

ESTABILIDADE DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA EM SEIS ACESSOS DE CARQUEJA¹

Stability of Genetic Divergence in Six Baccharis myriocephala Accessions

CASTRO, H.G.², SILVA D.J.H.³, FERREIRA, F.A.³ e RIBEIRO JÚNIOR, J.I.⁴

RESUMO - A variabilidade genética entre seis acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala*) foi avaliada por meio de métodos multivariados, utilizando-se caracteres isozimáticos e descritores botânico-agronômicos. A estabilidade da divergência genética entre os acessos de carqueja foi estimada em cinco épocas de colheita e a caracterização isozimática foi realizada aos nove meses após transplante das mudas. Em cada época de colheita, foram avaliadas as características morfológicas, fitomassa verde, altura e área foliar, utilizando duas plantas de cada acesso. Com relação às características morfológicas, foram formados dois grupos na época 1, quatro grupos na época 2 e três grupos nas épocas 3, 4 e 5. Em relação à análise isozimática, apenas o sistema esterase, entre os testados, apresentou resolução, tendo sido formados dois grupos. Constatou-se, portanto, que a utilização dos descritores botânico-agronômicos aos 145 dias após transplante foi mais eficiente na discriminação dos acessos, com a formação de quatro grupos de acessos. Verificou-se o potencial das isozimas como marcadores genéticos em *Baccharis myriocephala*, permitindo a utilização destas para caracterização de variedades em complementação a características morfológicas.

Palavras-chave: recursos genéticos, divergência genética, *Baccharis myriocephala*, métodos multivariados.

ABSTRACT - The genetic variability among six accesses of "carqueja" (*Baccharis myriocephala*), was evaluated by multivariate methods using isozymatic characters and morphological descriptors. The genetic divergence stability among the "carqueja" accesses was estimated in five harvesting times and the isozymatic characterization was carried out nine months after transplanting. In each harvesting time, the following morphological characteristics were evaluated: fresh matter mass, height and foliar area making use of two plants per access. As for the morphological characteristics, two groups were formed in time 1, four groups in time 2 and three groups in times 3, 4 and 5. For the isozymatic analysis, only the esterase system, among the tested systems, presented satisfactory resolution and two groups were formed. It was observed that the use of morphological descriptor at 145 days after transplanting showed more efficacy in discriminating by forming four groups of accesses. The isozyme potencial as a genetic marker in *Baccharis myriocephala*, was also verified, allowing its use in the characterization of varieties to complement morphological characteristics.

Key words: genetic resources, genetic divergence, *Baccharis myriocephala*, multivariate methods.

INTRODUÇÃO

Estudos acerca da divergência genética são importantes em programas de melhoramento, por fornecerem parâmetros para identificação de progenitores, que, quando cruzados,

possibilitam maior efeito heterótico na progênie e maior probabilidade de recuperar genótipos superiores nas gerações segregantes (Cruz, 1990). A avaliação da divergência genética também é de grande valia no estudo da evolução das espécies, uma vez que provê

¹ Recebido para publicação em 30/10/2001 e na forma revisada em 15/3/2002.

² Doutorado em Fitotecnia pela Universidade Federal de Viçosa – UFV, 36571-000 Viçosa-MG; ³ Prof. do Dep. de Fitotecnia da UFV; ⁴ Prof. do Dep. de Informática da UFV.



informações a respeito de recursos disponíveis e auxilia na localização e no intercâmbio desses recursos (Falconer, 1987).

Para a escolha dos progenitores nos cruzamentos, tem sido dada ênfase às suas divergências genéticas, por constituírem indicativos de que os progenitores, quando cruzados, proporcionarão alto efeito heterótico aos seus híbridos. Nesse aspecto, o desenvolvimento de técnicas estatísticas, como as multivariadas, tem possibilitado melhor aproveitamento da diversidade existente, o que significa maior oportunidade de êxito na escolha de parentais divergentes em programas de melhoramento (Amaral Jr. et al., 1994; Silva et al., 2001).

Para avaliar a diversidade biológica podem-se utilizar descritores agronômicos, botânicos e moleculares. Entre estes, as isozimas (marcadores bioquímicos) complementam as informações fornecidas pelas características morfológicas, identificando quais acessos seriam utilizados prioritariamente nos programas de melhoramento (Peters et al., 1992; Peirce & Brewbaker, 1973; Brown, 1978).

O gênero *Baccharis* inclui mais de 500 espécies, as quais são encontradas nas Américas do Sul e Central (Westman et al., 1975; Silva & Grotta, 1971). No Brasil, ocorrem cerca de 120 espécies, concentrando-se na Região Sul, sendo o Paraná considerado centro de dispersão no País (Barroso, 1991; Castro, 1998).

