

CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS EM *TACINGA* BRITTON & ROSE (CACTACEAE)

Autor (1) José Achilles de Lima Neves; Co-autor (1) Lânia Isis Ferreira Alves; Co-autor
(2) Erton Mendonça de Almeida; Co-autor (3) José Clayton Ferreira Alves;
Orientadora (4) Fabiane Rabelo da Costa Batista

(1) Autor Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Centro de Ciências Agrárias, Rodovia PB-079, Areia - PB, 58397-000, Brasil. achillesneves@gmail.com

(1-4) Co-autore e orientador. Instituto Nacional do Semiárido (INSA), Av. Francisco Lopes de Almeida, s/n, Bairro Serrotão, Campina Grande, PB 58429-970, Brasil. lania.alves@insa.gov.br; erton.almeida@insa.gov.br; joseclaytonfalves@hotmail.com; fabiane.costa@insa.gov.br

Resumo

A hibridação e introgressão entre espécies vegetais é um evento extremamente comum, e importante fonte de variações e surgimento de novas espécies, sendo crucial a adequada identificação dos híbridos. Objetivando o reconhecimento de zonas de hibridação, foram caracterizados citogeneticamente três possíveis nototaxons de *Tacinga*, através do bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI. Nesse estudo foram apontadas três supostas zonas de hibridação, sendo uma localizada na Paraíba (Assunção), outra Bahia (Morro do Chapéu) e Minas Gerais (Pedra Azul), em duas quais *T. inamoena* encontra-se envolvida como um dos parentais, provavelmente em decorrência da sua relação de proximidade com as demais espécies do gênero. Os híbridos diferiram quanto ao número, fórmula cariotípica e padrões de distribuição de bandas heterocromáticas. A hibridação entre espécies de *Tacinga* tem sido eventualmente observada em campo, e pode representar um importante mecanismo de variação morfológica e especiação, particularmente depois de algumas gerações de retrocruzamentos. *Tacinga inamoena*, parecendo ser, um excelente material para o estudo de complexo de espécies, especialmente, quando se investiga complexos poliplóides em que as espécies tetraploides são mais frequentemente híbridos que parecem relacionados à evolução reticulada.

Palavras-chaves: Morfotipos, hibridação e complexos poliplóides.

Introdução

A hibridação e introgressão entre espécies vegetais é um evento extremamente comum, e importante fonte de variações e surgimento de novas espécies, sendo crucial a adequada identificação dos híbridos (Lugon-Moulin et al., 1999), particularmente depois de algumas gerações de retrocruzamentos (Lambert, 2009). Em *Tacinga*, híbridos interespecíficos tem sido eventualmente observado em campo, principalmente envolvendo, *T. inamoena* como primeira espécie parental, e *T. palmadora*, *T. weneri* ou *T. saxatilis* como a segunda espécie parental (Taylor et al., 2002; Taylor & Zappi, 2004; Teran & Loayza, 2008). O gênero *Tacinga* Britton & Rose compreende oito espécies, das quais sete são endêmicas para o leste do Brasil, e uma endêmica para o

(83) 3322.3222

contato@conidis.com.br

www.conidis.com.br

Nordeste da Venezuela. São arbustos, subarbustos e lianas, com cladódios complanado ou cilíndrico, geralmente segmentado, possuem abundantes gloquídios em suas aréolas, frutos globosos ou alongados com gloquídios e poucas sementes (Taylor & Zappi, 2004). São importantes componentes da fisionomia do semiárido brasileiro (Nobel & Bobich, 2002), com papel destacado na ecologia e sustentabilidade desses ecossistemas, como fonte de alimento e água para diversos animais, contribuindo para a formação de solo sobre inselbergues, permitindo o estabelecimento de varias outras plantas (Zappi et al., 2011). A investigação da composição genética de espécies morfológicamente similares, através da caracterização cromossômica pelo bandeamento CMA/DAPI, permite auxiliar na delimitação de táxons próximos, como nos gêneros *Epidendrum* (Assis et al., 2013) e *Ameroglossum* (Almeida et al., 2016), bem como, podem formular hipóteses sobre os eventos e mecanismos que fazem com que o limite entre as espécies surja e sejam mantidos ou contornado (Moraes et al., 2013). Além disso, zonas de hibridação naturais (locais onde ocorre o contato entre duas espécies e potencialmente o seu intercruzamento) apresentam uma excelente oportunidade para a investigação do processo de especiação e avaliação das barreiras reprodutivas que atuam na manutenção da delimitação das espécies (Lugon-Moulin et al., 1999; Moraes et al. 2013).

