

# DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE MENTRASTO AVALIADA POR CARACTERÍSTICAS BOTÂNICO-AGRONÔMICAS, MOLECULARES E FITOQUÍMICAS<sup>1</sup>

Henrique Guilhon de Castro<sup>2</sup>  
Derly José Henriques da Silva<sup>3</sup>  
Luiz Orlando de Oliveira<sup>4</sup>  
Francisco Affonso Ferreira<sup>3</sup>  
Ney Sussumu Sakiyama<sup>3</sup>  
Luiz Cláudio de Almeida Barbosa<sup>5</sup>  
José Ivo Ribeiro Júnior<sup>6</sup>

## RESUMO

Objetivou-se avaliar a divergência genética entre cinco acessos de mentrasto por métodos multivariados, utilizando-se características botânico-agronômicas, moleculares (marcadores RAPD) e fitoquímicas (teor e composição do óleo essencial). A análise de agrupamento por meio do método de Tocher, das características botânico-agronômicas, moleculares e fitoquímicas, formou dois grupos. Na análise da divergência genética por marcadores moleculares, 14 *primers* deram origem a 26 bandas polimórficas. A biomassa fresca e a biomassa seca foram as características botânico-agronômicas que mais contribuíram para a diversidade genética. As características fitoquímicas que mais contribuíram para a diversidade genética foram os compostos precoceno I e precoceno II. Verificou-se coeficiente de correlação significativo entre biomassa seca e precoceno I.

---

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 15.11.2003.

<sup>2</sup> Curso de Agronomia. Universidade Federal do Tocantins (UFT). 77402-970, Gurupi, TO.

<sup>3</sup> Dep. de Fitotecnia. Universidade Federal de Viçosa (UFV). 36570-000 Viçosa, MG.

<sup>4</sup> Dep. de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal de Viçosa (UFV). 36570-000 Viçosa, MG.

<sup>5</sup> Dep. de Química. Universidade Federal de Viçosa (UFV).

<sup>6</sup> Dep. de Informática. Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Foram constatados coeficientes de correlação não-significativos entre as características botânico-agronômicas, moleculares e fitoquímicas, com base nas distâncias dos acessos.

Palavras-chave: *Ageratum conyzoides*, marcadores RAPD, óleo essencial.

## ABSTRACT

### GENETIC DIVERSITY AMONG MENTRASTO ACCESSES BASED ON BOTANIC-AGRONOMIC, MOLECULAR AND PHYTOCHEMICAL CHARACTERISTICS

This study aimed to evaluate the genetic divergence among five mentrasto accesses by multivariate methods using botanic-agronomic, molecular (RAPD markers) and phytochemical characteristics (content and composition of essential oil). The grouping analysis by the Tocher's method in the botanic-agronomic, molecular and phytochemical characteristics, formed two groups. The analysis of genetic divergence by molecular markers using 14 primers gave rise to 26 polymorphic bands. Fresh biomass and dry biomass were the botanic-agronomic characteristics that most contributed to genetic diversity. The compounds precocene I and precocene II were the phytochemical characteristics that most contributed for genetic diversity. Significant correlation coefficients were verified between dry biomass and precocene I. No significant correlation coefficient was found between the botanic-agronomic, molecular and phytochemical characteristics on the basis of the access distances.

Key words: *Ageratum conyzoides*, RAPD markers, essential oil.

## INTRODUÇÃO

A perda de recursos genéticos é denominada erosão genética. Algumas causas da erosão genética são: o aumento da população, a extensão da fronteira agrícola, a adoção de germoplasma-elite responsável pela uniformização genética dos cultivos e a destruição dos centros de variabilidade genética. Essa perda de recursos fitogenéticos coloca em evidência a necessidade de sua conservação e caracterização (25). Estudos acerca da divergência genética são importantes em programas de melhoramento, por fornecerem parâmetros para identificação dos genitores que, quando cruzados, possibilitam maior efeito heterótico na progênie e maior probabilidade de recuperar genótipos superiores nas gerações segregantes (20).