A carqueja (*Baccharis myriocephala*), espécie sul-americana, é considerada invasora de pastagens, sendo adaptada a lugares abertos ou campo. Apresenta uso medicinal difundido pela medicina popular ou em programas oficiais de saúde pública, sendo estomáquica e hipoglicemiante (Sá, 1992; Castro & Ferreira, 2000).

Este trabalho teve por objetivo estudar a variabilidade genética entre seis acessos de carqueja por meio de caracteres isozimáticos e de descritores botânico-agronômicos, utilizando métodos multivariados.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e cultivo dos acessos

Foram estudados seis acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala*), família Compositae, coletados no município de Viçosa-MG, nas

localidades denominadas Paraíso e Cristal, em áreas de pastagem. A identificação específica foi feita pelo biólogo Roberto Lourenço Esteves, e as exsicatas foram depositadas no herbário da Universidade Federal de Viçosa.

O preparo das mudas foi realizado em área do viveiro de plantas ornamentais da Universidade Federal de Viçosa, propagadas vegetativamente por estaquia em saquinhos de polietileno, tendo como substrato uma mistura de terra, areia e esterco, na proporção 1:1:1. O preparo das mudas abrangeu o período de 5 de outubro a 27 de novembro, quando se fez o transplante.

Análise isozimática

A coleta das amostras foi realizada nove meses após transplante das mudas. Foram escolhidas aleatoriamente nove plantas de cada acesso para a análise isozimática, realizada no Laboratório de Melhoramento do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Os sistemas testados foram: esterase (EST), malato desidrogenase (MDH), fosfatase ácida (ACP), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), chiquimato desidrogenase (SKDH), leucina aminopeptidase (LAP) e peroxidase (PO).

As amostras, constituídas pela porção apical dos ramos com comprimento em torno de 3 cm, foram coletadas com auxílio de tesoura e imediatamente acondicionadas em caixa de isopor com gelo. No laboratório, as amostras foram maceradas no mesmo dia da coleta em almofariz de porcelana previamente resfriado e mantido à baixa temperatura (cerca de 5 °C). Nesse processo, utilizou-se cerca de 1 mL da solução-tampão extratora em 0,8 g de amostra e aproximadamente 0,3 g de PVPP (polivinil polipirrolidona) (Alfenas et al., 1991). A solução-tampão extratora foi composta por 34 mM de fosfato de sódio bibásico, 0,2 M de sacarose, 2,56% de PVP- 40, 3 mM de DTT, 5,7 mM de ácido ascórbico, 5,8 mM de DIECA, 2,6 mM de bissulfito de sódio, 2,6 mM de borato de sódio, 0,2% de mercaptoetanol, 1% de polietilenoglicol e água deionizada. O extrato foi absorvido em retângulos de papel cromatográfico Whatman 3M, com dimensões de 1,2 x 0,5 cm, que foram colocados em tubos Eppendorf e armazenados a -80 °C.

Os retângulos de papel contendo o extrato foram colocados em gel de amido de milho a 12%. Nas duas extremidades do gel aplicou-se uma tira de papel embebida em azul-de-bromofenol, para permitir a visualização da frente de migração. Em seguida, procedeu-se à junção das partes cortadas, para dar início à corrida eletroforética realizada a 4 °C (Shaw & Prasad, 1970; Soltis et al., 1983).

Os géis foram examinados em diafanoscópio, e os sistemas com boa resolução, selecionados para a preparação dos zimogramas. As medidas nos géis foram transferidas para o papel milimetrado e procedeu-se à interpretação das bandas.

Análise morfológica

Foram avaliados três descritores botânico-agronômicos (massa da matéria fresca da parte aérea, área foliar e altura), utilizando duas plantas de cada acesso, em cinco épocas de colheita. O experimento foi conduzido dos 117 aos 229 dias após transplante (DAT), sendo as colheitas realizadas em intervalos regulares de 28 dias.

Na obtenção da área foliar total por planta foi, inicialmente, ajustada uma equação de regressão aos dados de comprimento dos ramos (C), largura média dos ramos (L) e área foliar dos ramos trialados (AF): $AF = -138,925 + 0,5323^{***}C + 1357,30^{*}L$, $R^2 = 0,6580$. A área foliar foi obtida segundo o método dos contornos foliares (Benincasa, 1988; Robbins & Pharr, 1987).

Análise estatística

A análise estatística foi feita no programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas). Para o cálculo da distância genética foi obtida a distância euclidiana média (d), nos descritores botânico-agronômicos, e o índice de Nei, nos dados isozimáticos. O agrupamento dos acessos foi realizado pelo método de Tocher.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise isozimática

Apenas o sistema esterase (EST), entre os testados, apresentou resolução satisfatória;

portanto, os outros sistemas não foram considerados neste trabalho. As esterases são um grupo heterogêneo de enzimas, com substratos naturais e funções "in vivo" desconhecidas nas plantas, muito utilizadas como marcadores, devido ao polimorfismo frequentemente detectado (Alfenas et al., 1991).