Neste sentido, o presente trabalho objetivou a caracterização citogenética de três possíveis híbridos no gênero *Tacinga*, através do bandeamento com os fluorocromos CMA/DAPI, visando reconhecimento de zona de hibridação no Semiárido brasileiro.

Metodologia

Os exemplares de três possíveis notoespecies (híbridos) foram coletado na Paraíba, Bahia e Minas Gerais. Todas as amostras vivas estão sendo cultivadas no Cactário Guimarães Duque do Instituto Nacional do Semiárido (INSA). As exsiccatas de todo material estudado foram depositadas no Herbário Prof. Jayme Coelho de Moraes (EAN) no CCA/UFPB.

Para as análises cromossômicas, pontas de raízes, foram pré-tratadas com 8HQ por 20 h a 4 °C, fixados em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 2 a 24 h, à temperatura ambiente e estocados a -20 °C no próprio fixador. Para a preparação das lâminas, as raízes fixadas foram lavadas em água destilada, digeridas em solução enzimática e esmagadas em uma gota de ácido acético 45 %, congeladas em nitrogênio líquido para a remoção da lamínula, secas ao ar e envelhecidas por três dias. Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com 10 µL de CMA₃ (0,1 mg/mL) durante 1 h, lavadas em água destilada, secas ao ar, coradas com 10 µL de DAPI (1

$\mu\text{g/mL}$) por 30 min e montadas em glicerol/tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v). As imagens das melhores células foram capturadas em fotomicroscópio Zeiss, com câmera de vídeo Axio Cam MRC5, usando o *software* Axiovision 4.8. As medições cromossômicas foram realizadas com o auxílio do software Image Tool® (<http://ddsdx.uthscsa.edu/DIG/download.htm>). A fórmula cariotípica foram determinadas a metodologia proposta por Guerra (1988).

Resultados e Discussão

As análises citotaxonomias indicam três prováveis zonas híbridas localizadas em Assunção, PB, Morro do Chapéu, BA e Pedra Azul, MG, respectivamente. Os híbridos foram aqui referidos como: *T. inamoena* x *T. weneri* (Híbrido 1), *T. inamoena* x *T. weneri* (Híbrido 2) e *T. palmadora* x *T. weneri* (Híbrido 3), em decorrência da distribuição dessas espécies que se sobrepõem. Os híbridos diferiram quanto ao número, fórmula cariotípica e padrões de distribuição de bandas heterocromáticas. O híbrido 1 (*T. palmadora* x *T. inamoena*) apresentou $2n = 44$ (2SM + 42M), quatro bandas CMA⁺/DAPI⁻ terminais, e duas bandas CMA⁺ intersticiais. O híbrido 2, *T. palmadora* x *T. weneri*, com $2n = 44$ (4SM + 40M) apresentou diferentemente, do primeiro híbrido, três bandas CMA⁺ terminais e duas bandas CMA⁺ intersticiais, e possui cromossomos maiores (2,10 – 3,55 μm) que os híbridos 1 e 3. Por último, híbrido 3 (*T. inamoena* x *T. weneri*) com $2n = 55$ (6SM + 49M), apresentou duas bandas CMA⁺ terminais e uma única banda CMA⁺ intersticial heteromórfica (Tabela 1; Fig. 1A-C).

Os híbridos 1 e 3 apresentaram caracteres morfológicos e número cromossômico e padrão de bandas heterocromáticas intermediários à seus parentais, e parecem ser a primeira geração híbrida (F1) entre estas espécies envolvidas (ver Fig. 2 A e C). O híbrido 1, pode ser o resultado da união de uma gameta normal ($n = 22$) de *T. inamoena* (P1) com um núcleo não reduzido ($n = 22$) de *T. palmadora* (P2) (Fig 2A), assim como, o híbrido 3, pode ser o resultado da fusão entre um gameta normal ($n = 22$) de *T. inamoena* (P1) com outro gameta normal ($n = 33$) de *T. weneri* (P2) (Fig.2 C). Entretanto, o híbrido 2, não apresentou cariótipo intermediário quanto ao número de bandas CMA⁺ terminais em relação aos seus parentais, e embora sejam discretas, tais diferenças sugerem a ocorrência de introgressão (*hibridação introgressiva*), derivadas de retrocruzamentos repetidos de gerações F1 e F2 de híbridos de *T. palmadora* x *T. weneri*, com um dos parentais, provavelmente, *T. palmadora*, até a terceira geração F3 (Fig.2B). Embora não se tenha sido registrado na literatura, híbridos entre *T. palmadora* e *T. weneri* (Taylor et al., 2002;

