

BARRERAS DE AISLAMIENTO REPRODUCTIVO E HIBRIDACIÓN INTERESPECÍFICA EN EL MEJORAMIENTO DE *PASSIFLORA* EN LA ARGENTINA

Verónica Bugallo^{1,2}, Gabriela Facciuto²

¹Universidad de Buenos Aires, Argentina (UBA), Facultad de Agronomía, Cátedra de Genética. Argentina

² Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Floricultura. Argentina

¹Autor para correspondencia: bugallo.veronica@inta.gob.ar

RESUMEN

Por más de 10 años, el Instituto de Floricultura del INTA (IF) ha trabajado en el mejoramiento genético del género *Passiflora* para la obtención de variedades ornamentales. En el proceso, diversos estudios fueron enriqueciendo el conocimiento sobre las especies nativas de Argentina involucradas y diversos aspectos relacionados con su genética, biología reproductiva y características fenotípicas particulares. En este capítulo se abordan los estudios que exponen barreras de aislamiento reproductivo pre-polinización entre especies que ocurren en la naturaleza, como diferencias en las características florales que determinan la polinización por diferentes agentes, el aislamiento fenológico y eco-geográfico. También se profundiza en los mecanismos que ocurren con posterioridad a la polinización, ya sean pre-cigóticos, que interrumpen el crecimiento del tubo polínico; como post-cigóticos, que involucran diferencias citogenéticas en los parentales que provocan esterilidad en los híbridos, así como la incompatibilidad embrión-endosperma que impide la nutrición del embrión en las semillas. Cada una de estas barreras fue abordada por el mejoramiento genético en el camino a la obtención de variedades ornamentales.

Palabras clave: *Passiflora*, biología reproductiva, hibridación interespecífica, mejoramiento genético.

ABSTRACT

For more than 10 years, the Institute of Floriculture (IF) has worked on breeding in the *Passiflora* genus to obtain ornamental varieties. In the process, various studies were enriching the knowledge about the native Argentinean species and various aspects related to their genetics, reproductive biology, and particular phenotypic characteristics. In this chapter, studies that expose pre-pollination reproductive isolation barriers between species that occur in nature, such as differences in floral characteristics that determine pollination by different agents, phenological and eco-geographic isolation, are addressed. It also delves into the mechanisms that occur after pollination, whether they are pre-zygotic, which interrupt the growth of the

pollen tube; as post-zygotic, involving cytogenetic differences in the parents that cause sterility in the hybrids, as well as the embryo-endosperm incompatibility that prevents the nutrition of the embryo in the seeds. Each of these barriers was addressed by genetic improvement on the way to obtaining ornamental varieties.

Keywords: *Passiflora*, reproductive biology, interspecific hybridization, breeding.

Mejoramiento genético de especies nativas de *Passiflora* en el Instituto de Floricultura (IF) en Argentina

Por muchos años, los recursos genéticos sudamericanos han sido explotados por empresas extranjeras para la obtención de variedades ornamentales sin ninguna retribución a los países de origen (Facciuto *et al.*, 2019). A partir del Convenio de Diversidad Biológica y el Protocolo de Nagoya, cada país tiene soberanía sobre sus recursos genéticos, por lo cual puede crear sus propias variedades a partir de germoplasma nativo y recibir los beneficios que se generen (Naciones Unidas, 2011).

El género *Passiflora* posee más de 500 especies (MacDougal y Feuillet, 2004) distribuidas en zonas tropicales y subtropicales; en su mayoría se distribuyen en centro y, sobre todo, en Sudamérica (Killip, 1938). Sus flores poseen un aspecto exótico que ha despertado el interés de los coleccionistas europeos durante siglos (Ulmer y MacDougal, 2004). Argentina cuenta con 19 especies nativas de *Passiflora*, distribuidas en 4 subgéneros botánicos (Deginani, 2001).

El mejoramiento en el género *Passiflora* se enmarca en un proyecto que tiene como objetivo la obtención de variedades argentinas a partir de las plantas nativas. La hibridación interespecífica es uno de los métodos más utilizados en la obtención de variabilidad genética para el mejoramiento de plantas ornamentales (van Tuyl y de Jeu, 1997). En este género, la intención del plan de mejoramiento fue obtener variedades con colores de flor llamativos, tolerancia a las temperaturas invernales de Buenos Aires y que proporcionen una alta cobertura en estructuras como alambrados y pérgolas, tanto por su valor ornamental, así como también para potenciales aplicaciones funcionales en paredes verdes.

Durante los 12 años de actividad en el mejoramiento se ha profundizado en distintos aspectos que influyen en el éxito de un programa de hibridación interespecífica. Todos ellos están relacionados con las similitudes y diferencias entre especies y con las barreras reproductivas que influyeron en la historia de especiación en el género. Este capítulo compendia el conocimiento adquirido sobre las características reproductivas de las especies argentinas de *Passiflora* y el abordaje de la hibridación por parte del mejoramiento para la obtención de plantas ornamentales.

Barreras de aislamiento reproductivo pre-polinización

Los fenómenos que ocurren en la naturaleza y que aíslan reproductivamente a dos especies, favoreciendo la especiación puede ocurrir antes o después de la llegada del polen al estigma. Los mecanismos que evitan la polinización tienen que ver con una o varias de tres situaciones: las plantas poseen diferentes polinizadores, por lo cual el polen no es transportado de una hacia la otra; presentan diferencias fenológicas que hacen que la etapa reproductiva ocurra a destiempo; o existe un aislamiento eco-geográfico que previene su convivencia (Baak *et al.*, 2015).

