



Análisis colorimétrico en flores de especies e híbridos de *Passiflora*

Bugallo, V.* , Pannunzio, M. J., Facciuto, G.

*Instituto de Floricultura, INTA. Nicolás Repetto (ex Las Cabañas) y De Los Reseros S/N, (1686) Hurlingham, Buenos Aires, Argentina. bugallo.veronica@inta.gov.ar

Recibido: 13/12/2016

Aceptado: 03/08/2017

RESUMEN

Bugallo, V., Pannunzio, M. J., Facciuto, G. 2017. Análisis colorimétrico en flores de especies e híbridos de *Passiflora*. Horticultura Argentina 36 (90): 5 - 12.

El color de las flores es el resultado de complejas rutas metabólicas reguladas genéticamente y representa una característica relevante en el mejoramiento de plantas ornamentales. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar el color de flor en especies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* para evaluar la posible herencia del carácter. Para ello se analizaron 5 especies y 5 cruzamientos con *P. amethystina*. Se empleó un colorímetro Minolta CR-321 para tomar valores de color en las flores (escala CIELab). Se estimaron los componentes colorimétricos a partir de la medición en tres pétalos por flor y en tres flores por genotipo, analizando los datos por ANOVA contrastados por test BSS. Los resultados en las flores de las especies mostraron que el valor L (luminosidad del color), fue estadísticamente menor en *P. amethystina* (40,23) y mayor en *P. elegans* (90,79), lo cual indicaría que la primera posee el matiz más intenso y la última el más claro. Tanto en la escala a verde-rojo

como en la b (azul-amarillo), *P. caerulea* (a=-10,69 y b=24,69) y *P. amethystina* (a=33,21 y b=-33,33) se posicionaron en los extremos opuestos. Los híbridos entre *P. amethystina* y las otras cuatro especies, presentaron valores colorimétricos intermedios a los de sus parentales, excepto *P. amethystina* x *P. elegans*. En los híbridos de éste cruzamiento los valores de luminosidad (L=39,7) y la escala verde-rojo (a=34,1) fueron estadísticamente similares a los de *P. amethystina*. Los resultados sugerirían una herencia cuantitativa del carácter con interacción genética entre las especies parentales, alterando la expresión en híbridos. El color de las flores en *P. amethystina* sería el resultado de la combinación de la tonalidad del contenido vacuolar y de la cantidad de células coloreadas intercaladas con las que reservan sustancias incoloras, pero también existiría un aporte de plástidos con clorofila en el citoplasma de las células epidérmicas de los pétalos.

Palabras claves adicionales: Híbridos interespecíficos, color de flor, escala CIELab.

ABSTRACT

Bugallo, V., Pannunzio, M. J., Facciuto, G. 2017. Colorimetric analysis in flowers of species and hybrids of *Passiflora*. Horticulture Argentina 36 (90): 5 - 12.

The color of the flowers is the result of complex metabolic pathways genetically regulated and represents a relevant feature in breeding ornamental plants. The aim of this work is to study flower color in *Passiflora* species and to compare them with interspecific hybrids values to evaluate the inheritance of this character. Five parental species of *Passiflora* and five interspecific hybrids with *P. amethystina* were analyzed. A Minolta CR-321 colorimeter was used to take color values in the flowers (CIELab scale). The colorimetric components were estimated from three petals per flower and three flowers per genotype, analyzing the data by ANOVA and tested by BSS. The results on the flowers of the species showed that the L value (color luminosity) was statistically lower in *P. amethystina* (40.23) and higher in *P. elegans* (90.79), this would indicate that the former possesses the most intense and the latter, the lightest. In both, a-scale

(green-red) and b-scale (blue-yellow), *P. caerulea* (a = -10.69 and b = 24.69) and *P. amethystina* (a = 33.21 and b = -33.33) were positioned at opposite ends. Hybrids between *P. amethystina* and the other four species presented intermediate colorimetric values to those of their parents, except *P. amethystina* x *P. elegans*. In the hybrids of this cross, the luminosity values (L = 39.7) and green-red scale (a = 34.1) were statistically similar to those of *P. amethystina*. The results would suggest a quantitative inheritance of the character with genetic interaction between the parental species, altering the expression in hybrids. The color of the flowers in *P. amethystina* would be the result of the combination of the tonality of the vacuolar content and the number of colored cells interspersed with those that reserve colorless substances, but there would also be a contribution of chlorophyll in the cytoplasm of the epidermal cells of the petals.

