

WELLINGTON DOS SANTOS SOARES

ESTUDO CITOGENÉTICO, MOLECULAR E ANATÔMICO EM GENITORES
E HÍBRIDOS DE *PASSIFLORA* SPP.

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Melhoramento, para obtenção do título de

**ESTUDO CITOGENÉTICO, MOLECULAR E ANATÔMICO EM GENITORES E
HÍBRIDOS DE *PASSIFLORA* SPP.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Claudio Horst Bruckner

Coorientadores: Carlos Eduardo Magalhães Santos
Wagner Campos Otoni

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

Soares, Wellington dos Santos. 1990.
Estudo citogenético, molecular e anatômico em genitores e
híbridos de *Passiflora* spp. Wellington dos Santos Soares.
Viçosa, MG, 2019.
88 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Claudio Horst Bruckner.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Biblioteca Central.

Orientador:
()
I. Híbridos. I. Citogenética. I. Anatomia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Pós-graduação em Genética e Melhoramento.
II. Tese.

**VIÇOSA- MINAS GERAIS
2019**

RESUMO

SOARES, Wellington dos Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2019. **Estudo citogenético, molecular e anatômico em genitores e híbridos de *Passiflora* spp.** Orientador: Cláudio Horst Bruckner. Coorientadores: Carlos Eduardo Magalhães dos Santos e Wagner Campos Otoni.

A ampla variabilidade de *Passiflora* no Brasil é algo que vem sendo cada vez mais explorado, uma vez que várias espécies silvestres possuem alelos de interesse ao melhoramento. Estes são responsáveis por características como longevidade, adaptação às condições climáticas adversas, período de florescimento ampliado, maior concentração de componentes químicos de interesse para indústria farmacêutica e cosmética e resistência a doenças. Assim, o melhoramento do maracujazeiro pode seguir várias vertentes em função da região e da parte da planta a ser considerada. Os caracteres de interesse têm sido transferidos de uma espécie para outra mediante o processo de hibridação por cruzamentos interespecíficos. Todavia, é necessário a confirmação dos híbridos e outros caracteres para conhecer melhor sua constituição genotípica e fenotípica, a fim de que as mesmas possam ser disponibilizadas para uso em programas de melhoramento. Cabe salientar que a obtenção de híbridos via cruzamento nem sempre ocorre, uma vez que espécies mais distantes geneticamente podem não ser compatíveis para o processo de hibridação, dificultando assim a obtenção de híbridos e, posteriormente, ciclos de autofecundação, quando o objetivo do programa de melhoramento for produzir plantas homozigotas. Um modo de se obter plantas homozigotas de modo mais rápido é a utilização do cultivo de anteras, micrósporos e óvulos não fertilizados na cultura de tecidos. Porém, a literatura traz poucas informações acerca desta técnica para o gênero *Passiflora*. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a confirmação de híbridos interespecíficos de *Passiflora* via citogenética molecular, sua caracterização fitoquímica, hormonal e molecular, e a descrição dos processos que ocorrem no processo de indução da embriogênese na cultura de anteras. O material vegetal foi composto por *Passiflora mucronata*, *Passiflora gibertii*, *Passiflora cincinnata*; híbridos H-328, H-103, H-108, H-387, os quais tiveram folhas coletadas para realizar análises de citometria de fluxo e citogenética molecular para confirmação da natureza híbrida, caracterização fitoquímica, hormonal e molecular. Em relação aos processos de indução de embriogênese o material vegetal consistiu em botões florais coletados em pré antese, em plantas adultas de *Passiflora gibertii*, mantida sob polinização aberta. As anteras foram excisadas e

colocadas em meio de cultura com concentrações hormonais adequadas para indução embriogênica. Para análise foram coletados calos embriogênicos com intervalos de 5 dias no total de 45 dias, sendo fixados, cortados e corados para análise anatômica estrutural e histoquímica. Para evidenciar a ploidia dos calos, amostras também foram submetidas a análise de citometria de fluxo. Em relação a confirmação de hibridação, confirmado os genitores interespecíficos *P. gibertii* x *P. mucronata* e *P. gibertii* x *P. cincinnata* para o híbridos analisados; os cromossomos metacêntrico e submetacêntrico foram conservados nos híbridos, o que deduz compatibilidade para cruzamentos entre as espécies; e a técnica de GISH inferiu a origem dos cromossomos de cada parental nos híbridos, assim como a possível combinação de DNA, pressupondo uma mescla de caracteres. Os resultados também apontaram que as espécies genitoras e seus híbridos apresentam uma gama de compostos polifenólicos do grupo de flavonoides glicosilados. As poliaminas e níveis de expressão de microRNAs não apresentaram diferenças significativas entre genitores e híbridos testados; os flavonoides obtidos neste estudo podem ser objetivos de estudos futuros relacionados a farmacologia. Sobre o protocolo avaliado para indução de embriões a partir de anteras, estes foram gerados no cultivo de anteras de *P. gibertii*. As avaliações citológicas demonstraram eventos ocorrentes durante o processo embriogênico em anteras, que ainda não tinham sido relatadas para o gênero *Passiflora*, até o presente momento, ampliando o conhecimento das camadas celulares e teciduais envolvidas nos eventos morfogênicos que levam à regeneração e podem contribuir positivamente para aumentar a eficiência da técnica, para diferentes espécies de *Passiflora*.

