea*.

Estágio Meiose	Associação Cromossômica	Nº de células observadas	%
MI	9II	29	29
	8II	13	13
	7II + 1 multivalente	32	32
	6II + 1 multivalente	19	19
	5II + 1 multivalente	7	7
	TOTAL	100	100%
AI	9 : 9	22	27,50
	9 : 8	30	37,50
	9 : 7	9	11,25
	9 : 6	5	6,25
	8 : 10	6	7,50
	8 : 7	8	10,00
	TOTAL	80	100,00%

* MI = metáfase I, AI = anáfase I, I = monovalente, II = bivalente.

Tabela 12. Frequência de micrósporo por microsporócitos em anteras do híbrido somático *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata*.

Estágio Meiose	Nº de micrósporos por microsporócito	Nº de células observadas	%
Tétrade	7	20	12,50
	6	36	22,50
	5	64	40,00
	4	40	25,00
TOTAL		160	100,00 %

Tabela 13. Frequência de micronúcleo por microsporo em anteras do híbrido somático *P. edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata*.

Estágio Meiose	Nº de micronúcleos por microsporo	Nº de células observadas	%
Tétrade	0	10	15,00
	1	70	46,66
	2	60	40,00
	3	10	15,00
TOTAL		150	100 %

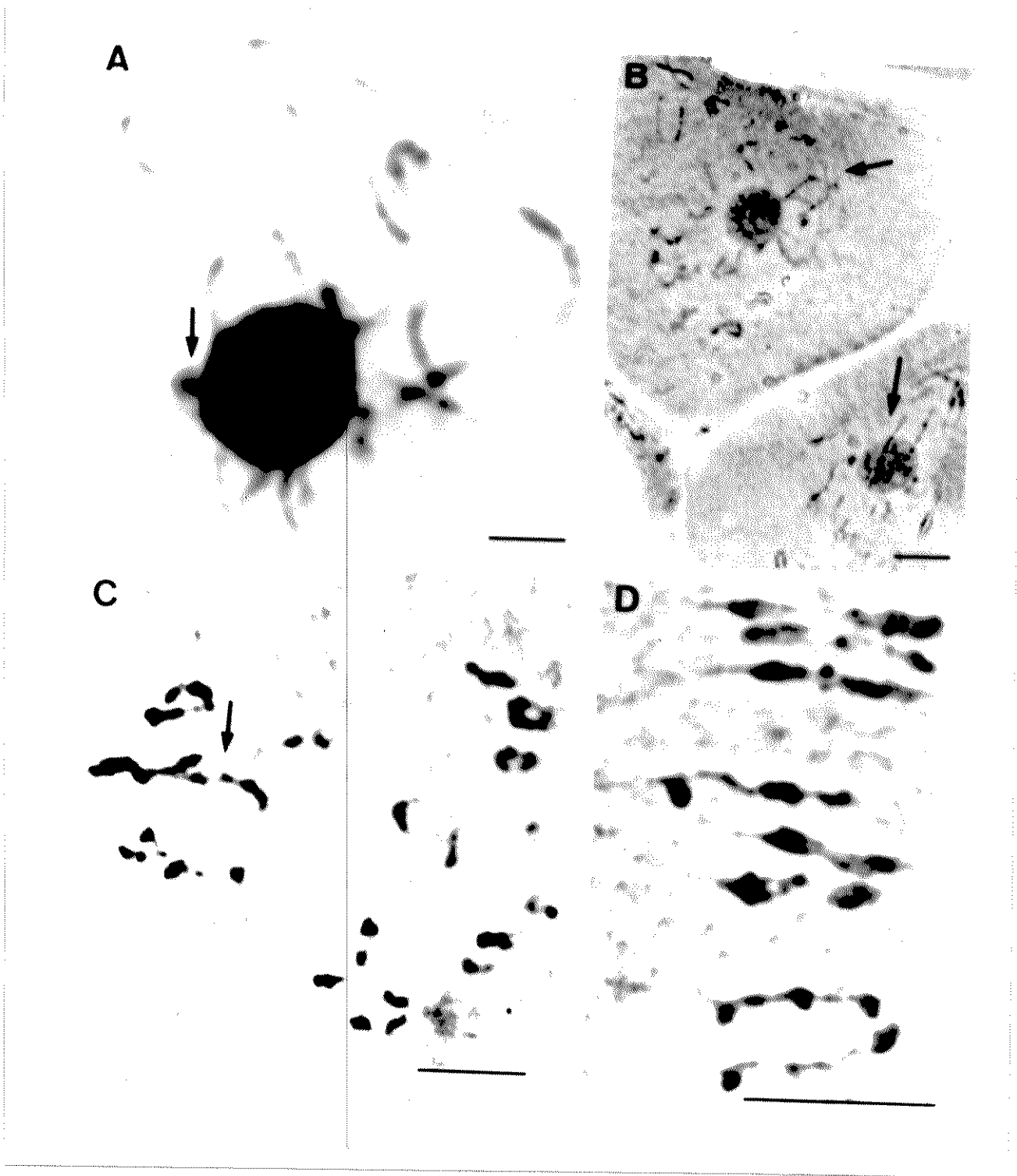


Figura 8. : Híbrido somático *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* + *Passiflora incarnata*.
A. Paquíteno com dois núcleos, seta indica núcleo condensado. **B.** Diplóteno com multivalentes (seta). **C.** Metáfase I com tri e tetravalente, (seta) **D.** Metáfase I com 8 bivalentes. (Barra = 10 μ m).