Additional keywords: Interspecific hybrids, flower color, CIELab scale.

1. Introducción

El género *Passiflora*, consta de alrededor de 500 especies, entre las cuales 19 son reconocidas como nativas de Argentina (Deginani, 2001). Las especies nativas cuentan con gran variabilidad en los colores de sus flores, diferentes tonalidades de blanco, azul y rojo. Los híbridos interespecíficos amplían el abanico incorporando fucsias, rosados y diferentes tonos de violeta. El color de las flores es el resultado de complejas rutas metabólicas que reflejan la historia evolutiva de un género (Clegg & Durbin, 2000). La intensidad y el patrón de color en los pétalos, son caracteres que contribuyeron a la selección por parte de

los polinizadores y, posiblemente, al aislamiento reproductivo y creación de nuevas especies (Friedman, 2015; Greaves *et al.*, 2015; Horn, 2002). Las antocianinas y sus derivados, responsables de los diferentes colores en las flores, son sintetizadas en el citoplasma de las células por un complejo multi-enzimático anclado al retículo endoplasmático (Chanoca *et al.*, 2015) Una vez formadas, son transportadas y acumuladas en las vacuolas donde expresan su color (van der Kooi *et al.*, 2016; Zhao & Tao, 2015). Diferentes formas en la acumulación de antocianinas han sido descritas: solución coloreada uniforme, cuerpos en forma de vesículas y cuerpos compactos de formas regulares o irregulares. A estas diferentes formas se las agrupa con el nombre de Inclusiones Vacuolares Antociánicas (AVIs: *anthocyanic vacuolar inclusions*) (Chanoca *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2006).

En el marco de un programa de mejoramiento para obtener variedades ornamentales a partir de especies argentinas por hibridación interespecífica, el objetivo de este trabajo fue estudiar el color de las flores en el género. Se seleccionó a *P. amethystina*, la única especie nativa de flores azules y la más prolífica en la hibridación interespecífica, y a los taxones interfértiles con ella para comparar los valores colorimétricos de sus flores con los de los híbridos interespecíficos y evaluar la posible herencia de este carácter. Además, se planteó el estudio del sitio de acumulación subcelular de pigmento que da como resultado el color de los pétalos en este género.

2. Materiales y Métodos

Se analizaron colorimétricamente las flores de 12 genotipos de 6 taxones de *Passiflora* usados como parentales (1 *P. amethystina*, 3 *P. caerulea*, 1 *P. edulis f. edulis*, 2 *P. edulis f. flavicarpa*, 3 *P. elegans* y 2 *P. mooreana*) y 19 híbridos interespecíficos correspondientes a 6 cruzamientos de *P. amethystina* con las otras especies (5 *P. amethystina* x *P. caerulea*, 1 *P. amethystina* x *P. edulis f. edulis*, 1 *P. amethystina* x *P. edulis f. flavicarpa*, 10 *P. amethystina* x *P. elegans* y 2 *P. amethystina* x *P. mooreana*). Las flores fueron recolectadas en antesis, en horas de la mañana. Cabe destacar que, dado que las flores de éstas especies duran sólo un día, este estudio se realizó con flores de 1-4 horas de su momento de apertura. Se tomaron valores del color en la parte central y en la cara adaxial de pétalos de flores con un colorímetro Minolta CR-321 que registra datos en la escala CIELab (L = luminosidad, -a/+a = escala de verde a rojo, -b/+b escala de azul a amarillo). Cada genotipo se evaluó en tres pétalos al azar de cada flor y en tres flores de cada genotipo. Los datos se analizaron estadísticamente por medio de ANOVA con contraste por test BSS utilizando el programa estadístico InfoStat (versión 2009, Universidad Nacional de Córdoba) (Di Rienzo *et al.*, 2010).

Para estudiar el sitio celular donde se aloja el pigmento, se realizó una disección de la epidermis adaxial de los pétalos de *P. amethystina* cortando la superficie de los mismos con un bisturí y extrayendo la capa superior con una pinza (*peeling*). La muestra se montó en

agua destilada en un portaobjeto, se observó bajo microscopio Olympus BX 50 con campo claro y con fluorescencia y se fotografió con cámara digital Olympus C-5060. Todo el material vegetal analizado pertenece a la colección *in vivo* del Instituto de Floricultura del INTA.

