

Híbridos de passifloras UESC-HD13 confirmados pela análise de RAPD, morfologia e citogenética.

Souza, Margarete Magalhães¹; Araújo, Ioná Santos¹; Viana, Alexandre Pio²; Almeida, Alex-Alan Furtado¹; Silva, Delmira Costa¹, Pereira, Norma Eliane¹; Corrêa, Ronan Xavier¹; Santos, Eileen Azevedo³; Abreu, Priscilla Patrocínio³; Conceição, Léo Duc Haa Carson Schwartzhaupt¹; Roza, Francisvaldo Amaral⁴; Freitas, Jôsie Cloviane de Oliveira⁵.

¹Professores da Universidade Estadual de Santa Cruz - Deptº de Ciências Biológicas, Pavilhão Jorge Amado, Rod. Ilhéus-Itabuna, 45662-000, Ilhéus, BA, fone: (73) 3680-5055, email: souzamagg@yahoo.com.br; ²Professor da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) - DCAA, Campos dos Goytacazes, RJ; ³Mestrandas do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal (UESC), Ilhéus, BA; ⁴Bolsista de IC PIBIC, UESC - DCAA; ⁵Apoio Técnico AT2 FAPESB, UESC - DCB.

INTRODUÇÃO

O gênero *Passiflora* L. é o mais expressivo da família Passifloraceae, constituído por mais de 400 espécies (Nunes, 2002), das quais cerca de 200 são nativas do Brasil (Oliveira, 1987). As passifloras, conhecidas como maracujazeiros, apresentam imenso potencial ornamental, ainda pouco explorado no Brasil, que apresenta um clima propício e uma ampla diversidade genética do gênero, sendo considerado seu centro de dispersão.

Embora muitas espécies sejam nativas do Brasil, não se tem explorado seu potencial para planta ornamental. Algumas características inserem as passifloras na lista de plantas potencialmente ornamentais: flores vistosas, coloridas e exóticas, embora abram apenas uma vez e em um período do dia; número abundante de flores; florescimento mais de uma vez ao ano; folhagem exuberante (Souza e Pereira, 2003). Estudos citogenéticos em espécies do gênero *Passiflora* ainda são escassos (Melo et al., 2001; Soares-Scott et al., 2005).

A produção de híbridos interespecíficos têm sido utilizada como estratégia para obtenção de plantas com flores de beleza única, como *P.* 'Sunburst' (Vanderplank, 2000). Para ratificar a natureza híbrida é de extrema importância no programa de melhoramento a confirmação da fecundação cruzada, para isso, diversas técnicas podem ser utilizadas para identificação de híbridos, desde aquelas baseadas em caracteres morfológicos, que são mais simples e requerem um menor custo, até as que utilizam marcadores moleculares (Oliveira et al., 2000). Em casos como os de genótipos híbridos, a confirmação da fecundação cruzada pode ser feita por meio de características de natureza dominante e de fácil visualização que sejam contrastantes entre as espécies envolvidas (genes marcadores). Porém, na ausência de tais características ou na impossibilidade de avaliação das mesmas rapidamente, ou em determinada fase da planta, marcadores moleculares de DNA têm sido utilizados com relevante sucesso (Alzate-Marín, 1996).

Esse trabalho teve como objetivos descrever híbridos UESC-HD13 e confirmar sua natureza híbrida utilizando marcador molecular RAPD, análise da segregação de características morfológicas e da variação cariotípica.

MATERIAL E MÉTODOS

Quatro plantas de cada genitor e vinte plantas híbridas de *P. foetida* x *P. palmeri* foram analisadas, tendo sido obtidos dados preliminares. As características morfológicas observadas foram: área foliar (AF) em cm²; Largura da folha (LF), comprimento de folha (CF), diâmetro da flor (DF), comprimento da flor (CFL), diâmetro da corona (DC), comprimento do fio da corona (CFC) e comprimento do pedúnculo (CP) em mm; cor da folha (CFO), cor da corona (CCO) e cor das pétalas (CPE) pela Carta de Cores de Munsell para Tecidos Vegetais. As aferições foram realizadas nos genitores e em dois híbridos F₁: UESC-HD13-101, flores brancas, e UESC-HD13-103, flores com detalhes em rosa.