Características florales y especialización de los polinizadores

Las 19 especies argentinas de *Passiflora* están distribuidas en 4 subgéneros (Deginani, 2001). El subgénero *Passiflora* posee 11 especies: *P. alata*, *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. cincinnata*, *P. edulis*, *P. elegans*, *P. giberti*, *P. mooreana*, *P. tenuifila*, *P. palmatisecta* y *P. tucumanensis*. Entre las especies de este subgénero se encuentran los fenotipos de flores más grandes y con colores vivos, como *P. alata*, que posee flores rojas; *P. amethystina*, azules y *P. cincinnata*, púrpura. El subgénero *Decaloba* cuenta con 5 especies: *P. capsularis*, *P. misera*, *P. morifolia*, *P. suberosa* y *P. urnaefolia*. Las especies del subgénero *Decaloba* poseen flores pequeñas de 1 a 3,5 cm de diámetro, *P. suberosa* es apétala mientras que las otras 4 especies poseen pétalos blancos a verdosos. El subgénero *Dysosmia* cuenta con dos especies: *P. foetida* y *P. chrysophylla*, ambas con flores blancas de entre 3 y 5,5 cm de diámetro. Finalmente, el subgénero *Tacsonioides* posee una sola especie, *P. umbilicata*, que presenta flores de hasta 7 cm con pétalos de color violáceo.

El color de las flores es el resultado de complejas rutas metabólicas y las diferencias entre especies reflejan la historia evolutiva del género (Clegg y Durbin, 2000). Entre los pigmentos que determinan los colores de las flores, las antocianinas y sus derivados, son sintetizadas en el citoplasma de las células, transportadas y acumuladas en las vacuolas donde expresan su color (van der Kooi *et al.*, 2016; Zhao y Tao, 2015).

Con el objetivo de estudiar el color de las flores en el género, se analizaron las características colorimétricas en varias especies argentinas y en los híbridos interespecíficos obtenidos entre ellas (Bugallo *et al.*, 2017).

Se encontró una amplia variabilidad en el color de las flores en las especies *P. amethystina*, *P. caerulea*, *P. elegans*, *P. edulis f. edulis*, *P. edulis f. flavicarpa* y *P. mooreana*, así como también en los híbridos interespecíficos obtenidos entre ellas, en los tres componentes colorimétricos que componen la escala CIELAB.

Los híbridos *P. amethystina* x *P. caerulea*, *P. amethystina* x *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. amethystina* x *P. mooreana* y *P. amethystina* x *P. edulis* f. *edulis* mostraron valores colorimétricos intermedios respecto de los de sus parentales, excepto en los híbridos de *P. amethystina* x *P. elegans* donde los valores fueron similares a los de *P. amethystina* (Bugallo *et al.*, 2017). Según estos resultados, el color de flor en *Passiflora* respondería a herencia cuantitativa, con la posible interacción entre alelos y/o genes de las especies *P. amethystina* y *P. elegans* que afectaría el color de flor 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; Torielli *et al.*, 2009; Phillips, 2008). Además, en estudios de microscopía de los pétalos, se encontró que el color de las flores de *P. amethystina* se determinaba por la presencia de inclusiones vacuolares antociánicas irregulares, físicamente ubicadas en las vacuolas de las células epidérmicas.

En relación con las características florales, la especialización de los polinizadores puede representar una de las fuerzas actuantes en el aislamiento reproductivo. La diversidad en especies que presenta el género habría sido favorecida por una amplia variedad de polinizadores: aves, murciélagos e insectos. En todas las especies estudiadas de *Passiflora*, la relación con polinizadores estuvo fuertemente asociada a la calidad de la recompensa ofrecida y a los atractivos florales abordados en el mejoramiento de ornamentales (Varassin *et al.*, 2001), así como también al tamaño relativo de las piezas florales y la antesis (Amela García y Hoc, 2012). Inclusive, un mismo taxón puede poseer varias especies de polinizadores, tanto efectivos como ocasionales, como se comprobó para *P. edulis* f. *flavicarpa* (Yamamoto *et al.*, 2012).

Ulmer y MacDougal (2004) afirman que las especies de *Passiflora* con flores rojas y rosadas sin aroma, son polinizadas por colibríes, pero no atraen abejas. Algunas especies con flores perfumadas de colores pálidos y antesis nocturna son polinizadas por murciélagos, como *P. mucronata*, *P. trisecta*, *P. ovalis* y *P. penduliflora*.

Dentro del subgénero *Passiflora*, los polinizadores de *P. caerulea* serían varias especies de *Xylocopa*: *X. augusti*, *X. frontalis*, *X. nigrocincta* y *X. artifex* (Amela García y Hoc, 2007; Aquino y Amela García, 2019), *Bombus opifex*, *B. morio* y *Xylocopa splendidula* (Torres *et al.*, 2012) y una especie de *Centris* (Aquino y Amela García, 2019), mientras que los registrados para *P. alata* por Varassin *et al.* (2001) fueron *Centris flavifrons*, *C. longimana*, *C. lutea*, *Xylocopa brasilianorum*, *X. frontalis*, *X. ordinaria*, *Eulaema cingulata* y *E. nigrita*. Si bien estas diferencias en las especies polinizadoras estarían relacionadas con el hecho de que los estudios fueron realizados en distintas localidades (Torres *et al.*, 2012 en la provincia de Córdoba, Argentina y Varassin *et al.*, 2001 en la costa Atlántica del Estado de Espírito Santo, Brasil), también podrían plantear especificidades por polinizadores diferentes que las mantendrían aisladas, al menos parcialmente, dada la diferencia en algunos caracteres florales de estas dos especies.

Aislamiento fenológico, el desencuentro en el tiempo

Entre los factores de aislamiento reproductivo externos que se dan en la naturaleza, el aislamiento temporal se produce entre individuos con diferente período de floración ya que el desencuentro entre sus gametas en el tiempo impide el cruzamiento (Grant, 1989).

Las especies de *Passiflora* de la colección del IF mostraron variación en sus períodos de floración bajo invernáculo. Entre las que presentaron floración primavero-estivo-otoñales (PEO) se destacan, dentro del subgénero *Passiflora*, *P. alata*, *P. caerulea*, *P. cincinnata* y *P. mooreana* y, en el subgénero *Decaloba*, *P. misera*.