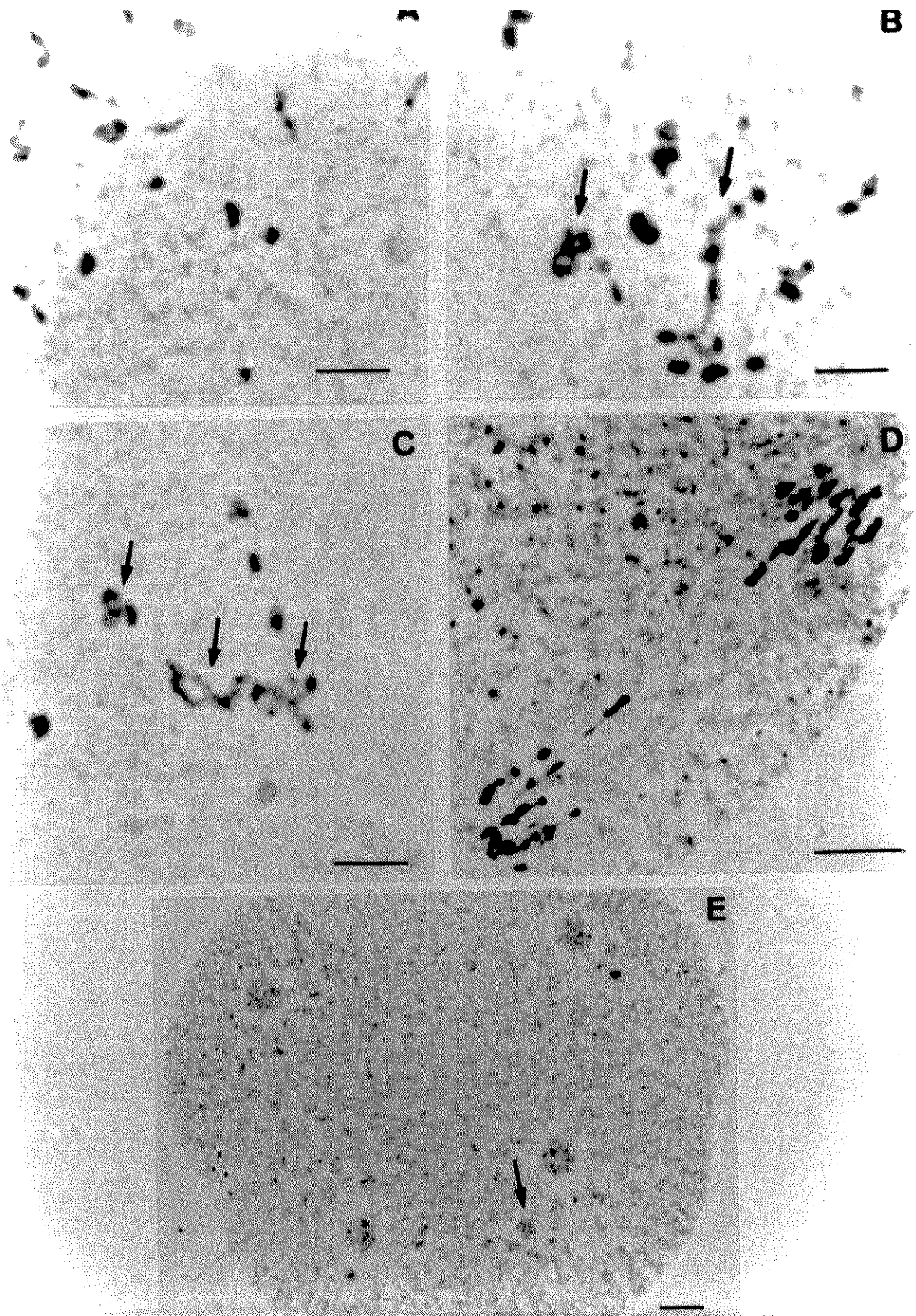


Figura 9. Híbrido somático *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* + *Passiflora incarnata*.
A. Metáfase I com 15 II + multivalente. **B.** Metáfase I com 12 II + 2 I + 2 Multivalentes (seta) **C.** Metáfase I com 5 II + 3 multivalentes (seta). **D.** Anáfase II com cromossomo retardatário. **E.** Telófase II com 1 micronúcleo (seta). (Barra = 10 μ m).