A partir dos dados isozimáticos foram formados dois grupos; o acesso E ficou como único integrante de um grupo, e os demais acessos constituíram outro grupo. O par de acessos E e F apresentou menor similaridade, e os acessos B e C formaram o par mais similar.

Análise morfológica

Época 1 (117 DAT) - dois grupos foram formados (Tabela 1). O par mais divergente foi formado pelos acessos B e D (d= 73,39), enquanto o menos divergente foi constituído pelos acessos A e F (d= 11,23). A característica que menos contribuiu para a divergência genética foi a matéria fresca (MF) (Tabela 3).

Época 2 (145 DAT)- nesta época de colheita, quatro grupos foram formados (Tabela 1), mostrando maior potencial para diferenciação dos acessos que as outras épocas. A distância média intergrupos foi superior para aquelas obtidas na época 1 (Tabela 2), mostrando maior capacidade de distinção das características. Os acessos mais divergentes foram B e C (d = 70,10), e o par menos divergente foi constituído pelos acessos A e E (d= 9,96). A característica área foliar (AF) foi a que menos contribuiu para a divergência genética, e as características matéria fresca (MF) e altura (ALT) contribuíram na mesma proporção (Tabela 3).

Tabela 1 - Agrupamento de seis acessos de *Baccharis myriocephala*, pelo método de Tocher, em relação às características botânico-agronômicas, em cinco épocas de colheita

Grupos	Épocas de colheita (DAT)				
	117	145	173	201	229
1	A, B, E, F	A, E	C, D, E, F	B, D	B, D, F, A
2	C, D	C, D	A	A, F	C
3		B	B	C, E	E
4		F			

DAT = dias após transplante.



Tabela 2 - Distância intra e intergrupos (Distância Euclidiana Média) de seis acessos de *Baccharis myriocephala*, em cinco épocas de colheita

Grupos	I	II	III	IV
I	30,71 (1)	72,74	-	-
	9,96 (2)	97,47	92,54	88,81
	44,01 (3)	95,91	81,54	-
	26,84 (4)	155,33	168,72	-
	104,34 (5)	179,67	154,98	-
II		72,94	-	-
		22,31	40,07	106,77
		0	151,55	-
		28,08	272,42	-
		0	279,64	-
III			-	-
			0	128,61
			0	-
			45,06	-
			0	-
IV				-
				0
				-
				-
				-

(1) = colheita realizada aos 117 dias após transplante (DAT).

(2) = colheita realizada aos 145 dias após transplante (DAT).

(3) = colheita realizada aos 173 dias após transplante (DAT).

(4) = colheita realizada aos 201 dias após transplante (DAT).

(5) = colheita realizada aos 229 dias após transplante (DAT).

Tabela 3 - Contribuição para a divergência genética (%), utilizando o critério de Singh (1981), das características matéria fresca (MF), área foliar (AF) e altura (ALT), de seis acessos de *Baccharis myriocephala*, em cinco épocas de colheita

Características	Épocas de colheita (DAT)				
	117	145	173	201	229
MF	26,667	46,667	26,667	26,667	33,333
AF	33,333	6,667	26,667	13,333	46,667
ALT	40,000	46,667	46,667	60,000	20,000

DAT = dias após transplante.

Época 3 (173 DAT) - três grupos foram formados (Tabela 1). O par de acessos mais divergente foi formado por A e B ($d= 151,65$), e o menos divergente, pelos acessos D e E ($d= 17,15$). As características que menos contribuíram para a divergência genética entre os acessos foram a matéria fresca e a área foliar (Tabela 3).

Época 4 (201 DAT) - três grupos foram formados (Tabela 1). O par de acessos mais divergente foi formado por A e C ($d= 265,29$), e o menos divergente, pelos acessos B e D ($d= 26,84$). A característica que mais contribuiu para a divergência genética entre os acessos foi a altura (ALT), e a que menos contribuiu, a área foliar (AF) (Tabela 3).

Época 5 (229 DAT) - três grupos foram formados nesta época de colheita (Tabela 1). O par mais divergente foi formado pelos acessos C e E ($d= 271,60$), e o par que apresentou menor divergência, pelos acessos B e D ($d= 40,95$). A característica que menos contribuiu para a divergência genética entre os acessos foi a altura (ALT), e a que mais contribuiu, a área foliar (AF) (Tabela 3).