Taylor & Zappi, 2004), os dados citológicos analisados nesse estudo, permitem corroborar com a idéia que estes eventuais híbridos entre *T. palmadora* e *T. werner*, simplesmente ainda não foram reconhecidos em campo, em virtude da grande similaridade morfológica entre esses táxons suportada relação de parentesco (espécies consideradas irmãs) e distribuição fitogeográfica (distribuição simpátrica) (Teran & Loayza, 2008; Lambert, 2009), uma vez que, a observação apenas das características vegetativas parece ser insuficiente para reconhecimento desses híbridos.

Além disso, a caracterização da composição de zonas híbridas (regiões onde há cruzamentos entre espécies distintas) em diferentes classes (F1, F2, híbridos de gerações posteriores e retrocruzamentos), fornece informações acerca do fluxo gênico potencial que podem ajudar no esclarecimento dos processos que mantêm ou dissolvem as barreiras reprodutivas entre as espécies (Lugon-Moulin et al., 1999). Em casos onde a introgressão ocorre por várias gerações em uma determinada população, em zonas hibridação, pode ocorrer o desaparecimento dos táxons parentais e a substituição destes por híbridos (Lambert, 2009). Um exemplo disso foi relatado na literatura para *Melocactus glaucescens* (Taylor & Zappi, 2004) e *Melocactus paucispinus* (Lambert, 2009), pois já não se registra mais indivíduos puros dessas espécies em supostas zonas hibridação em algumas de suas populações em Morro do Chapéu, Bahia.

Conclusões

As análises citotaxonomicas do presente estudo identificaram três prováveis zonas híbridas localizadas em Assunção, PB, Morro do Chapéu, BA e Pedra Azul, MG, envolvendo *T. inamoena* como primeira espécie parental, e *T. palmadora* ou *T. Werner* como segundo parental, indicando que espécies parentais geneticamente próximas e com certa homologia cromossômica, que minimize os problemas de incongruidade ou incompatibilidade de cruzamento são passíveis de hibridação, sobretudo quando sua distribuição geográfica se sobrepõem.

Fomento



Referências

- ALMEIDA, E. M.; WANDERLEY, A. M.; NOLLET, F.; COSTA, F. R.; SOUZA, L.G.R.; FELIX, L. P. A New Species of *Ameroglossum* (Scrophulariaceae) Growing on Inselbergs in Northeastern Brazil. *Systematic Botany*. 2016, 41: 423-429.
- ASSIS, F. N. M.; SOUZA, B. Q. C.; MEDEIROS-NETO, E.; PINHEIRO, F.; BARROS-SILVA, A. E.; FELIX, L. P. Karyology of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae: Laeliinae) with emphasis on subgenus *Amphiglottium* and chromosome number variability in *Epidendrum secundum*. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2013, 172: 329-344.
- GUERRA, M. S. Introdução à citogenética geral. *Guanabara Koogan: Rio de Janeiro*, 1988.
- LUGON-MOULIN, N., A. Wytenbach, H. Bruñner, J. Goudet, and J. Hausser. Study of gene flow through a hybrid zone in the common shrew (*Sorex araneus*) using microsatellites. *Hereditas*. 1999, 125: 159-168.
- LAMBERT, S. *Tacinga*: The hummingbird-pollinated prickly pear. *Cactus and Succulent Journal*. 2009, 81: 156-161.
- MORAES, A.P.; CHINAGLIA, M.; PALMA-SILVA, C.; PINHEIRO, F. Interploidy hybridization in sympatric zones: the information of *Epidendrum fulgens* x *E. puniceoluteum* hybrids (Epidendroideae, Orchidaceae). *Ecology and Evolution*. 2013, 3: 3824-3837.
- NOBEL, P.S.; BOBICH, E.G. *Environmental Biology*. In: Nobel P.S. (Ed.). *Cacti: Biology and Uses*. Los Angeles: University of California Press. 2002.
- TAYLOR, N.; ZAPPI, D. *Cacti of Eastern Brazil*. Royal Botanic Gardens, Kew. 2004.
- TAYLOR, N.P.; STUPPY, W.; BARTHLOTT, W. Realignment and revision of the Opuntioideae of Eastern Brazil. In D. Hunt & N.P. Taylor (eds.). *Succulent Plant Research*. Milborne Port, D. Hunt. 2002, 6: 99-132.
- TERÁN, A.; LOAYZA, A. P. Diversidade genética e morfológica, filogeografia e filogenia de *Tacinga Britton & Rose* (Cactaceae: Opuntioideae), gênero endêmico do bioma caatinga no leste do Brasil. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 2008, 5: 4-8.
- ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; RIBEIRO-SILVA, S.; MACHADO, M.; MORAES, E.M.; CALVENTE, A.; CRUZ, B.; CORREIA, D.; LAROCCA, J.; ASSIS, J.G.A.; AONA, L.; MENEZES, M.O.T.; MEIADO, M.; MARCHI, M.N.; SANTOS, M.R.; BELLINTANI, M.; COELHO, P.; NAHOUM, P.I.; RESENDE, S. Plano de ação nacional para a conservação das cactáceas. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2011.