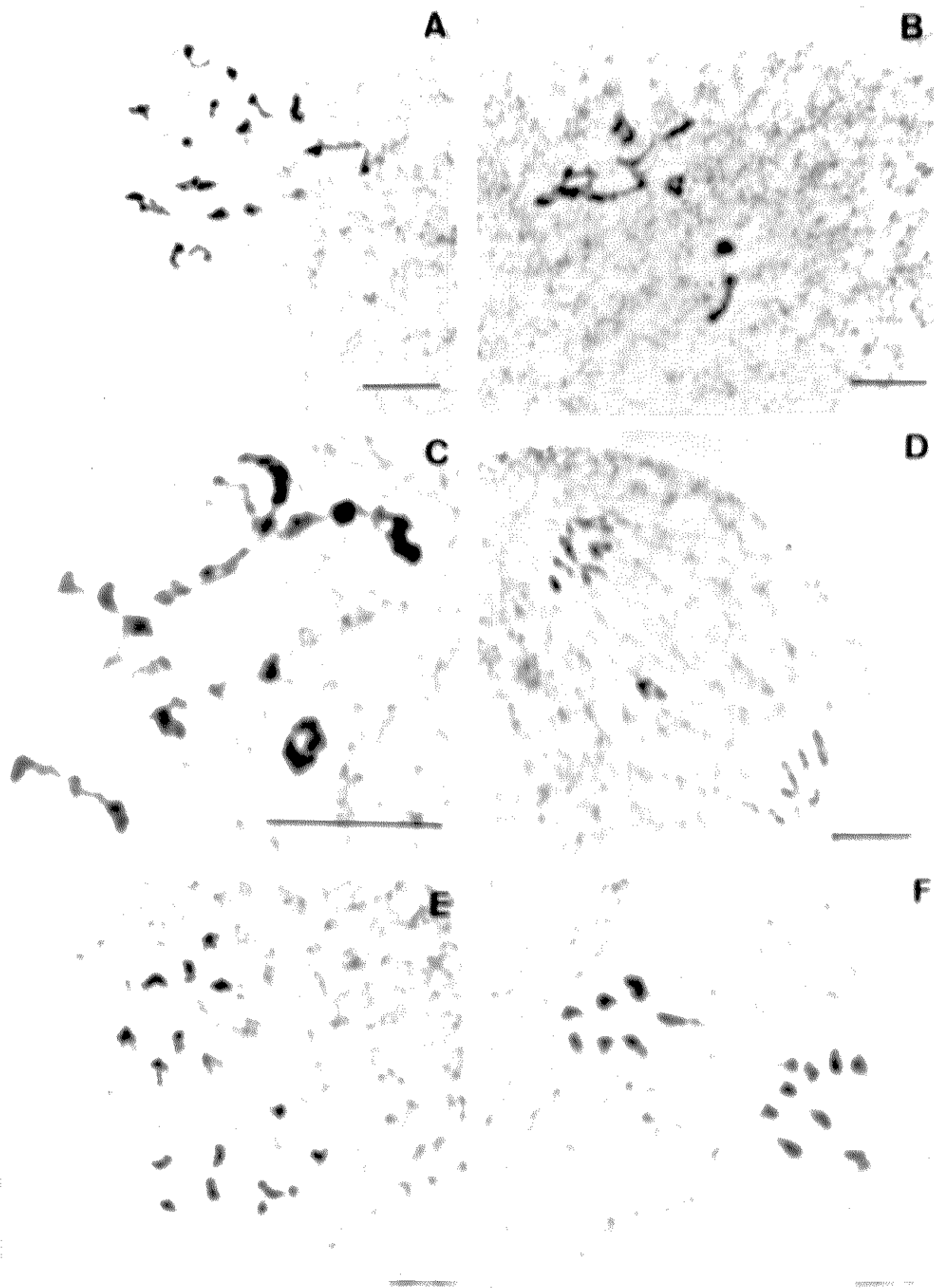


Figura 10. Híbrido sexual *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* X *Passiflora setacea*.
A. Metáfase I com 9 II. **B.** Metáfase I com 5II + 1 multivalente. **C.** Metáfase I com 4II + 1 multivalente. **D.** Anáfase com cromossomos retardatários. **E.** Anáfase I com 8 e 9 cromossomos em cada polo. **F.** Anáfase I com 7 e 9 cromossomos. (Barra = 10 μ m).

