

# CARACTERIZAÇÃO ISOENZIMÁTICA DE ACESSOS DE *PF AFFIA GLOMERATA* OCORRENTES EM DOURADOS - MS

**José Hortêncio Mota<sup>1</sup>, Thelma Shirlen Soares<sup>2</sup>, Maria do Carmo Vieira<sup>3</sup>, Nestor Antonio Heredia Zarate<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Pesquisador DCR/CNPq, Universidade Federal da Grande Dourados, Departamento de Ciências Agrárias, CEP: 79800-970, Dourados-MS, hortenciomota@terra.com.br

<sup>2</sup>Professora do curso de Engenharia Florestal, Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Engenharia Florestal, Centro de Ciências Agrárias, CEP: 29500-000, Alegre-ES, thelsoares@cca.ufes.br

<sup>3</sup>Professor do curso de Agronomia, Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq, Universidade Federal da Grande Dourados, Departamento de Ciências Agrárias, CEP: 79800-970, Dourados-MS, vieiracm@terra.com.br

**Resumo-** A caracterização de germoplasma é uma ferramenta essencial para a realização de trabalhos de melhoramento genético, sendo a técnica de isoenzimas tem se mostrado eficiente e informativa para acessar a variabilidade genética de inúmeras espécies. Neste trabalho foram analisados os padrões de bandas de três sistemas enzimáticos, aEST, GOT e PO, com o objetivo de acessar a variabilidade existente em dez acessos de *Pfaffia glomerata* ocorrentes na região de Dourados no estado do Mato Grosso do Sul. A variabilidade observada foi avaliada calculando-se o índice de similaridade, considerando-se a presença ou ausência de bandas. Utilizou-se ainda o método de agrupamento pela média (UPGMA) a partir do qual foi construído um dendrograma com o auxílio do programa NTSYS. Observou-se a formação de dois grupos distintos, indicando variabilidade dentre as espécies ocorrentes na região.

**Palavras-chave:** ginseng brasileiro, *Pfaffia glomerata*, plantas medicinais, isoenzima.

**Área do Conhecimento:** Ciências Agrárias

## Introdução

Marcadores moleculares e bioquímicos têm-se mostrado de grande utilidade para a análise da variabilidade e relações genéticas em espécies vegetais (LU e PICKERSGILL, 1993; MAASS et al., 1993; PHILLIPS et al., 1993; GALGARO e LOPES, 1994; STALKER et al., 1994; MAQUET et al., 1997; SAWAZAKI et al., 1997). As isoenzimas se destacam por serem marcadores de baixo custo e relativamente simples. Além disso, permitem estimar a distribuição da diversidade genética entre populações e espécies (DUBREUIL e CHARCOSSET, 1998).

Segundo Lopes et al. (2003), o estudo dos padrões isoenzimáticos tem sido amplamente utilizado na caracterização de espécies, cultivares e de acessos de bancos de germoplasma. As técnicas isoenzimáticas têm sido também de grande importância como auxiliar na identificação quimiotaxonômica de espécies, principalmente medicinais.

No Brasil, há um enorme potencial de plantas medicinais usadas popularmente e ainda pouco estudadas pela comunidade científica. Dentre essas espécies, cita-se a *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, pertencente à família Amaranthaceae, é uma espécie perene que cresce espontaneamente principalmente entre a Região Centro-Oeste brasileira e o norte do

Estado do Paraná, podendo atingir 2,0 m de altura (SMITH e DOWNS, 1972). Devido ao formato de suas raízes, muito semelhantes às do ginseng coreano (*Panax ginseng* C.A. Meyer) e às suas propriedades tônicas e estimulantes, a *P. glomerata* é também conhecida como ginseng brasileiro.

Apesar de sua enorme importância como planta medicinal, a espécie necessita ainda de estudos relacionados ao seu comportamento genotípico e fenotípico. Assim, considerando que ainda se conhece pouco a respeito da variabilidade da *P. glomerata*, o objetivo do presente trabalho é avaliar a variabilidade genética de dez acessos, mediante a análise eletroforética de isoenzimas.

## Materiais e Métodos

Foram coletados dez acessos de *P. glomerata* em diferentes localidades, em Dourados-MS, sendo três acessos originários de mudas de plantas cultivadas em Abre Campo, Zona da Mata de Minas Gerais. Na Tabela 1 é apresentado o local de coleta de cada acesso.