Otras florecieron en período estivo-otoñales (EO), en el subgénero *Passiflora*, fueron *P. edulis* f. *flavicarpa* y *P. tucumanensis*; *P. foetida*, perteneciente al subgénero *Dysosmia* y *P. capsularis* y *P. morifolia* del subgénero *Decaloba*.

También se encontraron especies con floraciones otoño-invernales (OI) como *P. amethystina* y otras que se extendieron hasta la primavera, como *P. edulis* f. *edulis*, *P. elegans* y *P. tenuifolia* en el subgénero *Passiflora*. *Passiflora suberosa* floreció desde enero hasta agosto (EOI).

A pesar de este tipo de aislamiento, esta barrera fue fácilmente sorteada por la recolección de polen y su conservación para su uso en la polinización diferida de las distintas especies. El ambiente más apropiado para el mantenimiento de la viabilidad del polen es aquel en el que se reducen la humedad y la temperatura. En el caso del polen de especies de *Passiflora*, se colocaron las anteras dentro de grajeas y éstas sobre sílica-gel en cajas plásticas herméticas. Se lograron cruzamientos exitosos con polen conservado, inclusive después de los dos años.

Aislamiento ecogeográfico: distribución de nativas y tolerancia a las bajas temperaturas en especies e híbridos

En la naturaleza, las barreras que separan a las especies haciéndolas diferentes operan en distintos niveles. Existen factores de aislamiento ambientales, que se manifiestan en diferencias ecológicas entre taxones. Estas suelen evolucionar tempranamente en la especiación ya que la selección natural favorece la adaptación a diferentes nichos ecológicos, derivando en aislamiento reproductivo (Arnegard *et al.*, 2014).

Las especies argentinas de *Passiflora* se distribuyen, en su mayoría, en el norte del país, sin embargo, algunas pocas superan los 34° de latitud sur, donde se encuentra Buenos Aires, el mayor centro de producción de plantas ornamentales. La tolerancia a las bajas temperaturas es una de las mayores limitantes para el cultivo de estas plantas y, por ese motivo, es uno de los objetivos principales de mejoramiento propuestos por el IF, en Argentina (Bugallo *et al.*, 2011). Algunas de las especies nativas que poseerían mayor tolerancia a las bajas temperaturas son: *P. capsularis* y *P. misera*, del subgénero *Decaloba*; *P. chrysophylla* y *P. foetida*, del subgénero *Dysosmia*; y del subgénero *Passiflora*, *P. mooreana* y *P. caerulea*, siendo esta última la de distribución más austral (Missouri Botanical Garden, 2021).

Debido a la preferencia de la mayoría de las especies por los climas cálidos, la colección de trabajo *in vivo* para el mejoramiento en el IF se mantuvo bajo invernáculo con una temperatura mínima controlada de 10 °C.

Se han realizado ensayos para verificar la tolerancia de las plantas a las temperaturas fuera del invernáculo, en Buenos Aires (Bugallo *et al.*, 2011; 2014). Los resultados mostraron que *P. caerulea* fue la especie de mejor comportamiento, presentándose casi inalterada luego del período invernal. Para otras, como *P. alata* y *P. amethystina*, la exposición al frío causó inicialmente, marchitamiento y necrosis en las hojas y con posterioridad, la muerte (Bugallo *et al.*, 2011; 2014). En híbridos interespecíficos, la tolerancia a bajas temperaturas mostró un comportamiento intermedio al de las plantas parentales. En el caso de híbridos entre plantas no tolerantes y tolerantes como, por ejemplo, *P. amethystina* x *P. caerulea*, fue posible la supervivencia de las plantas al aire libre en invierno con poco daño a los tejidos vegetativos (Bugallo *et al.*, 2014).

El mejoramiento genético por hibridación entre especies con barreras pre-polinización

Si bien en la naturaleza existen especies en las que no se podrían producir híbridos por poseer diferencias en sus polinizadores, momento reproductivo o distribución eco-geográfica, estas barreras pueden ser fácilmente sorteadas mediante la hibridación artificial.

La realización de cruzamientos en el género implica una serie de pasos. El primero de ellos involucra la selección de los parentales para los cruzamientos. En esta instancia, se propuso enfocar el trabajo dentro del subgénero *Passiflora*. La decisión de seleccionar a las especies de este subgénero se debió a su gran variabilidad en colores y tamaños de flores, a la presencia de especies con la capacidad de sobrevivir al invierno en Buenos Aires y a que, en pruebas preliminares, no se lograron obtener resultados en los cruzamientos entre subgéneros diferentes. El paso siguiente luego de la selección de parentales es el de la realización de los cruzamientos. Las flores femeninas se emasculan cuando los pimpollos permanecen cerrados, pero los pétalos ya están coloreados. Este estadio se observa el día anterior a la apertura de las flores. Para la castración, se retiran los sépalos, los pétalos, la corona y las anteras con una pinza de punta fina (Figura 1.A). Este paso se realiza ya que, si bien la mayoría de las especies de *Passiflora* son autoincompatibles, otras no lo son (Ulmer y MacDougal, 2004). Luego de castrar las flores, se coloca un sobre de papel envolviendo cada una, a la espera del momento en que los estigmas estén receptivos, etapa que ocurre con la apertura natural de la flor. Al día siguiente, se retira el sobre de papel protector y se frota sobre la superficie de los tres estigmas la antera de la planta selecta como parental masculino (Figura 1.B). El cruzamiento se rotula con una etiqueta colgante con hilo que se ubica alrededor del pedicelo de la flor polinizada y se vuelve a cubrir con el sobre de papel

para evitar la contaminación con otro polen (Figura 1.C). La formación y maduración del fruto ocurre en un tiempo variable en las distintas especies de *Passiflora* pero el viraje del color es el indicador para el momento de la cosecha (Figura 1.D). Los frutos se retiran junto con la etiqueta rotulada que indica el cruzamiento y se abre el fruto para retirar las semillas. Todas las especies de *Passiflora* poseen semillas con arilo, el cual puede ser retirado frotándolas contra una toalla de papel. En condiciones naturales, las semillas de este género suelen ser ingeridas por los pájaros que se alimentan del arilo. Las semillas pasan por el buche del animal y los tegumentos gruesos y duros son escarificados. Las semillas son eliminadas por los pájaros, cayendo en las bases de alambrados o árboles en condiciones óptimas para su germinación. Imitando este proceso, una vez eliminados los arilos, las semillas pueden ser escarificadas frotando la zona de la sutura por un papel de lija (Ferreira *et al.*, 2005). Algunos estudios indican que mantener las semillas remojadas en agua corriente ayuda a eliminar algunas sustancias químicas que impiden la germinación (Siddique y Kumar, 2018; Çırak *et al.*, 2007); luego de este tratamiento, se siembran las semillas para que germinen.