O estudo dos recursos genéticos realizado apenas por critérios morfológicos, não considerando suas relações com outros níveis organizacionais do vegetal, como o metabolismo, dificulta o entendimento da biodiversidade e sugere a necessidade de uma nova abordagem, que envolveria o estudo interdisciplinar por meio de marcadores moleculares, quantificação dos compostos químicos mais importantes e mensuração das características morfológicas (6).

Estudos em quimiotaxonomia consistem na investigação de compostos químicos que ocorrem em plantas, com o objetivo de evidenciar ou não a relação entre elas, devendo a ênfase ser dada aos compostos predominantes da espécie (1). A padronização das épocas de colheita, da parte colhida e do cultivo, nas mesmas condições ambientes, auxilia na identificação de variedades que apresentam diferenças na composição química (12).

Outra forma de descrição da estrutura genética de populações vegetais naturais ou cultivadas é por meio de marcadores moleculares que demonstrem a variabilidade nelas presente. Com o advento das técnicas modernas de biologia molecular, surgiram diversos métodos de detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA. Essas técnicas possuem vantagens, como permitir a obtenção de grande número de marcadores moleculares e alto grau de polimorfismo, não ser influenciadas por condições ambientes e não apresentar efeito pleiotrópico (21).

A técnica do RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), DNA polimórfico amplificado ao acaso, facilitou a geração de informação sobre variabilidade no DNA. Na técnica dos marcadores RAPD, uma seqüência aleatória de 10 nucleotídeos é usada como *primer*, sem o necessário conhecimento prévio da seqüência de DNA a ser analisada. O polimorfismo é identificado pela ausência ou presença de bandas específicas de DNA, que são separadas por eletroforese em gel de agarose e visualizadas sob luz ultravioleta. O polimorfismo pode ser ocasionado por diferenças ocorridas entre ou no sítio de ligação do *primer*, em razão das mutações de ponto, deleções e inserções, ou da inexistência de tal sítio (5).

O mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.) é planta nativa da América com adaptação a diversas condições ambientes, estabelecendo-se em várias regiões de clima tropical e subtropical do mundo (13). O precoceno I e o precoceno II, constituintes majoritários do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* (15, 24), causam metamorfose prematura em diversas espécies de insetos, levando à formação de adultos estéreis (3).

*Ageratum conyzoides* possui uso medicinal difundido pela população no Brasil e em outros países. O consumo da droga vegetal denominada mentrasto tem aumentado a partir da verificação de sua eficácia como analgésico e antiinflamatório no tratamento da artrose e da sua inclusão na lista da Central de Medicamentos (14). Embora comprovada sua atividade, o vegetal não se acha ainda em fase de cultivo racional. A droga que abastece os mercados de São Paulo e Rio de Janeiro e, por extensão, todo o Brasil, é proveniente do extrativismo (16).

Este trabalho teve por objetivo estudar a divergência genética entre acessos de mentrasto por características morfológicas, moleculares e fitoquímicas, provenientes de diferentes regiões geográficas, mas cultivados nas mesmas condições ambientes.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados cinco acessos de mentrasto, coletados nos municípios mineiros de Mariana (AMA), Piranga (API), Visconde do Rio Branco (ARB) e Viçosa (AVB e AVP). Os acessos do município de Viçosa foram obtidos nas localidades denominadas Bom Sucesso (AVB) e Paraíso (AVP). A identificação específica dos acessos foi feita pelo Dr. Jimi Naoki Nakajima (Universidade Federal de Uberlândia), e as exsicatas encontram-se depositadas no herbário da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob os números 25.806, 25.807, 25.808, 25.809 e 25.810.

A coleta das sementes (capítulos) foi realizada em plantas individuais em cada município. Em cada área foram coletadas sementes de 15 plantas e, posteriormente, retirada a mesma quantidade de sementes por planta, para a formação do *bulk* e a implantação do experimento.

O experimento foi realizado em casa de vegetação, em área experimental da Universidade Federal de Viçosa, e a propagação dos acessos foi feita por sementes em bandejas de isopor, preenchidas com substrato comercial à base de vermiculita e carvão vegetal. As mudas foram transplantadas 44 dias após a semeadura, em 13 de março de 2001.