Foram utilizadas folhas jovens coletadas na porção apical dos ramos das plantas. O material coletado foi previamente resfriado, e durante sua maceração foram adicionados 700 µL da solução extratora (Alfenas, 1998). Durante a maceração,

pequenas quantidades de polivinilpirrolidona (PVPP) foram adicionadas para remover compostos fenólicos e aumentar a estabilidade das enzimas. O macerado foi obtido por meio da maceração manual em almofariz de porcelana previamente resfriado e mantido sobre placa de gelo. Após a maceração, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, procedeu-se à migração das enzimas.

Tabela 1 - Identificação dos acessos de *P. glomerata*

Acesso	Local de coleta – Dourados-MS
F1	Parque Arnulpho Fioravante
F2	Parque Arnulpho Fioravante
F3	Campus da UFGD – origem MG
F4	Campus da UFGD – origem MG
F5	Campus da UFGD – origem MG
F6	Margens do Córrego Xico Viegas
F7	Margens do Córrego Xico Viegas
F8	Margens do Córrego Xico Viegas
F9	Campus da UFGD
F10	Campus da UFGD

Foram testados os sistemas enzimáticos:  $\alpha$  - esterase (aEST; EC 3.1.1.2), fosfatase ácida (ACP; EC 3.1.3.2), glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT; EC 2.6.1.1) e peroxidase (PO; EC 1.11.1.7). Todos os sistemas testados foram revelados de acordo com a metodologia descrita por Alfenas (1998).

Os géis foram confeccionados em cubas de eletroforese (Pharmacia-Hoeffer SE-600). O gel de separação foi a 12,5%, contendo 19 mL de solução estoque de acrilamida (30%); 11,5 mL de Tris-HCl 1,5 M pH 8,9; 15 mL de H<sub>2</sub>O destilada; 150  $\mu$ L de persulfato de amônio (10% p/v) e 10  $\mu$ L de TEMED. O gel de concentração foi a 4%, contendo 2,68 mL de solução estoque de acrilamida (30%); 5 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 12 mL de H<sub>2</sub>O destilada; 80  $\mu$ L de persulfato de amônio (10% p/v) e 20  $\mu$ L de TEMED. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi tris glicina. A migração foi desenvolvida a 10 mA e a 4°C para cada gel, totalizando cinco horas e trinta minutos.

Após a secagem dos géis pelo método das placas de vidro (Alfenas et al., 1991), procedeu-se à leitura das bandas, atribuindo-se os escores 1 ou 0, para presença ou ausência das bandas, respectivamente, para cada sistema enzimático e acessos analisados. Os padrões isoenzimáticos obtidos foram utilizados para a identificação dos acessos e confecção de uma matriz com os escores (1 ou 0) obtidos.

Para a estimativa da similaridade entre as cultivares, foi usado o coeficiente de Jaccard, através da similaridade de dados qualitativos (SIMQUAL). Para a análise de agrupamento, o método da média aritmética não ponderada

(UPGMA), através do agrupamento seqüencial, aglomerativo, hierárquico e exclusivo (SHAN), conforme Sneath & Sokal (1973), empregando-se o programa NTSYS v. 2.02 (Rohlf, 1998).

## Resultados

Os sistemas enzimáticos selecionados nos testes preliminares para análises foram: aEST, GOT e PO. O sistema ACP apresentou baixa atividade, evidenciada por bandas fracas no gel, sendo, portanto, desconsiderado por não apresentar resolução satisfatória.

A fim de obter uma melhor representação das bandas, procedeu-se a combinação dos diferentes padrões isoenzimáticos (sistemas aEST, GOT e PO) formando uma única matriz de presença e ausência.

Nas Figuras 1 a 5 são apresentados os zimogramas representando os padrões eletroforéticos dos sistemas testados.

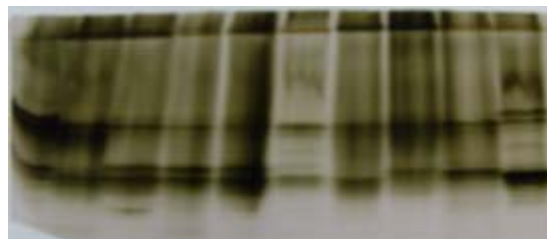


Figura 1 – Padrões eletroforéticos, sistema aEST, de *Pfaffia glomerata*.