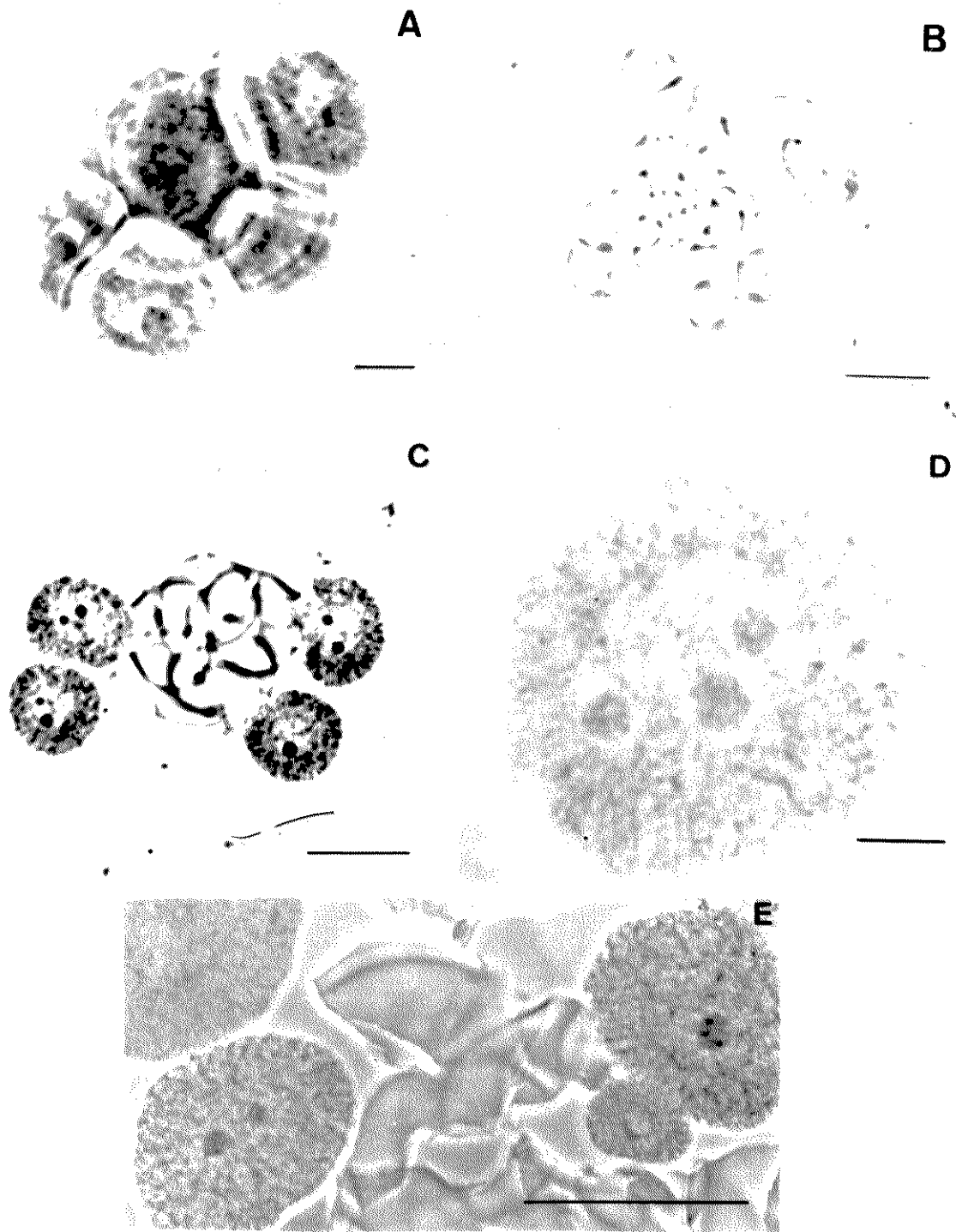


Figura 11. Híbrido somático (fase de tétrade) **A.** Microsporócito íntegro com 6 Micrósporos (hexade). **B.** Microsporócito rompido (hexade). **C.** Número de micronúcleos variáveis em cada micrósporo . **D.** micrósporo com 3 micronúcleos. **E.** Variação no tamanho de cada micrósporo na tétrade (Barra = $10\mu\text{m}$ em **A** e **D** ; = $50\mu\text{m}$ em **B**, **C** e **E**).

Tabela 14 . Viabilidade de pólen (segundo Alexander, 1980)

Espécies e Híbridos	COLETA *		
	I (Nov Dez 94)	II (Abr 95)	III (Nov 95)
<i>P. ed. flavicarpa</i>	95,00%	91,80%	96,20%
<i>P. incarnata</i>	55,00%	70,50%**	85,30%**
<i>P. setacea</i>	78,50%	81,30%	84,00%
<i>edulis</i> x <i>setacea</i>	90,00%	64,00%	43,30%
<i>edulis</i> + <i>incarnata</i>	36,7%	38,80%	36,10%

* Nas coletas I e II foram contados 8.000 pólenes; na coleta III, 5.000 pólenes.

** Espécie replantada em dezembro de 1994.

Tabela 15 . Diâmetro dos pólen (em μm)

Espécies	Viáveis		Inviáveis		
	G	M	G	M	P
<i>P. ed. f. flavicarpa</i>	60,30	—	48,47	—	—
<i>P. incarnata</i>	67,18	—	47,80	—	—
<i>P. setacea</i>	68,14	—	59,50	—	—
<i>P.ed. flav. + P. inc.</i>	59,42	44,42	50,20	40,44	24,76
<i>P. ed. flav. X P. set.</i>	62,54	—	59,50	—	—

G = grande, M = médio, P = pequeno

Tabela 16. Frequência de tipos de pólen contados, em câmara de Neubauer, no híbrido somático *P. edulis f. flavicarpa* + *P. incarnata* *

Parâmetros	VG	VM	IG	IM	IP	Total Geral de Pólen
Nº Pólen	87.905	118.550	64.809	189.886	106.350	567.500
Viabilidade Média	15,49%	20,89%	11,42%	33,46%	18,74%	100%

* VG = Viáveis Grandes ; VM = Viáveis Médios; IG = Inviáveis Grandes ;
IM = Inviáveis Médios ; IP = Inviáveis Pequenos.