Por más que se trate del mismo cruzamiento e inclusive dentro de un mismo fruto, todos los híbridos son diferentes. La autoincompatibilidad encontrada en la mayoría de las especies de *Passiflora* produce genotipos altamente heterocigotas, haciendo que las gametas que se generen posean una inmensa variabilidad genética que, en la combinación interespecífica, resulta casi infinita.

El género *Passiflora* es muy prolífico en híbridos interespecíficos (Ocampo *et al.*, 2016; Giovannini *et al.*, 2012; Bugallo *et al.*, 2011; Ramírez, 2006; Ulmer y MacDougal, 2004; Vanderplank, 1991; Payán y Martín, 1975). En el programa de mejoramiento en el IF, de 72 parejas interespecíficas de nativas del subgénero *Passiflora* (incluyendo cruzamientos recíprocos), 40 de ellos produjeron híbridos. El cruzamiento que produjo frutos con mayor frecuencia fue *P. amethystina* x *P. elegans*. Sin embargo, el cruzamiento entre algunas de las especies de la colección del IF nunca fue fructífero. Para algunas de las parejas de especies, no se conocen híbridos, lo cual podría implicar la incompatibilidad entre las mismas. En otros casos, una pareja de especies que entre plantas de la colección fue infértil, se registra como fértil en la bibliografía. En el caso del cruzamiento *P. cincinnata* x *P. caerulea*, del cual no se lograron obtener híbridos en el IF, se hallaron registros de las variedades *P.* “Blue Carnival”, *P.* “Catherina Howard”, *P.* “Jeeny”, *P.* “Lada”, *P.* “Linda”, *P.* “Rinconata” y *P.* “Vladena” (Passiflora Society International, 2021). Este hecho, podría estar indicando que la incompatibilidad encontrada se da entre los genotipos y no entre las especies.

Citometría de flujo: cantidad de ADN en especies e híbridos, confirmación de hibridación y de poliploidía

La citometría de flujo es una técnica muy empleada para la investigación en plantas, tanto para estudios en poblaciones naturales como por su aplicación en programas de mejoramiento genético. Por su capacidad para detectar el ADN en el núcleo celular, puede ser empleada en la estimación de la cantidad de ADN, así como también en la detección de poliploides naturales e inducidos y en la confirmación de la hibridación, en algunos casos.

Los tamaños genómicos conocidos para el género *Passiflora*, así como los de otros géneros, son compendiados en el Plant DNA C-values Database (Kew, 2021). En el género *Passiflora*, la variabilidad en la cantidad de ADN por cada genoma, como en tantos otros aspectos, es enorme. Según los datos publicados, esta característica puede variar entre 0,21 pg en *P. organensis*, hasta 2,68 pg en *P. quadrangularis* (sin. de *P. alata*). Si bien este dato podría parecer menor, cuando se convierten las unidades por medio de la fórmula $1 \text{ pg} = 978 \text{ Mpb}$ (Dolezel *et al.*, 2003), la diferencia resulta en 2.415.000 pares de bases. Entre las nativas de Argentina, la diferencia encontrada es de 1.916.000 pares de bases, considerando el menor valor publicado, 0,25 para *P. misera*, y el mayor, 2,21 para *P. alata*.

Las variaciones en el tamaño del genoma se pueden deber a la amplificación de ADN no repetitivo, especialmente retrotransposones, que produciría un aumento; o a la recombinación desigual y la recombinación ilegítima, que producirían una reducción (Grover y Wendel, 2010).

Debido a que la citometría de flujo es una técnica que estima la cantidad de ADN de manera indirecta, a través de la intensidad de fluorescencia de las tinciones, algunos autores afirman que ciertos compuestos presentes en las plantas podrían interferir en el proceso, alterando los resultados. Sin embargo, en varias especies se ha comprobado genuina variación en el tamaño genómico debida a rearrreglos cromosómicos, ADN repetitivo y elementos transponibles (Sader *et al.*, 2020; Boutte *et al.*, 2020; Inceer *et al.*, 2018; Šmarda y Bureš, 2010).

En el plan de mejoramiento del IF, se han estimado las cantidades de ADN para las especies presentes en la colección de trabajo, para algunas, por primera vez (datos en prensa).

En algunos pocos casos, se ha podido realizar una confirmación temprana de hibridación, sólo cuando la cantidad de ADN de los parentales fue significativamente diferente como, por ejemplo, en los cruzamientos entre *P. caerulea* y *P. alata*, con diferencias de 0,82 pg aproximadamente (Bugallo *et al.*, 2016). A pesar de las diferencias en tamaño genómico, los híbridos entre especies presentaron gran vigor vegetativo, sin embargo, se observó una importante reducción en la fertilidad que se ve reflejada en la viabilidad del polen (Bugallo *et al.*, 2011).

La citometría de flujo también se ha empleado para la detección de poliploides en plántulas de inducción por colchicina (Bugallo *et al.*, 2016).

Barreras de aislamiento reproductivo post-polinización

En algunos casos, no existen fenómenos pre-polinización que aislen reproductivamente a las especies, sino que las barreras ocurren con posterioridad a la llegada del polen al estigma de las flores. Entre ellas, se diferencian las pre-cigóticas, como la interrupción del crecimiento del tubo polínico; y las post-cigóticas, como los problemas en la germinación de las semillas o la esterilidad de los híbridos.