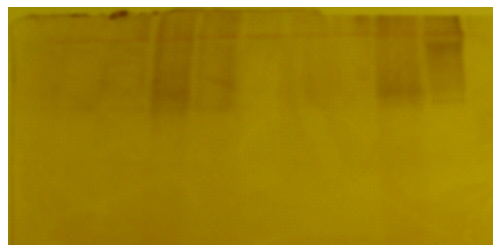


Figura 2 – Padrões eletroforéticos, sistema ACP, de *Pfaffia glomerata*.

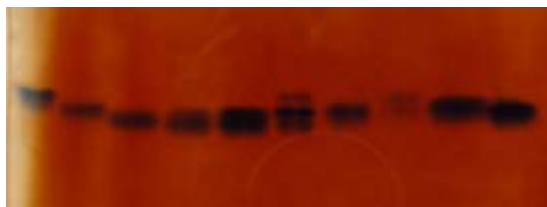


Figura 3 – Padrões eletroforéticos, sistema GOT, de *Pfaffia glomerata*.

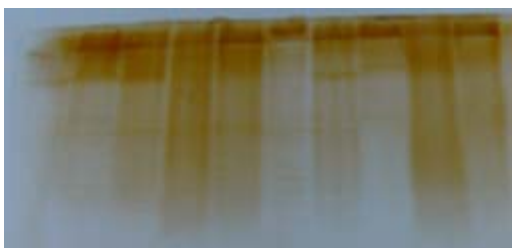


Figura 4 – Padrões eletroforéticos, sistema PO, de *Pfaffia glomerata*.

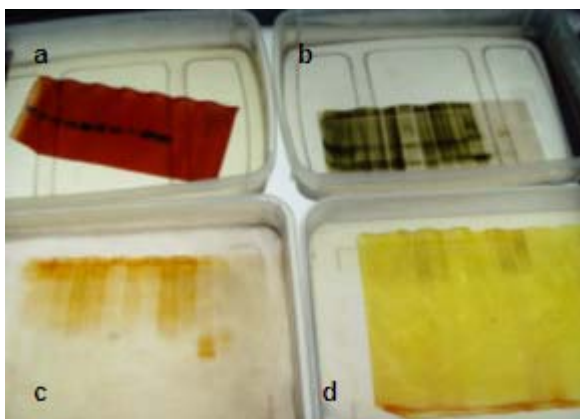


Figura 5 – Padrões eletroforéticos de *Pfaffia glomerata*. Em que: a) sistema aEST; b) sistema ACP; c) sistema GOT; d) sistema PO.

A análise de similaridade indicou coeficientes máximos e mínimos de 1,728 e 0,519 (Quadro 2). Os genótipos foram classificados em dois grupos (Figura 6).

QUADRO 2 – Similaridade genética entre nove cultivares de *Pfaffia glomerata*, estimada pelo coeficiente de Jaccard, com base na análise isoenzimática.

Gen.	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10
F1	0									
F2	1,02	0								
F3	1,46	1,34	0							
F4	1,53	1,32	0,87	0						
F5	1,51	1,23	0,75	0,52	0					
F6	1,48	1,15	1,34	1,06	0,96	0				
F7	1,16	0,84	0,95	1,19	1,04	1,15	0			
F8	1,13	1,54	1,45	1,51	1,62	1,73	1,41	0		
F9	1,16	1,39	1,50	1,41	1,29	1,39	1,31	1,19	0	
F10	1,08	1,48	1,12	1,20	1,09	1,25	1,04	1,20	1,04	0

Em que: F1 = Parque Arnulpho Fioravante; F2 = Parque Arnulpho Fioravante; F3 = Campus da UFGD – origem MG; F4 = Campus da UFGD – origem MG; F5 = Campus da UFGD – origem MG; F6 = Margens do Córrego Xico Viegas; F7 = Margens do Córrego Xico Viegas; F8 = Margens do Córrego Xico Viegas; F9 = Campus da UFGD; F10 = Campus da UFGD.