O DNA genômico foi extraído, a partir de tecido foliar, utilizando-se o método CTAB (Doyle e Doyle, 1990) com algumas modificações (Viana et al., 2006). As reações de amplificação para RAPD foram realizadas utilizando-se 7 primers (Tabela 1). Os marcadores moleculares gerados pelos diferentes primers foram analisados quanto à presença ou não de bandas informativas para a confirmação da fecundação cruzada. As bandas informativas são alelos presentes no genitor masculino e ausentes no feminino, cuja presença nas plantas supostamente híbridas confirmam a fecundação cruzada. Foram consideradas bandas informativas somente aquelas com reprodutibilidade.

As amostras para as análises citogenéticas foram obtidas pelo método do esmagamento em pontas de raízes pré-tratadas com 8-Hidroxiquinolina por 22h e fixadas em Carnoy, sendo coradas pelo método de Feulgen e contra-coradas com carmim acético 2%. As lâminas foram transformadas em permanente imergindo-as em ácido acético glacial 20% até a liberação da lamínula, em seguida transferidas para etanol 80 e 100% por 12 segundos cada. As metáfases mitóticas foram fotografadas no Laboratório de Citogenética da UESC no microscópio *Leica* DM RA2 em objetivas de 60 e 100x, ambas com zoom de 1,0x; 1,25x; 1,6x.

Tabela 1. Seqüência dos sete primers decâmeros RAPD utilizados para a confirmação da fecundação cruzada.

Primer	Seqüência 5'-3'
Primer 3	5'- CCTGGGTCCA -3'
Primer 4	5'- CCTGGGTGGA -3'
Primer 6	5'- GCCCGGTTTA -3'
Primer 11	5'- CCGGCCTTAC -3'
Primer 17	5'- CTACCCGTGC -3'
Primer 23	5'- GTCCACACGG -3'
Primer 25	5'- ACCCCGCGC -3'

RESULTADOS

Os dados médios para as características morfológicas dos híbridos são apresentados na Tabela 2. Embora os dados referentes às características morfológicas ainda não sejam conclusivos, algumas características nos híbridos, como AF, LF, CF e CP, apresentaram valores médios próximos aos encontrados para um dos genitores, indicando interação alélica aditiva, enquanto as outras características apresentaram valores intermediários ou superiores aos dos genitores, indicando assim algum grau de dominância.

Tabela 2. Dados médios para as características morfológicas analisadas nos genitores e nos híbridos.

Híbridos	Características analisadas										
	AF	LF	CF	DF	CFL	DC	CF C	CP	CFO	CCO	CPE
<i>P. foetida</i>	33,8	63,9	77,1	37,3	11,1	27,1	9,5	26,0	5GY 5/10	Branca + 5RP 8/2	A carta de Munsell não se aplicou
<i>P. palmeri</i>	33,4	56,8	90,6	97,7	40,6	26,1	8,2	81,7	7.5GY 4/4	Branca	
UESC-HD13-101	32,3	61,2	95,0	70,6	23,0	33,6	13,9	72,4	5GY 4/8	Branca + 5RP 3/8	
UESC-HD13-103	32,4	60,5	97,7	69,1	25,4	33,6	13,9	94,8	5GY 4/8	Branca + 5RP 3/8	

Os marcadores RAPD mostraram-se excelentes ferramentas para verificar a ocorrência ou não da fecundação cruzada entre *Passiflora palmeri* e *Passiflora foetida*. Dos sete primers RAPD utilizados, o primer 11 gerou uma banda informativa para a confirmação da fecundação cruzada (Figura 1).

A ausência de bandas informativas em produtos de amplificação gerados pelos demais primers ocorreu por causa da ausência de polimorfismo de bandas de *Passiflora palmeri* e *Passiflora foetida*, da ausência de amplificação ou da ocorrência de produtos

fracos e com baixa reprodutibilidade. O uso de um ou dois primers com pelo menos uma banda informativa é suficiente para confirmar ou não a ocorrência da fecundação cruzada (Faleiro et al., 2003). Alzate-Marín (1996) propôs uma metodologia para confirmar a fecundação cruzada entre cultivares de feijão e soja com base na amplificação de uma banda RAPD informativa para cada cruzamento. A Figura 1 mostra a análise de banda informativa na confirmação da fecundação cruzada. Nota-se que, na análise, foram incluídas as amostras dos possíveis pais. Tal procedimento é importante por causa da possibilidade de haver polimorfismo intra-específico. De acordo com os resultados, das 20 plantas oriundas do cruzamento interespecífico, cinco tiveram sua fecundação cruzada confirmada até o momento.