Barreras pre-cigóticas: interrupción del crecimiento del tubo polínico

La polinización artificial entre dos genotipos no siempre resulta en la obtención de un fruto con semillas. El estudio del crecimiento del tubo polínico en estas situaciones es de mucha utilidad en el mejoramiento ya que permite identificar el lugar específico donde se produjo la reacción de incompatibilidad y tomar medidas para sortearla.

La metodología para llevar a cabo este tipo de análisis implica varios pasos: la realización de varias polinizaciones entre los mismos genotipos, la fijación de los pistilos polinizados en FAA (formol, ácido acético, alcohol etílico y agua destilada 0,1: 0,05: 0,5: 0,35%) a diferentes períodos post-polinización (por ejemplo, a 1, 2 ó 3 días de realizada la polinización), la hidrólisis en hidróxido de sodio de los pistilos fijados, la tinción con azul de anilina y la observación bajo microscopio de fluorescencia (Rego *et al.*, 2000; Martin, 1958; Bugallo *et al.*, 2011).

Como resultado de esta técnica, se pudo observar la adhesión de los granos de polen en el estigma, su germinación, el crecimiento de los tubos polínicos a lo largo del estilo y su reacción (movimientos zigzagueantes, acumulación anormal de calosa en extremos y a lo largo del tubo, detención, etc.), su entrada al ovario y, en algunos casos, la entrada de tubos polínicos por la micrópila del óvulo (Bugallo *et al.*, 2015; 2011). Si alguno de estos pasos se ve interrumpido, manifestando barreras pre-cigóticas, el cruzamiento no producirá frutos. También puede ocurrir que los tubos polínicos lleguen a los óvulos sin interrupción y, a pesar de ello, no se produzcan frutos. Ese caso, podría mostrar la existencia de barreras pre-cigóticas que ocurren entre la entrada de los tubos polínicos al óvulo y la formación de la cigota, o de impedimentos de origen post-cigótico.

Barreras post-cigóticas

Las barreras post-cigóticas son las que se producen con posterioridad a la fecundación. Estas pueden deberse al aborto del cigoto en división, a defectos en la semilla híbrida que reprimen la germinación, a debilidad o letalidad vegetativa del híbrido interespecífico, a su esterilidad o a la de generaciones posteriores (Baack *et al.*, 2015).

El rescate de embriones in vitro es una de las técnicas comúnmente utilizadas para sortear esta barrera. Algunas de las barreras post-cigóticas impiden la formación del híbrido, por ejemplo, el aborto del embrión de la semilla; otras, inhiben la normal formación o uso del tejido de reserva de la semilla. En esos casos, un embrión híbrido muere por falta de nutrientes durante la germinación.

Los problemas en la germinación son la expresión de barreras post-cigóticas que puede provenir de diversos orígenes. Uno de ellos es la impronta genómica “genomic imprinting” que produce el “apagado” de una de las copias de varios genes y es fundamental en la función del endosperma para nutrir al embrión. Otro, deriva de una falla en la etapa de celularización durante el desarrollo del endosperma que deja sin alimento al embrión. Un tercero, se da en híbridos donde se observan endospermas defectuosos; este fenómeno ocurre independientemente del modo de desarrollo del endosperma (celular o nuclear) (Wolff *et al.*, 2015).

Esta situación se encontró en las semillas del híbrido *P. “Amethyst”* x *P. caerulea* quien producía frutos oblongos de color violeta oscuro de entre 5 y 8 cm de longitud completamente vacíos o con hasta dos semillas (Figuras 1. E, F, G). Las pocas semillas que fueron recolectadas en esa planta poseían un embrión, pero no germinaban con los protocolos usados para las especies. Por ese motivo, se cultivaron in vitro los embriones extraídos de las semillas: se desinfectaron semillas sumergiéndolas en etanol 70% durante 2 minutos, se retiraron los tegumentos con un bisturí bajo lupa en el flujo laminar, se extrajeron los embriones y se colocaron sobre medio de cultivo MS modificado, (macroelementos al 50% y sacarosa 40 g/L en tubos de ensayo. Si bien este método permitió la obtención de un híbrido (Figura 1.H), la mayor parte de los embriones cultivados no prosperaron o presentaron deformidades que comprometieron su crecimiento posterior. Esto demostró que las barreras post-cigóticas iban más allá de los problemas con las reservas de las semillas, comprometiendo la viabilidad vegetativa de esa progenie.

Citogenética, viabilidad y fertilidad de los híbridos interespecíficos

Las diferencias cromosómicas entre taxones constituyen uno de los factores de aislamiento reproductivo internos más importantes (Charron *et al.*, 2014). Cada especie tiene un complemento cromosómico propio. La comparación de los cromosomas de diferentes taxones muestra patrones y mecanismos de la evolución cariotípica y su importancia en la diversificación y posterior especiación (Leitch *et al.*, 2013). Las características del cariotipo son generalmente constantes en un grupo de especies y aún de géneros, pero a menudo ocurren variaciones estructurales y/o numéricas que pueden cambiar el número, tamaño y posición centromérica de los cromosomas y la simetría del cariotipo (Stebbins, 1971).

El género *Passiflora* posee varios números cromosómicos básicos y las especies argentinas presentan 3 de ellos: $x=6$, $x=9$ y $x=10$. Entre ellas, las del subgénero *Decaloba* poseen números básicos $x=6$, con números somáticos $2n=12$ (*P. morifolia*, *P. misera* y *P. capsularis*) y $2n=24$ (*P. suberosa*). Las especies del subgénero *Dysosmia* poseen $x=10$ con número somático $2n=20$ (*P. foetida*) y las del subgénero *Passiflora* $x=9$, siendo todas diploides $2n=2x=18$, excepto *P. mooreana* que presentó citotipos diploide y tetraploide (Bugallo *et al.*, 2020; 2013). A pesar de que todas las especies del subgénero *Passiflora* poseen números

cromosómicos $2n=8$, se encontraron diferencias en los cariotipos (Bugallo *et al.*, 2020). Estos fueron altamente simétricos, con cromosomas, en su mayoría, metacéntricos. Como se mencionó anteriormente, las diferencias entre subgéneros son tan profundas que, en ningún caso, permitieron la hibridación entre ellos.