Os pares de acessos "A e F" e "C e D" estiveram nos mesmos grupos em três épocas de colheita, mostrando similaridades entre os acessos. Em relação aos pares de acessos "A e C" e "B e C", estes não formaram grupos juntos em nenhuma época de colheita, revelando menor afinidade genética.

Analisando a estrutura e composição dos grupos formados nas diferentes épocas de colheita, pode-se observar grande variação na constituição dos grupos pelos acessos (Tabela 1). Com exceção do grupo 2, nas épocas 1 e 2, e do grupo 3, nas épocas 2 e 3, os outros grupos variaram na sua composição, mostrando a inconsistência da composição dos grupos formados nas épocas de colheita. Portanto, a divergência genética estimada entre pares de acessos de carqueja está relacionada com um determinado estágio de desenvolvimento.

Quanto à análise isozimática, os resultados mostraram certa discordância com os dados morfológicos nas épocas de colheita. De acordo com Amaral Jr. et al. (1994), os resultados disponíveis do relacionamento entre padrões de variação isozimática e os padrões de variação genética não são elucidativos, uma vez que indicam associação positiva em alguns casos, enquanto em outros inexistente associação entre a variação dos caracteres isozimáticos e as características morfológicas geneticamente controladas.

Ao comparar os grupos formados com base nos descritores botânico-agronômicos e aqueles

formados pelos caracteres isozimáticos, constatou-se que os descritores botânico-agronômicos foram mais eficientes na discriminação dos acessos, com a formação de maior número de grupos. Na análise isozimática, dois grupos foram formados, e, na análise morfológica, somente a primeira época de colheita formou dois grupos; as outras épocas formaram maior número de grupos.

A existência de variabilidade nos acessos, coletados nas condições climáticas de Viçosa-MG, fornece subsídios para a coleta sistematizada de germoplasma em *Baccharis myriocephala*. A utilização das isozimas na caracterização de variedades em *Baccharis myriocephala* pode ser feita em adição às expressões fenotípicas.

LITERATURA CITADA

- ALFENAS, A. L. et al. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1991. 242 p.
- AMARAL Jr., A. T. et al. Dissimilaridade genética de descritores botânico-agronômicos e isozimáticos em clones de couve-comum. **Hortic. Bras.**, v. 12, n. 2, p. 113-117, 1994.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1991. v. 3, 326 p.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas**. Jaboticabal: Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, 1988. 42p.
- BROWN, A. D. H. Isozymes, plant population, genetic structure and genetic conservation. **Theoret. Appl. Genet.**, v. 52, n. 4, p. 145-157, 1978.
- CASTRO, H.G. **Caracterização isozimática, crescimento e rendimento de tanino em seis acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala* D.C.)**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 119 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: carqueja (*Baccharis genistelloides*)**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 102 p.
- CRUZ, C. D. **Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1990. 188p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 1990.
- FALCONER, D. S. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1987. 279 p.
- PEIRCE, L. C.; BREWBAKER, J. L. Applications of isozyme analysis in horticultural science. **Hortscience**, v. 18, n. 1, p. 17-22, 1973.
- PETERS, I. et al. Isoenzimas de *Eucalyptus*: técnicas para extração e eletroforese. **R. Árvore**, v. 16, n. 1, p. 18-42, 1992.
- ROBBINS, N. S.; PHARR, D. M. Leaf area prediction models for cucumber from linear measurements. **HortScience**, v. 22, n. 6, p. 1264-1266, 1987.
- SÁ, M. F. A. **Estudo anatômico e ensaios fitoquímicos de *Baccharis myriocephala* D.L. carqueja**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1992. 91p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1992.
- SHAW, C. R.; PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes a compilation of recipes. **Biochem. Genet.**, v. 4, n. 2, p. 297-320, 1970.
- SILVA, D. J. H. et al. Stability of genetic divergence among eggplant accesses in three stages of development. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.**, v. 1, n. 2, p. 135-143, 2001.
- SILVA, J. B.; GROTTA, A. S. Anatomia da folha e óleo essencial de *Baccharis retusa* D.C. **R. Farm. Bioq. Univer. São Paulo**, v. 9, n. 2, p. 321-326, 1971.
- SOLTIS, D. E. et al. Starch gel electrophoresis of fern: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **Am. Fern J.**, v. 73, n. 1, p. 9-27, 1983.
- SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Ind. J. Genetic Plant Breed.**, v. 41, n. 2, p. 237-245, 1981.
- WESTMAN, W. E., PANETTO, F. O.; STANLEY, T. D. Ecological studies on reproduction and establishment of the woody weed, groundsel bush (*Baccharis halimifolia*; Asteraceae). **Aust. J. Agric. Res.**, v. 26, n. 5, p. 855-70, 1975.