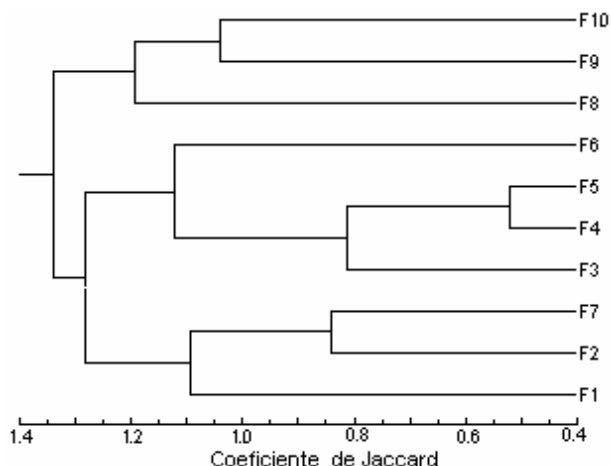


Figura 6 – Dendrograma de nove acessos de *Pfaffia glomerata*, baseado na análise isoenzimática. Em que: F1 = Parque Arnulpho Fioravante; F2 = Parque Arnulpho Fioravante; F3 = Campus da UFGD – origem MG; F4 = Campus da UFGD – origem MG; F5 = Campus da UFGD – origem MG; F6 = Margens do Córrego Xico Viegas; F7 = Margens do Córrego Xico Viegas; F8 = Margens do Córrego Xico Viegas; F9 = Campus da UFGD; F10 = Campus da UFGD.

## Discussão

Os resultados encontrados permitem estabelecer apenas dois grupos distintos. Os acessos F8, F9 e F10 constituíram o primeiro grupo, enquanto que os demais acessos formaram o segundo grupo, o qual pode ser dividido em dois subgrupos: um formado pelos acessos F1, F2 e F7, e o outro pelos acessos F3, F4 e F5, sendo estes últimos originários de mudas cultivadas em Minas Gerais. Os resultados obtidos não possibilitaram a diferenciação dos acessos F4 e F5.

Verifica-se, portanto, variabilidade entre espécie, ou seja, entre os acessos, evidenciando a importância e a eficácia da utilização da técnica de isoenzimas para a caracterização de acessos da espécie *P. glomerata*.

## Conclusão

A análise de isoenzimas em folhas permitiu o agrupamento dos acessos dos genótipos estudados.

Existe elevada similaridade entre acessos F6 e F8.

O estabelecimento de descritores confiáveis, com base em isoenzimas de diferentes partes da planta de *P. glomerata*, constitui instrumento de inestimável valor na identificação de plantas medicinais.

## Referências

- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, UFV, 1991. 242 p.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 554 p.
- DUBREUIL, P.; CHARCOSSET, A. Genetic diversity within and among maize populations: a comparison between isozyme and nuclear RFLP loci. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 96, p. 577-587, 1998.
- GALGARO, M.L.; LOPES, C.R. Isoenzymatic variability among five peanut cultivars. **Bragantia**, Campinas, v. 53, n. 2, p. 135-140, 1994.
- LOPES, C. R.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. Caracterização isoenzimática de oito acessos de erva-de-bicho. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.3, p. 433-437, 2003
- LU, J.; PICKERSGILL, B. Isozyme variation and species relationships in peanut and its wild relatives (*Arachis* L. - Leguminosae). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, p. 550-560, 1993.
- MAASS, B.L.; TORRES, A.M.; OCAMPO, C.H. Morphological and isozyme characterisation of *Arachis pintoi* Krap. & Greg. *nom. nud.* germplasm. **Euphytica**, Dordrecht, v. 70, p. 43-52, 1993.
- MAQUET, A.; BI ZORO, I.; DELVAUX, M.; WATHELET, B.; BAUDOIN, J.P. Genetic structure of a Lima bean base collection using allozyme markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 980-991, 1997.
- PHILLIPS, T.D.; MURPHY, J.P.; GOODMAN, M.M. Isozyme variation in germplasm accessions of the wild oat *Avena sterilis* L. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 86, p. 54-64, 1993.
- SAWAZAKI, H.E.; NAGAI, H.; SODEK, L. Caracterização da variabilidade genética em couve-manteiga utilizando isoenzimas e RAPD. **Bragantia**, Campinas, v. 56, n. 1, p. 9 -19, 1997.
- SMITH, L. B.; DOWNS, R.J. Amarantáceas de Santa Catarina. In: REITZ, R. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1972. 110 p.
- SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573 p.
- STALKER, H.T.; PHILLIPS, T.D.; MURPHY, J.P. Variation of isozyme patterns among *Arachis* species. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 87, p. 746-755, 1994.
- ROHLF, F. J. **NTSYSpc**: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02c. New York: Exeter Software, 1998.