Las barreras post-cigóticas pueden manifestarse en la viabilidad vegetativa del híbrido, mostrando alteraciones en su crecimiento y/o desarrollo; o con la llegada de la etapa reproductiva. En caso de verse comprometida la viabilidad vegetativa, el híbrido difícilmente llega a florecer.

Con frecuencia, los híbridos interespecíficos son estériles y esto se debe en gran parte a que, al presentar los genomas parentales una falta de homología, la meiosis no puede ocurrir normalmente. Se estimó la viabilidad del polen en 47 híbridos interespecíficos de *Passiflora* de la colección del IF, correspondientes a los 20 cruzamientos. Los porcentajes variaron entre un valor máximo de 79,4% para *P. amethystina* x *P. edulis f. edulis*, y un mínimo de 0% para *P. cincinnata* x *P. edulis f. flavicarpa* y *P. edulis f. edulis* x *P. mooreana* 4x. Comparando la viabilidad del polen promedio para cada pareja de especies, los cuatro cruzamientos que presentaron mayor fertilidad fueron: *P. amethystina* x *P. edulis f. edulis*, *P. amethystina* x *P. mooreana*, *P. amethystina* x *P. caerulea* y *P. caerulea* x *P. amethystina*. La esterilidad en un híbrido interespecífico puede eliminarse si se induce la duplicación cromosómica, ya que la copia de cada genoma producirá un homólogo para cada cromosoma.

Muchas veces ocurre la hibridación natural de dos especies diferentes y, en algunos casos, la duplicación cromosómica espontánea que resulta en la formación de un alopoliploide. Este híbrido, al poseer dos genomas de cada especie que pueden aparear sus cromosomas entre sí, muchas veces recupera la fertilidad.

La inducción de poliploidía es una técnica por la cual, a través de sustancias químicas inhibitoras de los husos acromáticos, se logra la duplicación cromosómica en el núcleo celular. Las consecuencias fenotípicas de la poliploidización en plantas incluyen: aumento en el tamaño del núcleo celular y, como consecuencia, en órganos como hojas y flores; modificación del color de flor; de la fragancia, etc. (Niazian y Nalousi, 2020).

En el género *Passiflora* se ha ensayado con éxito la inducción de poliploides *in vivo* en especies e híbridos interespecíficos. La técnica empleada involucró la aplicación de una solución acuosa de colchicina en concentraciones de 0,25 y 0,5%, a yemas de estacas enraizadas y a ápices de plántulas de 5 cm de longitud. Se obtuvieron plantas quiméricas y poliploides sólidos, que se confirmaron por citometría de flujo (Bugallo *et al.*, 2016).

Entre los autopoliploides, se destacó el obtenido a partir del citotipo tetraploide de *P. mooreana* ya que permitió la comparación de tres niveles de ploidía diferentes para el mismo genoma: diploide, tetraploide y octoploide (Bugallo *et al.*, 2014). Esta serie mostró que, si bien los pétalos de las flores permanecieron blancos, el color azul de los apéndices de la corona se intensificaba al aumentar el nivel de ploidía. Se encontró también un incremento en el tamaño de las hojas y de las flores y en la textura de las hojas. Sin embargo, los pétalos de las flores del octoploide se presentaban arrugados, la cantidad de flores era escasa y mostraba una reducida tasa de crecimiento. La disminución en la velocidad de crecimiento acompañó a la mayoría de los poliploides obtenidos en alguna medida (Bugallo *et al.*, 2014).

Entre los aloploiploides, obtenidos por la duplicación cromosómica de híbridos interespecíficos, pudieron apreciarse varios fenómenos interesantes. Por un lado, el tamaño promedio de los órganos fue mayor en poliploides que en diploides; a pesar de ello, en algunos casos, no se observaba este incremento. Resultados similares fueron registrados respecto de la recuperación de la fertilidad. Si bien algunos aloploiploides recuperaron la fertilidad, otros no lo hicieron.

La falta de uniformidad en la respuesta a la inducción de poliploides sugiere que este proceso no es lineal y que ocurrieron muchos otros cambios y ajuste en el momento de la duplicación cromosómica (Figura 1.1). Algunos de ellos serían consecuencia del dosaje génico, otros derivarían de modificaciones epigenéticas. La conclusión más general es que cada evento de inducción de poliploidía arroja un resultado único y debe ser estudiado separadamente.

CONCLUSIONES

El programa de mejoramiento llevado a cabo por más de 10 años en el Instituto de Floricultura aportó gran cantidad de conocimiento sobre las especies argentinas de *Passiflora*. Los estudios involucraron la realización de cruzamientos interespecíficos, estudios del crecimiento del tubo polínico, siembra de semillas, análisis de viabilidad de polen, rescate de embriones, citogenética, poliploidía, citometría de flujo y análisis fenotípicos. Los resultados muestran la inmensa variabilidad genética del género y permiten vislumbrar los procesos y mecanismos que tuvieron lugar en la especiación. También exhiben las infinitas posibilidades de generar aún más variación por métodos convencionales como la hibridación interespecífica. Además, la información obtenida enriquece el conocimiento sobre las especies nativas de la Argentina y aporta valiosos datos a los programas de mejoramiento en este género.



Figura 1. Mejoramiento genético en especies de *Passiflora* nativas de Argentina.

A- Pimpollo castrado; B- polinización artificial; C- ensobrado y rotulado del pistilo polinizado; D- fruto maduro; E, F, G- frutos, flores y semillas del híbrido *P. "Amethyst"* x *P. caerulea*; H- flor del híbrido obtenido por rescate de embriones de semillas de *P. "Amethyst"* x *P. caerulea*; I- fila inferior: híbridos de *P. amethystina* x *P. elegans* (2x), fila superior: poliploides inducidos (4x).