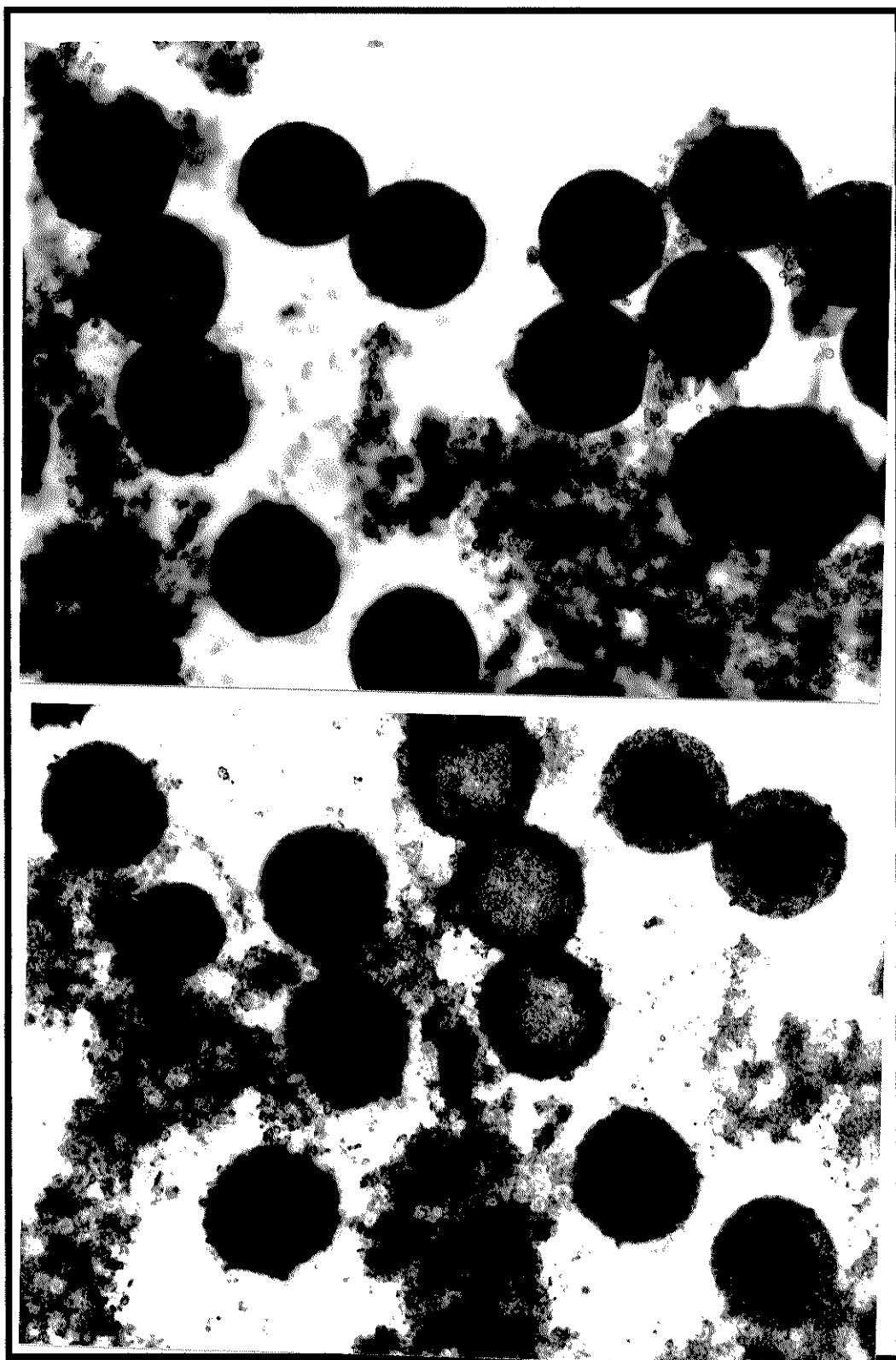


Figura 12. Pólen viáveis (vermelhos) e inviáveis (verdes) de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* , corados segundo técnica de Alexander (1980).
(Barra = 100 μ m)

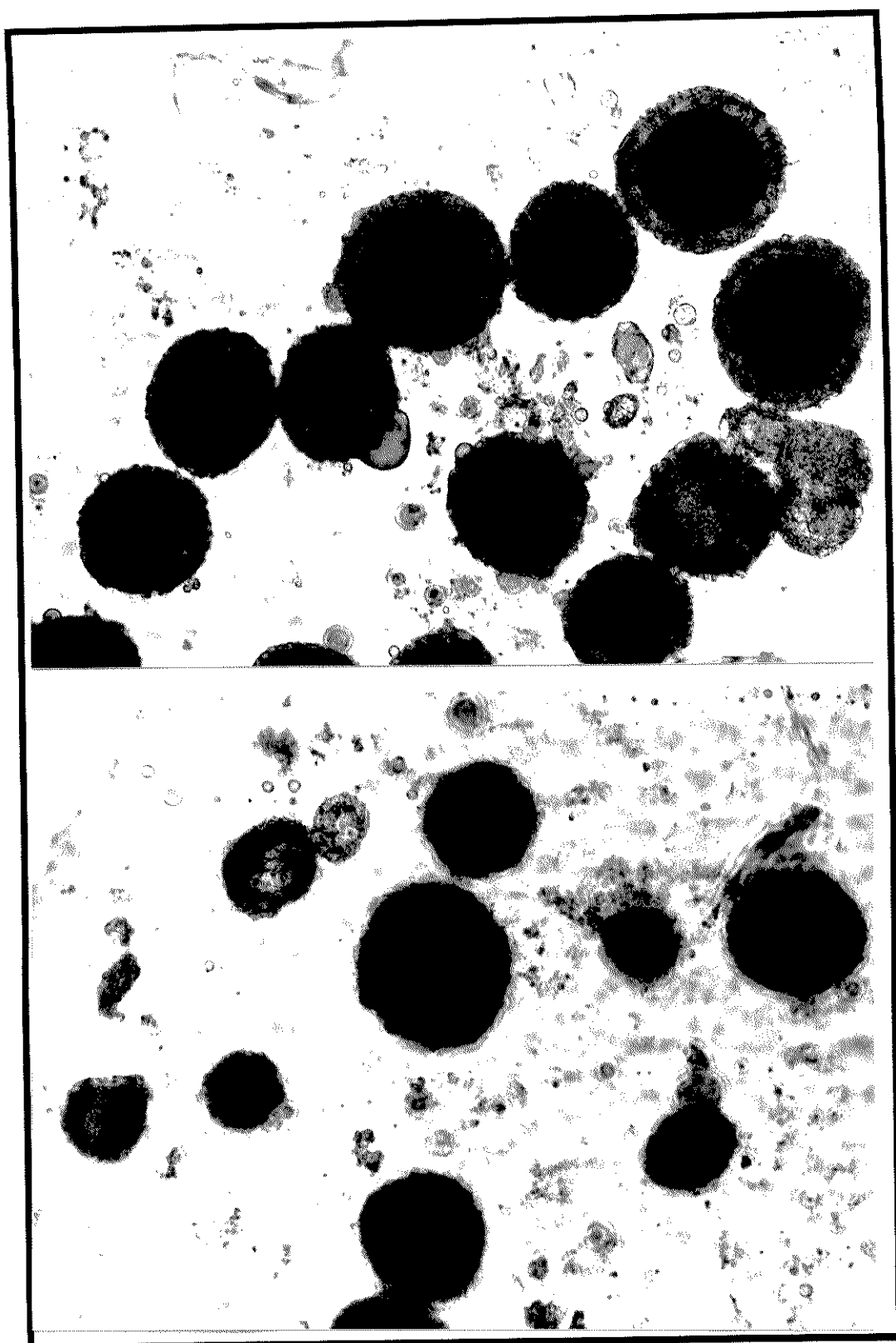


Figura 13. Pólens viáveis (vermelhos) e inviáveis (verdes) de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* + *P. icarnata* (híbrido somático), pólenes com diferentes tamanhos, corados segundo método de Alexander (1980).
(Barra = 100 μ m)