3. Resultados y discusión

Los resultados del análisis colorimétrico reflejan la variabilidad fenotípica en el color de flor en los diferentes genotipos de especies e híbridos (Figura 1).



Figura 1: Fenotipos florales de especies e híbridos interespecíficos de *Passiflora*.

a-f: especies, **g-r:** híbridos interespecíficos. **a:** *P. amethystina*, **b:** *P. caerulea*, **c:** *P. edulis f. edulis*, **d:** *P. edulis f. flavicarpa*, **e:** *P. elegans*, **f:** *P. mooreana*, **g-j:** *P. amethystina* x *P. caerulea*, **k:** *P. amethystina* x *P. edulis f. edulis*, **l:** *P. amethystina* x *P. edulis f. flavicarpa*, **m-p:** *P. amethystina* x *P. elegans*, **q-r:** *P. amethystina* x *P. mooreana*.

En los estudios por especie, la luminosidad del color de los pétalos (L) fue significativamente menor en *P. amethystina* (40,23) que en las otras especies y mayor en *P. elegans* (90,79). Estos valores estarían expresando que la primera posee un color menos luminoso y la última el más claro. Tanto en la escala a (verde-rojo) como en la b (azul-amarillo), *P. caerulea* (a=-10,69 y b=24,69) y *P. amethystina* (a=33,21 y b=-33,33) se posicionaron en los extremos opuestos. Los valores colorimétricos en los híbridos interespecíficos fueron intermedios a los de sus parentales, excepto en la progenie de los cruzamientos *P. amethystina* x *P. elegans* donde se hallaron valores de luminosidad (L=39,7) y en la escala del verde al rojo (a=34,1), estadísticamente similares a los de *P. amethystina* (Tabla 1).

Tabla 1: Evaluación del color de flores en especies e híbridos interespecíficos de *Passiflora*. Escala colorimétrica CIELab: L = luminosidad, -a/+a = de verde a rojo, -b/+b de azul a amarillo. Letras distintas indican diferencias significativas en la media de cada variable.

	n	L				a				b				
<i>P. amethystina</i>	9	A								G	A			
		40,23								33,21	-33,39			
<i>P. amethystina</i> x <i>P. elegans</i>	90	A								G	B			
		39,7								34,10	-29,10			
<i>P. amethystina</i> x <i>P. edulis flavicarpa</i>	9	B								F	C			
		45,21								29,10	-16,47			
<i>P. amethystina</i> x <i>P. mooreana</i>	18	B								E	B			
		49,93								23,78	-27,65			
<i>P. amethystina</i> x <i>P. caerulea</i>	45	C								D	C			
		61,33								16,06	-17,46			
<i>P. amethystina</i> x <i>P. edulis edulis</i>	9	C								D	C			
		63,20								15,46	-15,00			
<i>P. caerulea</i>	27	D				A								F
		81,35				-10,69								24,69
<i>P. edulis flavicarpa</i>	18	D				B								E
		82,40				-4,85								15,42
<i>P. edulis edulis</i>	9	D				A								F
		84,02				-9,78								22,05
<i>P. mooreana</i>	18	D				A								F
		84,29				-8,98								23,14
<i>P. elegans</i>	27	E				C						D		
		90,79				-1,5						6,21		

Los resultados obtenidos responderían a herencia cuantitativa y sugerirían la existencia de una interacción genética entre las especies parentales que alteraría la expresión de este carácter en sus híbridos. Las interacciones genéticas pueden ocurrir entre diferentes alelos del mismo gen (dominancia) o entre distintos genes (epistasia) y pueden ser detectadas como una desviación del valor fenotípico en el híbrido respecto de los expresados por los parentales (Mackay, 2014; Tornielli *et al.*, 2009; Phillips, 2008). A pesar de la simplicidad con la que se puede revelar la ocurrencia de interacciones genéticas, conocer el origen de la variación cuantitativa es uno de los mayores retos de la biología contemporánea (Mackay, 2014). Si bien *P. amethystina* presentó los menores valores de luminosidad entre los genotipos estudiados, el color expresado en su fenotipo no presentó el menor matiz posible para esa tonalidad. En la epidermis adaxial de *P. amethystina*, se pudo observar bajo microscopio óptico, que las células con vacuolas coloreadas están intercaladas con otras que contienen sustancias incoloras (Figura 2 a y b).