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que colaboraron en el programa de mejoramiento en *Passiflora* en el Instituto de Floricultura: María Julia Pannunzio, Javier Pizzi, Zulma Roa, Carolina Castagnet y Matías Soria. A María Teresa Amela García por su revisión y aportes a este capítulo.

REFERENCIAS

AMELA GARCÍA, M.T.; HOC, P. S. 1997. Floral biology and reproductive system of *Passiflora caerulea* (*Passifloraceae*). *Beiträge zur Biologie der Pflanzen*, 70: 1-20.

AMELA GARCÍA, M.T.; HOC, P. S. 2011. Pollination mechanisms in *Passiflora* species: the common and the rare flowers – ecological aspects and implications for horticulture. Chapter 2. En: Raskin, N. D.; Vuturro, P. T. (Eds.). 2011. *Pollination: mechanisms, ecology and agricultural advances*. Nova Science Publishers, Inc. New York, U. S.

AQUINO, D. S.; AMELA GARCÍA, M.T. 2019. Pollen dispersal in a population of *Passiflora caerulea*: spatial components and ecological implications. *Plant Ecology* 220, 845-860.

ARNEGARD, M.E.; MCGEE, M.D.; MATTHEWS, B.; MARCHINKO, K.B.; CONTE, G.L.; KABIR, S.; BEDFORD, N.; BERGEK, S.; CHAN, Y.F.; JONES, F.C.; KINGSLEY, D.M.; PEICHEL, C.L.; SCHLUTER, D. 2014. Genetics of ecological divergence during speciation. *Nature* 511(7509), 307-311.

BAAK, E.; MELO, M.C.; RIESEBERG, L.H.; ORTIZ-BARRIENTOS, D. 2015. The origin of reproductive isolation in plants. *New Phytologist* 207, 968-984.

BOUTTE, J.; MAILLET, L.; CHAUSSEPIED, T.; LETORT, S.; AURY, J. M.; BELSER, C.; BOIDEAU, F.; BRUNET, A.; CORITON, O.; DENIOT, G.; FALENTIN, C.; HUTEAU, V.; LODÉ-TABUREL, M.; MORICE, J.; TROTOUX, G.; CHÈVRE, A. M.; ROUSSEAU-GUEUTIN, M.; FERREIRA DE CARVALHO, J. 2020. Genome Size Variation and Comparative Genomics Reveal Intraspecific Diversity in *Brassica rapa*. *Frontiers in plant science*, 11, 577536. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.577536>, verificado: 08/02/2021

BUGALLO, V.; CARDONE, S.; PANNUNZIO, M.J.; FACCIUTO, G. 2014. Passionflowers from Argentina: domestication of native species and strategies to obtain new varieties. *Passiflora Online Journal UK* 5(1):58-67.

BUGALLO, V.; CARDONE, S.; PANNUNZIO, M. J.; COVIELLA, A.; FACCIUTO, G. 2013. Chromosome Studies and the Implications on Ornamental Characteristics in *Passiflora mooreana* (*Passifloraceae*). *Acta Horticulturae* 1000 (1), 131-135.

- BUGALLO, V.; PANNUNZIO, M. J.; FACCIUTO, G. 2016. Flow cytometry: a useful tool for measuring ploidy in *Passiflora* breeding programs. *Passiflora Online Journal*, UK, 9(1): 4-7
- BUGALLO, V.; PANNUNZIO, M. J.; CARDONE, S.; FACCIUTO, G. 2015. The hidden path of hybridization in passionflower: microscopic steps to create a novel variety. *Passiflora Online Journal*, UK 7(1), 47-53.
- BUGALLO, V.; PANNUNZIO, M. J.; CARDONE, S.; FACCIUTO, G. 2011. Breeding Advances in *Passiflora* Native to Argentina. Floriculture and Ornamental Biotechnology, Global Science Books, UK. 5 (1), 23-34. ISSN: 1749-0294.
- BUGALLO, V.; PANNUNZIO, M.J.; FACCIUTO, G. 2017. Análisis colorimétrico en flores de especies e híbridos de *Passiflora*. *Horticultura Argentina* 36(90), 5-12.
- BUGALLO, V.; REALINI, F.; FACCIUTO, G.; POGGIO, L. 2020. Karyotypic analyses and genomic affinity among Argentinean species of *Passiflora* L. *Rodriguésia* 71: e03532018.
- CHARRON, G.; LEDUCQ, J.B.; LANDRY, C.R. 2014. Chromosomal variation segregates within incipient species and correlates with reproductive isolation. *Molecular Ecology* 23, 4362-4372.
- ÇIRAK, C.; KEVSEROĞLU, K.; AYAN, A. K. 2007. Breaking of seed dormancy in a Turkish endemic *Hypericum* species: *Hypericum aviculariifolium* subsp. *depilatum* var. *depilatum* by light and some pre-soaking treatments. *Journal of Arid Environments* 68(1), 159-164.
- 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.
- DOLEZEL, J.; BARTOS, J.; VOGLMAYR, H.; GREILHUBER, J. 2003. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry* 51, 127-128.
- KEW. 2021. Plant DNA C-values Database. <http://data.kew.org/cvalues/>, verificado: 08/02/2021.
- FACCIUTO, G.; BOLOGNA, P.; BUGALLO, V.; RIVERA, M. 2019. Desarrollo de plantas ornamentales a partir de recursos genéticos argentinos. *RG News* 5(1), 13-17. Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos.
- FERREIRA, G.; DE OLIVEIRA, A.; RODRIGUES, J. D.; BRAVO, D. G.; METONI, M.; TESSER, S. M.; ANTUNES, A. M. 2005. Effect of aril in *Passiflora alata* seed germination in different substrates and submitted to previous germinative treatments with gibberellin. *Revista Brasileira de Fruticultura* 27 (2), 277-280.
- GIOVANNINI, A.; DENTE, F.; DE BENEDETTI, L.; NICOLETTI, F.; BRAGLIA, L.; GAVAZZI, F.; MERCURI, A. 2012. Interspecific hybridization in ornamental passionflowers. In XXIV International Eucarpia Symposium Section Ornamentals: Ornamental Breeding Worldwide 953, 111-118.