### *Experimento 1- Divergência genética avaliada por características botânico-agronômicas*

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três repetições, sendo a unidade experimental constituída por um vaso de seis litros, com três plantas em cada vaso. Avaliaram-se oito características: biomassa fresca da parte aérea, biomassa seca, altura, área foliar, floração, número de sementes por inflorescência, número de inflorescência por planta e número de sementes por planta.

As características de biomassa fresca da parte aérea, biomassa seca, altura e floração foram avaliadas aos 84 dias após o transplante.

A área foliar foi avaliada aos 42 dias após o transplante (dat). Inicialmente, foi ajustada uma equação de regressão aos dados de comprimento das folhas, largura das folhas e área foliar. A equação de regressão ajustada foi utilizada na obtenção da área foliar total por planta, a partir das medidas de comprimento dos ramos e largura média das folhas nas épocas de amostragem (18). No ajuste da equação de regressão, a área foliar das plantas foi obtida utilizando-se o equipamento *area meter*. Nas medidas de comprimento e largura média das folhas foi utilizada régua graduada.

As relações entre área foliar e comprimento e largura das folhas foram ajustadas de acordo com a seguinte equação de regressão:

$$AF = - 10,0945 + 0,5853 C + 6,4263 L (R^2 = 0,9483)$$

em que

AF = área foliar (cm<sup>2</sup>);

C = comprimento das folhas (cm); e

L = largura média das folhas (cm).

Na determinação da floração foram utilizados os seguintes estádios de desenvolvimento floral:

E0: plantas não-floridas (nota = 0);

E1: inflorescência em início de desenvolvimento (nota = 1);

E2: inflorescência aberta (nota = 2);

E3: inflorescência em processo de escurecimento (nota = 3); e

E4: queda das sementes (nota = 4).

Na avaliação do número médio de sementes por inflorescência (SI), utilizaram-se quatro inflorescências por planta. O total de sementes por planta (SP) foi obtido multiplicando-se a média do número de sementes por inflorescência (SI) pelo número de inflorescência por planta (IP).

### *Experimento 2- Divergência genética avaliada por marcadores RAPD*

Foram coletados cinco indivíduos (plântulas) de cada acesso para análise molecular no Laboratório de Biotecnologia do Café do BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa.

#### *Extração do DNA*

Foi utilizado o método de Doyle e Doyle (11), com modificações. Amostras de aproximadamente 0,2 g de folhas frescas foram maceradas em nitrogênio líquido. Adicionaram-se 4 mL do tampão de extração (Sorbitol- 0,35 M; Tris base- 0,10 M; EDTA- 5 mM; NaCl- 2 M; CTAB- 2%; e PVP- solúvel) e procedeu-se à homogeneização. Os tubos foram incubados em banho-maria, a 65°C por 60 minutos. Foram acrescentados 4,0 mL de CIA (clorofórmio + álcool isoamílico – 24:1) a 4°C e agitou-se a solução por oito minutos. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 12.000 rpm por cinco minutos. Logo após, foi adicionado igual volume de isopropanol resfriado a –20°C, para precipitação do DNA. O material foi centrifugado a 10.000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 500 µL de etanol a 70%. Adicionaram-se 100 mL de tampão TE (Tris EDTA, pH 8,0) contendo 10 mg/mL de RNAase, seguido de incubação em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Em seguida, o material foi incubado em banho-maria a 65°C por cinco minutos. A concentração do DNA foi estimada por comparação com

DNA de concentração conhecida em gel de agarose 0,8% (p/v), a partir da qual foram feitas diluições para 10 ng de DNA por  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-EDTA (pH 8,0).

### *Processo de amplificação do DNA*

As reações de polimerase em cadeia foram conduzidas em termocicladores Perkin-Elmer, modelo 9600. O programa utilizado iniciava-se pelo aquecimento a  $95^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, seguido de 40 ciclos constituídos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 15 segundos,  $35^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos e  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, um ciclo de  $72^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e, por fim,  $4^{\circ}\text{C}$ , até a retirada das amostras. As reações foram conduzidas em tubos plásticos apropriados, sendo o volume da reação de  $25 \mu\text{L}$  (KCl- 50 mM; Tris HCl- 10 mM;  $\text{MgCl}_2$ - 2 mM; dNTPs- dATP, dCTP, dGTP e dTTP-  $100 \mu\text{M}$  de cada; oligonucleotídeo iniciador-  $0,2 \mu\text{M}$ ; Taq polimerase 1 unidade; DNA genômico-  $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ). Cada reação foi repetida duas vezes, para verificar a consistência dos resultados.