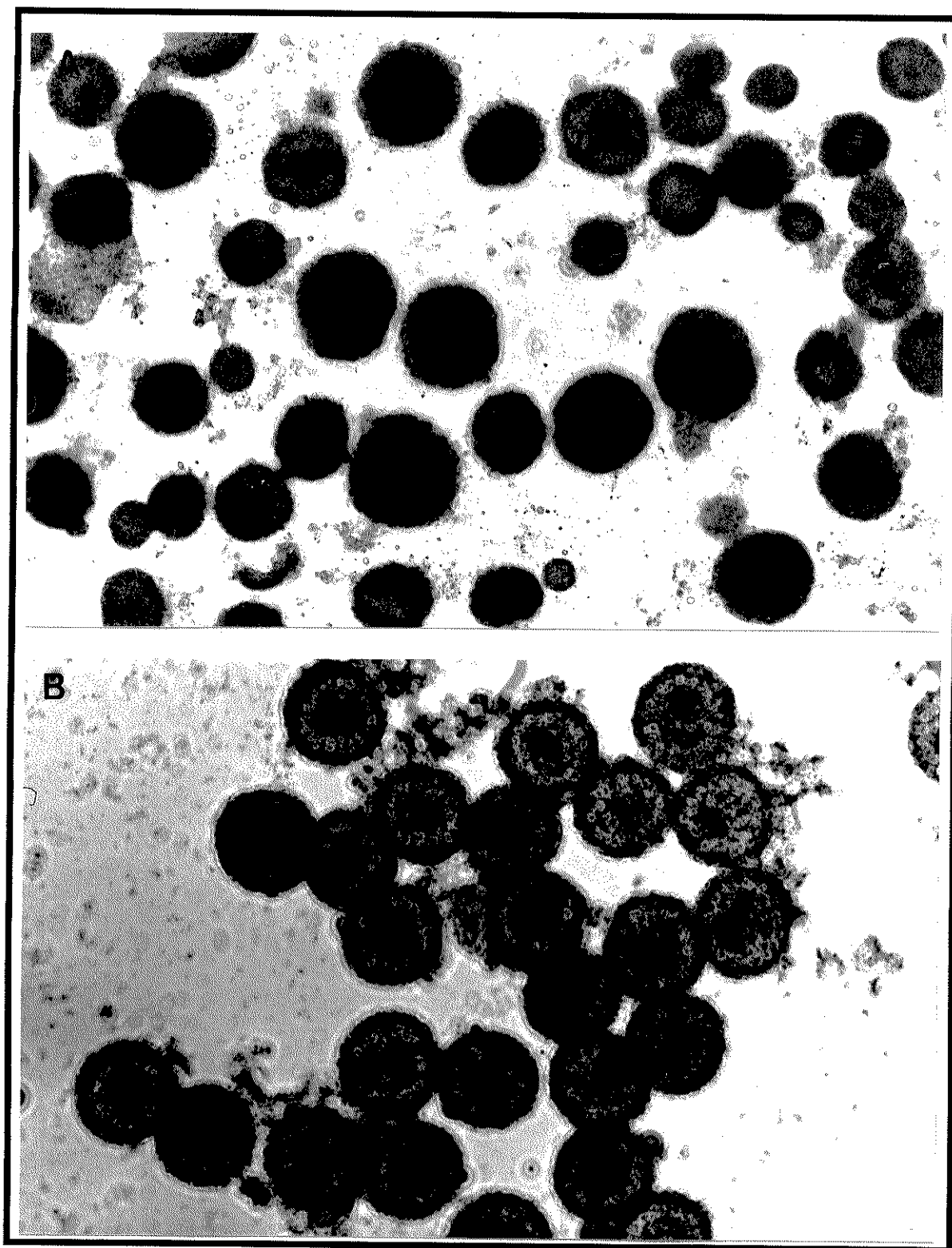


Figura 14. Pólen viáveis (vermelhos) e inviáveis (verdes) corados segundo método de Alexander (1980) **A.** *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata* (híbrido somático) ; pólen com diferentes tamanhos ; **B.** *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* X *P. setacea* (híbrido sexual) sem dimorfismo no tamanho de pólen. (Barra = 100 μ m)