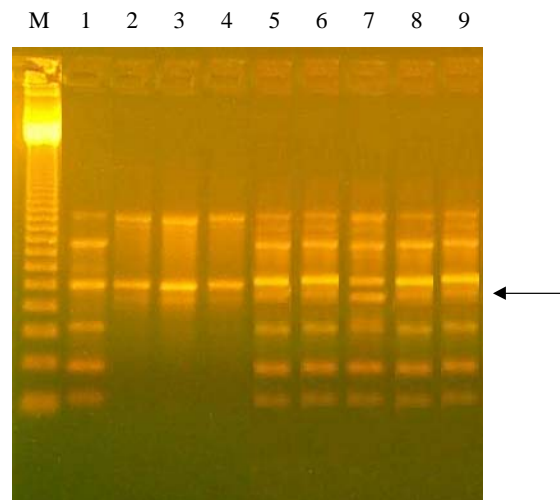


Figura 1. Produtos de amplificação de amostras de DNA gerados pelo primer decâmero RAPD (5'-CCGGCCTTAC-3'). As amostras foram extraídas de *Passiflora palmeri* como genitor feminino (1) e *Passiflora foetida* como genitor masculino (2, 3 e 4) e supostos híbridos F₁ (3 a 9). A primeira linha (M) eqüivale ao marcador de peso molecular DNA Ladder (123 pb). A seta indica a banda informativa para a confirmação dos híbridos interespecíficos

As análises citogenéticas demonstraram morfologia cromossômica diferenciada entre os genitores, *P. foetida* ($2n = 22$) e *P. palmeri* ($2n = 22$), e os híbridos ($2n = 20$ ou $2n = 22$). As fórmulas cariotípicas encontradas foram: *P. foetida* e *P. palmeri*, 20M + 2SM; UESC-HD13, 16M + 6SM ($2n = 22$) ou 18M + 2SM ($2n = 20$). O comprimento haplóide (CH) em *P. foetida*, *P. palmeri* e nos híbridos $2n = 22$ e $2n = 20$ foi de 12,48 μm ; 15,58 μm ; 13,58 μm e 12,43 μm , respectivamente. A variação cariotípica encontrada nos híbridos indica perda de um par de cromossomos em alguns genótipos, e tamanho menor do CH mais aproximado aos valores encontrados no genitor masculino.

CONCLUSÃO

A hibridação interespecífica utilizando *P. foetida* e *P. palmeri* como genitores foi bem sucedida, podendo ser comprovada devido a: segregação das características analisadas nos híbridos, obtenção de banda informativa (primer 11) e variação cariotípica dos híbridos em relação aos pais.

AGRADECIMENTOS

À UESC, FAPESB e CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALZATE-MARÍN, A.L. Use of RAPD-PCR to identify true hybrid plant from crosses between closely related progenitors. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 624-623, 1996.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12: 13-15, 1990.

FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando a confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma cacao* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotrópica**, v.15, n. 1, p. 41-46, 2003.

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

NUNES, T.S. **A família Passifloraceae no estado da Bahia, Brasil**. 2002. 159f. Dissertação (mestrado em Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2002.

OLIVEIRA, J.C. Melhoramento genético. In: RUGGIERO, C. (Ed.), **Maracujá**. Ribeirão Preto; Legis Summa, p. 218-246, 1987.

OLIVEIRA. R. P.; NOVELLI. V. M.; MACHADO. M. A. Frequência de híbridos em cruzamento entre tangerina 'Cravo' e laranja 'Pêra'. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.9, p.1895-1903, 2000.

SOARES-SCOTT, M.D.; MELETTI, L.M.M.; BERNACCI, L.C.; PASSOS, I.R.S. Citogenética clássica e molecular em passifloras. In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Eds.), **Maracujá, germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: EMBRAPA, p. 213-239, 2005.

SOUZA, M.M.; PEREIRA, T.N.S. Passifloras como plantas ornamentais. In: Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais, 14, 2003, Universidade Federal de Lavras. **Anais...** Lavras: SBFPO, p. 24, 2003.

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

VIANA, A. J. C. ; ARAÚJO, I. S. ; SOUZA, M. M. ; AHNERT, D. ; CORRÊA, R. X. Otimização da extração de DNA de espécies de *Passiflora* L. visando obtenção de marcadores RAPD. In: 2º Workshop de Recursos Genéticos Vegetais no Estado da Bahia, Ilhéus/BA. Magistra. Cruz das Almas/BA : **Magistra**, v. 18. p. 88-88, 2006.

PALAVRAS-CHAVES

Passiflora spp.; maracujazeiro, híbrido interespecífico; RAPD; cariótipo.