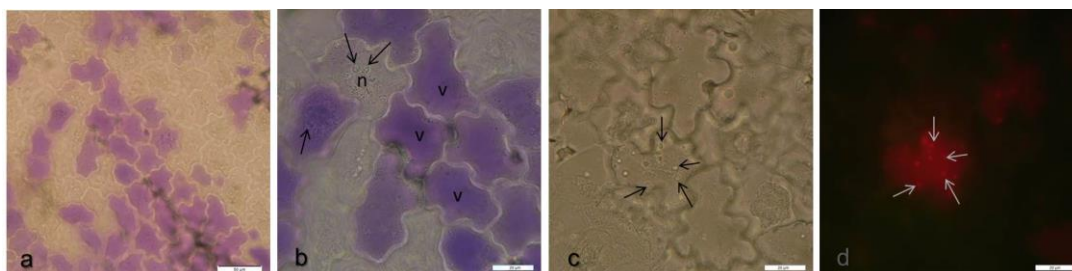


Figura 2: Microscopía de la epidermis adaxial de los pétalos de flores de *Passiflora amethystina*. **a y b:** microscopía de campo claro de células con vacuolas coloreadas e incoloras; **c:** sector de la epidermis con vacuolas incoloras, las flechas muestran inclusiones vacuolares antocianínicas de forma irregular; **d:** microscopía fluorescente de la misma célula que en **c**, en rojo, cloroplastos emitiendo auto-fluorescencia de la clorofila (flechas). n = núcleo; v = vacuola Barra en **a** = 50 μ m, en **b**, **c** y **d** = 20 μ m.

El color de flor en esta especie se debería a las sustancias acumuladas en las vacuolas de las células y a inclusiones vacuolares antociánicas de formas irregulares (Figura 2 b). Varios géneros que presentan pétalos blancos con sectores pigmentados han sido estudiados, entre ellas *Ipomoea*, *Petunia*, *Eustoma* y *Antirrhinum* (Chanoca *et al*, 2015; Passeri *et al.*, 2016; Quattrocchio *et al.*, 2006; Quattrocchio *et al.*,1999; Schwinn *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006). En *Petunia* y *Antirrhinum*, la explicación a éste fenómeno fue atribuida a factores de transcripción (proteínas MYB) involucrados, tanto en la síntesis de antocianinas, como en la acidificación de las vacuolas (Quattrocchio *et al.*, 2006; Quattrocchio *et al.*,1999). En *Ipomoea*, las diferencias se atribuyeron a la inserción de transposones que causaban la disrupción de genes pertenecientes a la ruta metabólica de las antocianinas (Tiffin *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta que uno de los factores que causa la activación de elementos genómicos móviles es la hibridación interespecífica (Friedman, 2015; Greaves *et al.*, 2015; McClintock, 1984), la coloración en los híbridos *P. amethystina* x *P. elegans* también fue afectada por este fenómeno. Se detectaron plástidos en las células incoloras de la epidermis del pétalo de *P. amethystina* con auto-fluorescencia en rojo lo que sugiere la presencia de clorofila. Estos plástidos serían el factor contribuyente a la reducción en el valor colorimétrico a (Figura 2 c y d).

4. Conclusiones

Se encontraron variaciones en el color de las flores de especies e híbridos interespecíficos de *Passiflora* en los tres componentes colorimétricos estudiados. *Passiflora amethystina* y los híbridos *P. amethystina* x *P. elegans* mostraron un matiz del color más intenso, diferenciándose de los otros taxones analizados. En los híbridos, los valores colorimétricos fueron intermedios a los de su parentales excepto en los híbridos de *P. amethystina* x *P. elegans* donde se hallaron valores estadísticamente similares a los de *P. amethystina*. Los resultados obtenidos indicarían que el color de flor en *Passiflora* responde a herencia cuantitativa y se sugiere la existencia de interacción genética entre las especies *P. amethystina* y *P. elegans* que afectaría el color de flor en los híbridos. El color de las flores en *P. amethystina* se ubica físicamente en las vacuolas de las células epidérmicas con presencia de inclusiones vacuolares antociánicas irregulares. El componente colorimétrico que expresa la luminosidad del color (L), estaría dado por el tono del contenido vacuolar y por las células que reservan sustancias incoloras que se encuentran intercaladas con las coloreadas, mientras que el componente a, tendría aporte de plástidos con clorofila en el citoplasma de las células epidérmicas de los pétalos.