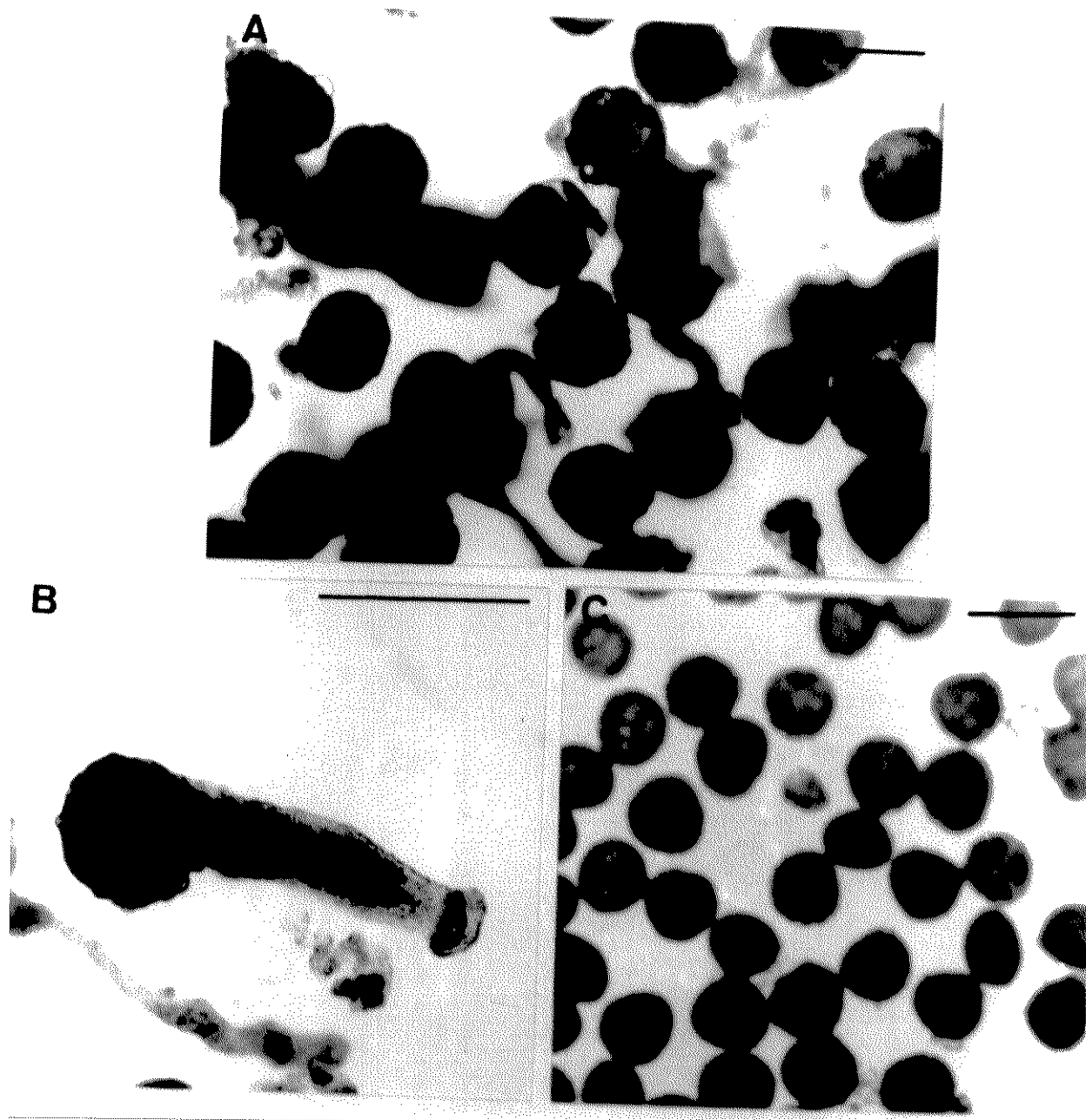


Figura 15. Teste de germinação de pólen em meio líquido.

A. Placa controle com pólen de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* com alta frequência de germinação de tubos polínicos; B. Emissão de tubos polínicos no híbrido sexual *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* X *Passiflora setacea*; C. Híbrido somático com emissão de tubos polínicos praticamente ausente.

(Barra = 100 μ m)

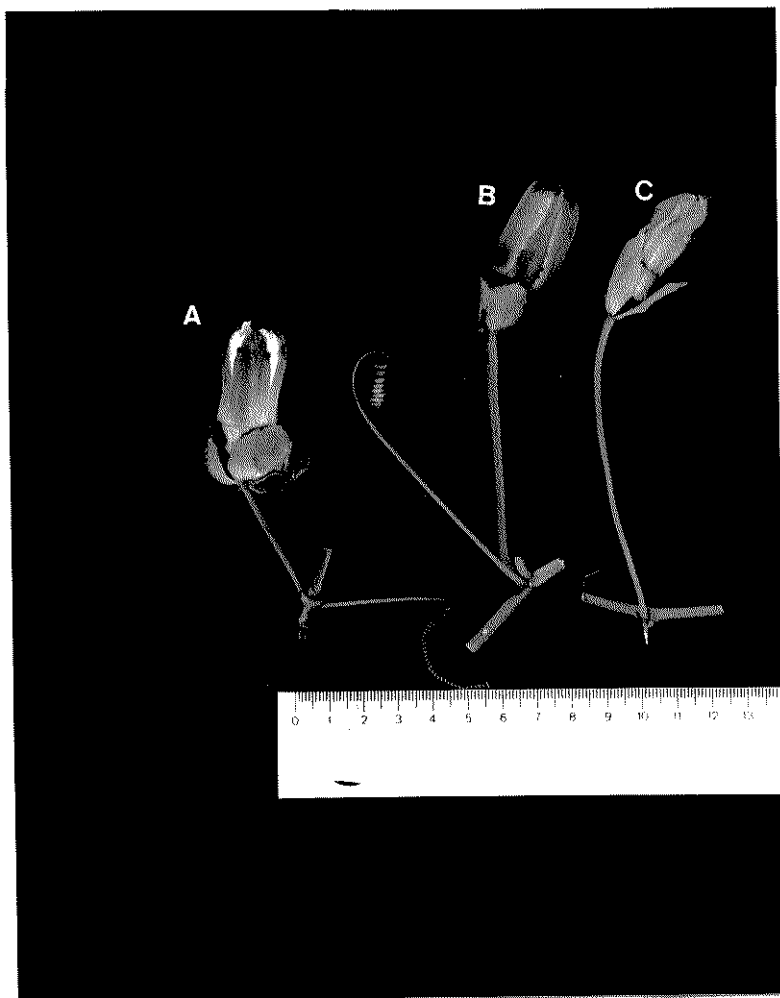


Figura 16. Dimorfismo no pedúnculo de botões florais entre a espécie *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (a) e os híbridos, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* + *P. incarnata* (b) e *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* X *P. setacea* (c).