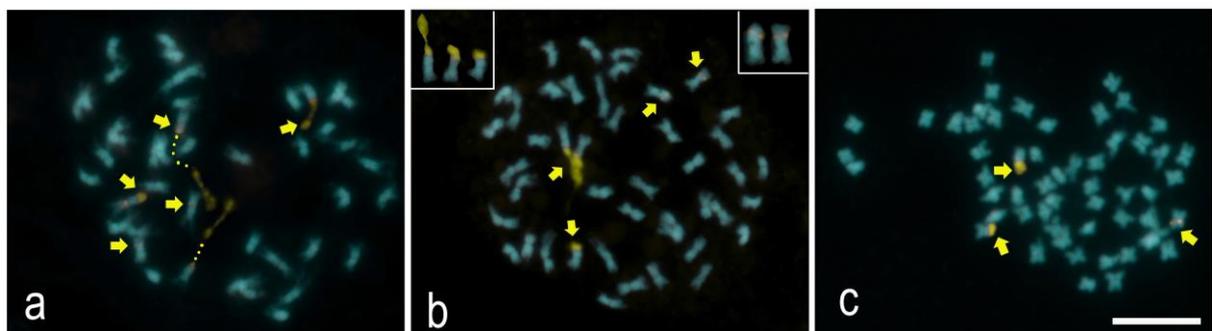


Figura 1: Células metafásicas de três possíveis híbridos de *Tacinga* coradas com CMA (amarelo) e DAPI (azul). **a.** Híbrido 1: *T. inamoena* x *T. palmadora* com $2n = 44$ (2SM + 42M) coletado em assunção, PB. **b.** Híbrido 2: *T. palmadora* x *T. wernerii* com $2n = 44$ (4SM + 40M) coletado em Morro do Chapéu, BA. **c.** Híbrido 3: *T. inamoena* x *T. wernerii* com $2n = 55$ (6SM + 49M) coletado em Pedra Azul, MG. Tracejado em “a” indica a distensão de bandas CMA terminais distendidas. Insetos e setas amarelas destacam as bandas CMA⁺ terminais e intercalares. A barra em “c” corresponde a 10µm.

Tabela 1: Nototaxons analisados de *Tacinga*, número do coletor, local de coleta, dados cariológicos e contagens prévias.

Nototaxons	Número do coletor	Local de coleta *	2n	Formula Cariotípica (FC)	Variação do tamanho cromossômico (µm)	Padrões de Bandas**		Contagens prévias***
						CMA ⁺ /DAPI ⁻	CMA ⁰ /DAPI ⁻	
Híbrido 1 (<i>T. palmadora</i> x <i>T. inamoena</i>)	EMA 1604	Assunção, PB	44	2SM + 42M	0,78 – 1,72	4t+2i	22pe	<u>44</u> (PT)
Híbrido 2 (<i>T. palmadora</i> x <i>T. wernerii</i>)	EMA 1829	Morro do Chapéu, BA	44	4SM + 40M	2,10 – 3,55	3t + 2i	22pe	<u>44</u> (PT)
Híbrido 3 (<i>T. inamoena</i> x <i>T. wernerii</i>)	EMA 1980	Pedra azul, MG	55	6SM + 49M	1,28 – 2,59	2t+1i	22pe	<u>44</u> (PT)

* **Local de coleta:** : Sigla dos estados brasileiros: PB = Paraíba; BA = Bahia; MG = Minas Gerais. ****Abreviações em padrões de bandas:** i = intersticial; pe = pericentromérica; t = terminal. *** **Contagens prévias:** Números sublinhados referem-se ao o número cromossômico inédito (2n), e PT (Presente trabalho). **H** = Híbrido.