Palavras-chaves: Híbridos interespecíficos. GISH/ FISH. Fitoquímica. Androgênese.

ABSTRACT

SOARES, Wellington dos Santos, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2019.
Cytogenetic, molecular and anatomical study in *Passiflora* spp parents and hybrids.
Adviser: Cláudio Horst Bruckner. Co-advisers: Carlos Eduardo Magalhães dos Santos and Wagner Campos Otoni.

The wide variability of *Passiflora* in Brazil is being increasingly explored, as many wild species have alleles of interest for breeding, and are responsible for characteristics such as longevity, adaptation to adverse weather conditions, extended flowering period, longer concentration of chemical components of interest to the pharmaceutical and cosmetic industry and disease resistance. Thus, passion fruit breeding can follow several aspects depending on the region and the part of the plant to be considered. The characters of interest have been transferred from one species to another by the hybridization process by interspecific crosses. However, confirmation of hybrids and other characters is necessary to better understand their genotypic and phenotypic constitution so that they can be made available for use in breeding programs. It is noteworthy that obtaining hybrids via crossbreeding does not always occur easily, since more genetically distant species may not be compatible for the hybridization process, thus making it difficult to obtain hybrids and subsequently self-fertilization cycles, when the objective of the program improvement to produce homozygous plants. One way to obtain homozygous plants more quickly is to use the cultivation of anther, microspore and unfertilized eggs in tissue culture. However, the literature brings little information about this technique to the genus *Passiflora*. In this context the objective of this work was the confirmation of *Passiflora* interspecific hybrids via molecular cytogenetics, their phytochemical, hormonal and molecular characterization, and the description of the processes that occur in the embryogenesis induction process in anther culture. The plant material was composed of *Passiflora mucronata*, *Passiflora gibertii*, *Passiflora cincinnata*; H-328, H-103, H-108, H-387 hybrids, which had leaves collected to perform flow cytometry and molecular cytogenetics analyzes to confirm the hybrid nature, phytochemical, hormonal and molecular characterization. Regarding embryogenesis induction processes, the plant material consisted of flower buds collected pre-anthesis in adult plants of *Passiflora gibertii*, kept under open pollination. The anthers were excised and placed in culture medium with adequate hormone concentrations for embryogenic induction. For analysis, calluses were collected at intervals of 5 days totaling 35 days, being fixed, cut and stained

for structural and histochemical anatomical analysis. To evidence callus ploidy, samples were also submitted to flow cytometry analysis. Regarding the confirmation of hybridization, the interspecific parents *P. gibertii* x *P. mucronata* and *P. gibertii* x *P. cincinnata* were confirmed for the analyzed hybrids; metacentric and subcentric karyotypes were conserved in hybrids, which shows compatibility for crosses between species; and the GISH technique inferred the origin of each parent's chromosomes in the hybrids, as well as the possible combination of DNA, assuming a mixture of characters. The results also pointed out that the parent species and their hybrids have a range of polyphenolic compounds from the glycosylated flavonoid group. Polyamines and microRNA expression levels did not show significant differences between tested parents and hybrids; the flavonoids obtained in this study may be objectives of future studies related to pharmacology. Regarding the protocol evaluated for induction of embryos from anthers, these were generated in the culture of *P. gibertii* anthers. Cytological evaluations have shown events occurring during the embryogenic process in anthers, which had not yet been performed for the genus *Passiflora*, to date, expanding the knowledge of the cell and tissue layers involved in morphogenic events that lead to regeneration and may contribute positively to increase the efficiency of the technique for different species of *Passiflora*.

Keywords: Interspecific hybrids. GISH / FISH. Phytochemistry. Androgenesis.

RESUMOS	35
CAPÍTULO II	39
Aspectos anômicos, fitoquímicos, hormonais e perfil de expressão de microRNAs em híbridos e genitores de <i>Passiflora</i> spp.	39
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1. Material vegetal	42
2.2. Quantificação hormonal e fitoquímica	42
2.3. Extração de RNA, síntese de cDNA stem-loop pulsed e RT-qPCR	43
2.4. Anomia foliar	43
3. RESULTADOS	44
4. DISCUSSÃO	53
5. CONCLUSÃO	57
6. REFERÊNCIAS	57
CAPÍTULO III	64
Cultura de anteras em <i>Passiflora gibertii</i> N.E. Brown: ontogênese dos esboços embriogênicos, citometria de fluxo e caracterização dos perfis hormonais e de flavonóides	64