Figura 17. Flores das espécies progenitoras *P. incarnata* (A), *P. edulis* f. *flavicarpa* (B) e *P. setacea* (C).



Figura 18. Flores do híbrido sexual *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* X *Passiflora setacea*.

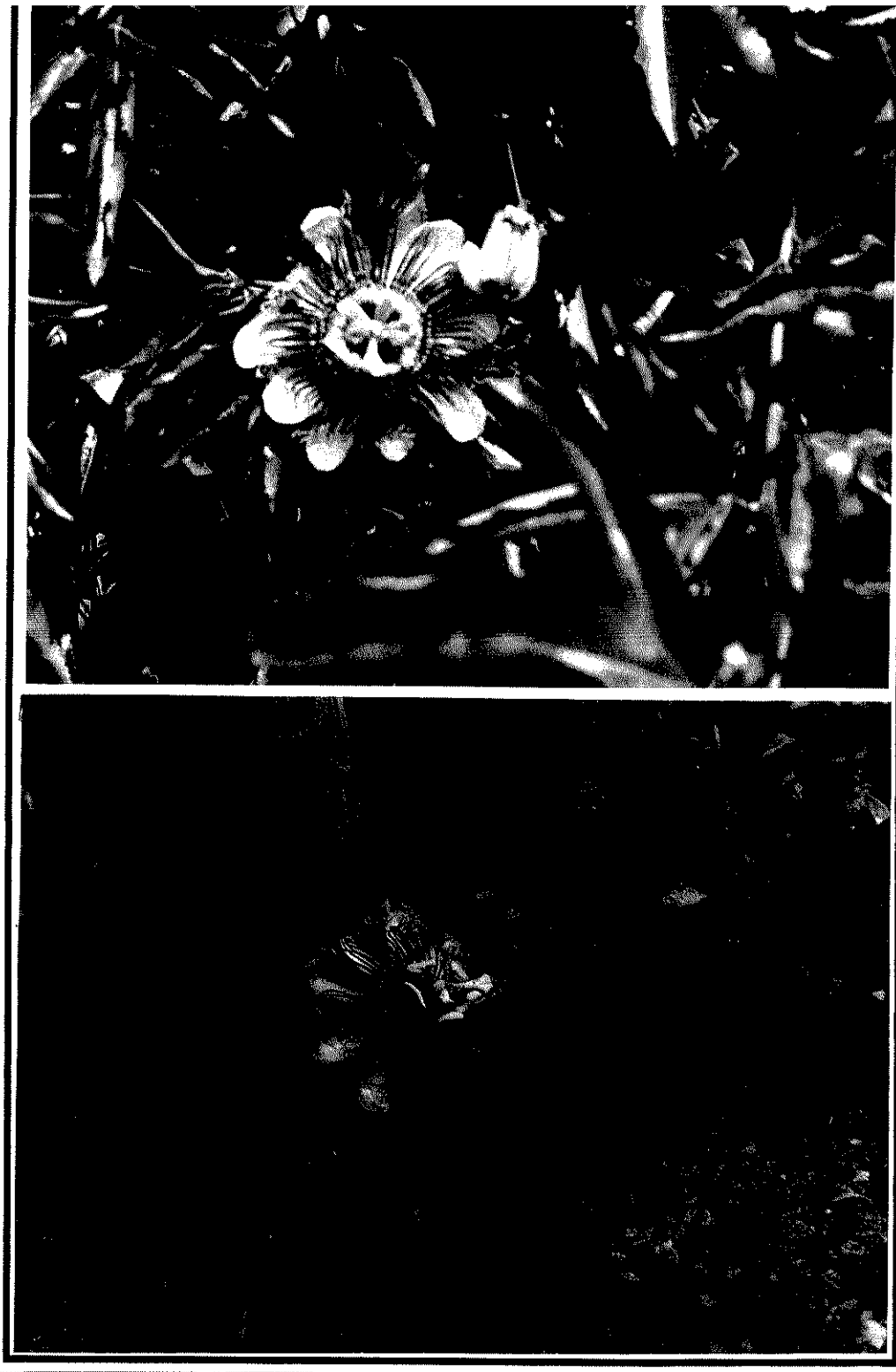


Figura 19. Flores do híbrido somático *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* + *Passiflora incarnata*.

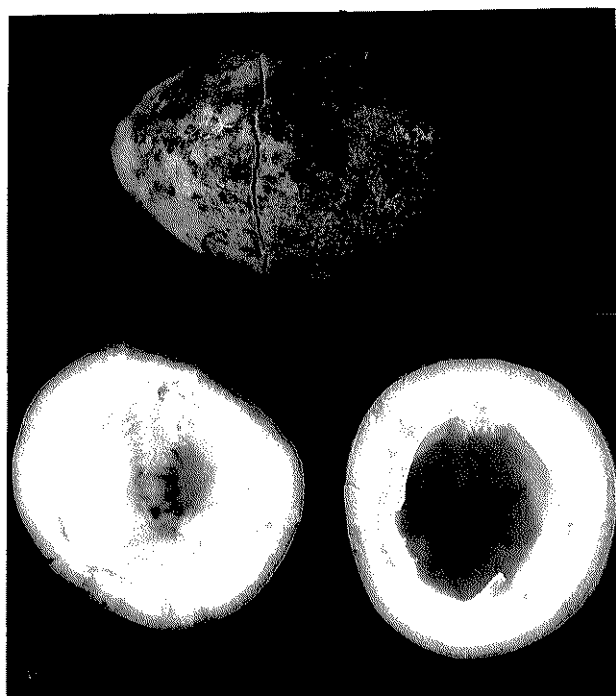


Figura 20. Fruto sem sementes produzido pelo híbrido sexual
Passiflora edulis f. *flavicarpa* X *P. setacea*.