Os *primers* utilizados de 10 nucleotídeos foram adquiridos na *Operon Technologies*: OPO-02, OPR-19, OPT-17, OPU-01, OPU-03, OPU-05, OPU-08, OPU-18, OPV-04, OPV-05, OPV-07, OPV-15, OPV-17, OPV-19, OPV-20, OPW-06, OPW-08, OPW-09, OPW-15, OPW-20, OPX-05, OPX-10, OPX-11, OPX-13, OPX-14, OPG-08, OPY-09, OPY-11, OPY-13, OPY-19, OPY-20, OPZ-01, OPZ-05, OPZ-15, OPZ-16 e OPZ-19.

### *Separação dos fragmentos de DNA amplificados em gel de agarose*

Após a amplificação do DNA, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4% (p/v), por quatro horas, a 85 volts. Após a corrida eletroforética o gel era colocado em bandeja plástica, para coloração em solução de brometo-de-etídeo por 30 minutos. A visualização foi feita sob luz ultravioleta, e a imagem do gel foi obtida no sistema de fotodocumentação marca Stratagene, modelo Eagle Eye II.

### *Experimento 3- Divergência genética avaliada por características fitoquímicas*

A coleta de material para análise do óleo essencial foi realizada aos 84 dias após transplante, na fase de floração. Após a coleta, as plantas foram desidratadas em sala de secagem e mantidas em temperatura ambiente ( $25\text{-}30^{\circ}\text{C}$ ).

### *Extração do óleo essencial*

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA) do Departamento de Química da UFV. Amostras da planta desidratada (em torno de 18 g) foram transferidas para um balão que foi acoplado ao clevenger, e este a um condensador. Após destilação por duas horas foram recolhidos, aproximadamente, 400 mL de hidrolato (água + óleo).

O óleo foi extraído da fase aquosa com funil de separação, utilizando o pentano como solvente. Foram realizadas quatro extrações com 40 mL de pentano. Foi adicionado sulfato de magnésio anidro, em excesso, à fase orgânica, com o objetivo de remover a água. A fase orgânica foi filtrada e o pentano removido em evaporador rotativo.

O rendimento do óleo essencial, em porcentagem, foi determinado de acordo com a massa de planta desidratada utilizada para extração.

### *Composição do óleo essencial*

#### *Cromatografia gasosa*

O óleo essencial foi analisado por cromatografia em fase gasosa (CG) em equipamento Shimadzu, modelo 17A, equipado com detector de ionização de chama de hidrogênio e coluna capilar SBP – 5 (30 cm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno). O gás de arraste foi o nitrogênio. A temperatura inicial da coluna foi de 60°C, sendo programada para ter acréscimos de 3 °C a cada 1 minuto, até atingir a temperatura máxima de 240°C. Foram pesados cerca de 10 mg das amostras, que foram diluídas em 1 mL de pentano, sendo injetado 1 µL da mistura pentano + óleo essencial.

#### *Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa*

A identificação dos compostos do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), em equipamento Shimadzu, modelo CG 17A, com detector seletivo de massa, modelo QP 5000 (Shimadzu). A coluna cromatográfica foi do tipo capilar de sílica fundida com fase estacionária DB – 5, de 30 mm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás carreador. A temperatura do forno foi programada de 60 a 240°C, com acréscimo de 3°C a cada minuto.

A identificação dos compostos foi feita por comparações dos espectros de massa com os espectros do banco de dados do equipamento, com a literatura e pelo índice de Kovat's.

### *Correlações*

A correlação de Spearman foi estimada entre as distâncias genéticas obtidas pelas características botânico-agronômicas, moleculares e fitoquímicas.

A correlação de Pearson foi estimada entre as médias das características botânico-agronômicas (biomassa fresca, biomassa seca, número médio de sementes por inflorescência, número de sementes por planta) e fitoquímicas (precoceno I, precoceno II, número de compostos e rendimento de óleo essencial).