Si bien a partir de análisis colorimétricos e histológicos sencillos se pudieron elaborar varias hipótesis para explicar la diferencia en colores y patrones de pigmentación en las flores de *Passiflora*, es necesario profundizar en estudios moleculares, histológicos, bioquímicos y citogenéticos para dar respuesta certera a estos interrogantes.

5. Referencias bibliográficas

- Chanoca, A; Kovinich, N; Burkel, B; Stecha, S; Bohorquez-Restrepo, A; Ueda, T; Eliceiri, KW; Grotewold, E; Otegui, M. 2015. Anthocyanin vacuolar inclusions form by a microautophagy mechanism. *The plant cell*, 27(9): 2545-2559.
- Clegg, M.T; Durbin, M.L. 2000. Flower color variation: a model for the experimental study of evolution. *PNAS*, 97(13):7016-7023.
- Deginani, N. 2001. Las especies argentinas del género *Passiflora*. *Darwiniana* 39(1-2): 43-129.
- Di Rienzo, J. A; Casanoves, F; Balzarini, M. G; González, L; Tablada, M.; Robledo, C.W. 2010. InfoStat versión 2009. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Friedman, E. 2015. Consequences of hybridization and heterozygosity on plant vigor and phenotypic stability. *Plant Science*, 232:35-40.
- Greaves, I.K; González-Bayon, R; Wang, L; Zhu, A; Liu, P; Groszmann, M; Peacock, W.J.; Dennis, E.S. 2015. Epigenetic changes in hybrids. *Plant Physiology*, 168: 1197-1205.
- Horn, W. 2002. Chapter: Breeding methods and breeding research, in: *Breeding for ornamentals: Classical and molecular approaches*. Kluwer Academic Publishers, 47-83.
- Mackay, T. F. C. 2014. Epistasis and quantitative traits: using model organisms to study gene-gene interactions. *Nature Reviews Genetics*, 15(1): 22-23.
- McClintock, B. 1984. The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226, 792-801.
- Passeri, V; Koes, R; Quattrocchio, F. M. 2016. New challenges for the design of high value plant products: stabilization of anthocyanins in plant vacuoles. *Frontiers in plant science*, 7.
- Phillips, P.C. 2008. Epistasis- the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nature reviews Genetics*, 9 (11): 855-867.
- Quattrocchio, F; Verweij, W; Kroon, A; Spelt, C; Mol, J; Koes, R. 2006. PH4 of *Petunia* is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *The plant cell*, 18(5): 1274-1291.
- Quattrocchio, F.; Wing, J.; van der Woude, K.; Souer, E.; de Vetten, N.; Mol, J.; Koes, R. 1999. Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of *Petunia* and its role in the evolution of flower color. *The plant cell*, 11: 1433-1444.
- Schwinn, K; Venail, J; Shang, Y. J; Mackay, S; Alm, V; Butelli, E; Oyama, R; Bailey, P; Davies, K; Martin, C. 2006. A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *Plant Cell*, 18: 831-851.
- Tiffin, P; Miller, R. E; Rausher, M. D. 1998. Control of expression patterns of anthocyanin structural genes by two loci in the common morning glory. *Genes Genet. Syst.*, 73 (1):105-110.
- Tornielli, G; Koes, R.E; Quattrocchio, F. 2009. The genetics of flower color. Chapter 13 in: Gerats, T; Strommer, J. *Petunia*. Springer Science, 269-299.

Van der Kooi, C.J; Elzenga, J.T.M; Staal, M; Stavenga, D.G. 2016. How to colour a flower: on the optical principles of flower coloration. Proc. R. Soc. B 283: 20160429.

Zhang, H; Wang, L; Deroles, S; Bennett, R; Davies, K. 2006. New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. BioMed Central Plant Biology, 6:29.

Zhao, D; Tao, J. 2015. Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants. Frontiers in plant science, 6: 261.