- GRANT, V. 1989. Especiación vegetal. Noriega editores. 1-587.
- GROVER, C.E.; WENDEL, J.F. 2010. Recent insights into mechanisms of genome size change in plants. *Journal of Botany* 2010:8.
- INCEER, H.; GARNATJE, T.; HAYIRLIOĞLU-AYAZ, S.; PASCUAL-DÍAZ, J. P.; VALLÈS, J.; GARCIA, S. 2018. A genome size and phylogenetic survey of Mediterranean *Tripleurospermum* and *Matricaria* (*Anthemideae*, *Asteraceae*). *PLoS one* 13(10), e0203762.
- KILLIP, E. 1938. The American species of *Passifloraceae*. Field Museum of Natural History, Botanical series 19, 1-613.
- LEITCH, I. J.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, J. F. 2013. Plant genome diversity, physical structure, behavior and evolution of plant genomes, Volume 2, 359 p.
- MACDOUGAL, J. M.; FEUILLET, C. 2004. Systematics. En: ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. (eds.). *Passiflora: passionflowers of the World*. Timber Press, Cambridge, UK., pp. 27-31.
- MACKAY, T. F. C. 2014. Epistasis and quantitative traits: using model organisms to study gene-gene interactions. *Nature Reviews Genetics* 15(1), 22-23.
- MARTIN, J. 1958. Staining and observing pollen tubes in the styles by means of fluorescence. *Stain Technology* 34, 125-128.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2021. Bases de datos de especímenes. <http://www.tropicos.org/SpecimenSearch.aspx>, verificado: 08/02/2021
- NACIONES UNIDAS. 2011. The Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from Their Utilization to the Convention on Biological Diversity. <https://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-en.pdf>, verificado: 08/02/2021
- NIAZIAN, M.; NALOUSHI, A. M. 2020. Artificial polyploidy induction for improvement of ornamental and medicinal plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-23.
- OCAMPO, J.; ARIAS, J.C.; URREA, R. 2016. Interspecific hybridization between cultivated and wild species of genus *Passiflora* L. *Euphytica* 209, 395-408.
- PASSIFLORA SOCIETY INTERNATIONAL, 2021. *Passiflora* Cultivars International Register. <https://www.passiflorasociety.org/>, verificado: 08/02/2021
- PAYÁN, F. R.; MARTIN, F. W. 1975. Barriers to the hybridization of *Passiflora* species. *Euphytica* 24, 709-716.
- 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.

- RAMÍREZ, B. W. 2006. Hibridación interespecífica en *Passiflora* (*Passifloraceae*) mediante polinización manual y características florales para la polinización. *Lankesteriana* 6 (3), 123-131.
- RÊGO, M. M.; RÊGO, E. R.; BRUCKNER, C. H.; DA SILVA, E. A. M.; FINGER, F. L.; PEREIRA, K. J. C. 2000. Pollen tube behavior in yellow passion fruit following compatible and incompatible crosses. *Theoretical and Applied Genetics* 101(5), 685-689.
- SADER, M.; VAIO, M.; CAUZ-SANTOS, L.; DORNELAS, M.C.; VIEIRA, M.L.C.; PEDROSA-HARAND, A. 2020. Large vs. Small genomes in *Passiflora*: the influence of the mobilome and satellitome. *BioRxiv* preprint. <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2020/08/24/2020.08.24.264986.full.pdf>, verificado 08/02/2021.
- SIDDIQUE, A.; KUMAR, P. 2018. Physiological and Biochemical basis of Pre-sowing soaking seed treatments-An overview. *Plant Archive* 18(2), 1933-1937.
- ŠMARDA, P.; BUREŠ, P. 2010. Understanding intraspecific variation in genome size in plants. *Preslia* 82(1), 41-61.
- STEBBINS, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold Publishers, London, 1-216.
- TORNIELLI, G.; KOES, R.E.; QUATTROCCHIO, F. 2009. The genetics of flower color. Chapter 13. En: Gerats, T.; Strommer, J. *Petunia*. Springer Science, 269- 299.
- TORRES, C.; DAMBOLENA, J.S.; ZUNINO, M.P.; GALETTO, L. 2012. Nectar characteristics and pollinators for three native, co-occurring insect-pollinated *Passiflora* (*Passifloraceae*) from central Argentina. *The International Journal of Plant Reproductive Biology*, 4(2), 121-126.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. 2004. *Passiflora*: passionflowers of the World. Timber Press, Cambridge, UK. 1-430.
- 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. *Proceedings of the Royal Society Biological Series*, 283: 20160429.
- VANDERPLANK, K. 1991. *Passionflowers and passionfruit*. Cassell Publishers Limited, London, 1-176.
- VAN TUYL, J. M.; DE JEU, M. J. 1997. Methods for overcoming interspecific crossing barriers. Chapter 13. En: *Pollen biotechnology for crop production and improvement* (Sawhney, VK; Shivanna, KR). Cambridge University Press.
- VARASSIN, I.G.; TRIGO, J.R.; SAZIMA, M. 2001. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (*Passifloraceae*) in south-eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 136, 139-152.

WOLFF, P.; JIANG, H.; WANG, G.; SANTOS-GONZALEZ, J.; KÖHLER, C. 2015. Paternally expressed imprinted genes establish postzygotic hybridization barriers in *Arabidopsis thaliana*. eLife 4: e10074.

YAMAMOTO, M.; SILVA, C.I.; AUGUSTO, S.C.; BARBOSA, A.A.A.; OLIVEIRA, P.E. 2012. The role of bee diversity in pollination and fruit set of yellow passion fruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) (*Passifloraceae*) crop in central Brazil. Apidologie 43, 515-526.

ZHAO, D.; TAO, J. 2015. Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants. Frontiers in Plant Science 6, 261.