### *Análises estatísticas*

Foram feitas nos programas GENES (8) e SAEG (17).

No Experimento 1 (divergência genética por características botânico-agronômicas), no cálculo da distância genética, foi obtida a distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ), e, na delimitação dos grupos de dissimilaridade dos acessos, foi adotado o método de Tocher (9). A distância generalizada de Mahalanobis ( $D^2$ ) é definida como:

$$D_{ii}^2 = d' W^{-1} d$$

em que

$d$ : vetor de diferenças entre médias dos acessos em todas as  $p$  características;

$d'$ : seu transposto; e

$W$ : matriz  $p \times p$  de variâncias e covariâncias residuais.

No Experimento 2 (divergência genética por marcadores RAPD), os dados foram tabulados de forma binária, isto é, 1 para presença e 0 para ausência de determinada banda do DNA. O índice de Nei foi utilizado para o cálculo da distância genética entre os acessos e o agrupamento dos acessos realizado pelo método de Tocher (17).

O índice de Nei é utilizado para dados do tipo presença/ausência de bandas, e é definido como

$$I_{ij} = 2a / (2a + b + c)$$

em que

$a$  = número de casos em que a banda está presente nos dois acessos,  $i$  e  $j$ , simultaneamente;

$b$  = número de casos em que a banda está presente somente no acesso  $i$ ; e

$c$  = número de casos em que a banda está presente somente no acesso  $j$ .



No Experimento 3 (divergência genética por características fitoquímicas) foi obtida a distância euclidiana média padronizada ( $d$ ), e o agrupamento dos acessos foi realizado pelo método de Tocher (9). A distância Euclidiana média ( $d_{ii'}$ ) é definida pela seguinte expressão:

$$d_{ii'} = \left[ \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (x_{ij} - x_{i'j})^2 \right]^{0,5}$$

em que

$n$ : número de características analisadas ( $n = 13$ ); e

$x_{ij}$ : média padronizada do  $i$ -ésimo acesso em referência à  $j$ -ésima característica.

Foi utilizado o critério de Singh (19) para identificar a contribuição relativa de cada caráter na diversidade entre os acessos (Experimento 1 e Experimento 3).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Experimento 1-Divergência genética avaliada por características botânico-agronômicas*

Os acessos mais divergentes foram API e AVB, e os menos divergentes, API e AVP.

Com base nas distâncias genéticas (distância generalizada de Mahalanobis), foram formados dois grupos de acessos dissimilares, por meio do método de Tocher. Os acessos AMA, API, ARB e AVP formaram um mesmo grupo, e o acesso AVB formou outro grupo.

A contribuição das características para a divergência genética encontra-se no Quadro 1. As características biomassa fresca, biomassa seca e número de sementes por inflorescência foram as que mais contribuíram para a divergência genética, e as características altura e número de inflorescência por planta, as que menos contribuíram (Quadro 1).

### *Experimento 2 - Divergência genética avaliada por marcadores RAPD*

Foram obtidos, por meio do método de extração do DNA, de 100 a 800 ng de DNA, em cada extração, a partir de aproximadamente 0,2 g de folhas frescas.

Dos 36 iniciadores testados, foram considerados 14, isto é, em 38% dos iniciadores foram obtidas bandas polimórficas. Esses 14 iniciadores deram origem a 26 bandas polimórficas, com média de 1,86 banda por iniciador. O número de bandas polimórficas variou entre 1 e 4 por iniciador. A maioria dos iniciadores apresentou uma ou duas bandas

polimórficas (78% dos iniciadores); o iniciador OPV-20 apresentou quatro bandas, e os iniciadores OPY-11 e OPY-20, três bandas.

**QUADRO 1** - Contribuição relativa percentual para a divergência genética, analisada com base no critério de Singh (19), das variáveis biomassa fresca (BF), biomassa seca (BS), altura (ALT), número de sementes por inflorescência (SI), número de inflorescência por planta (NI), número de sementes por planta (SP), floração (FL) e área foliar (AF), de cinco acessos de mentrasto

Variáveis	Contribuição relativa (%)
BF	27,33
BS	27,14
AL	1,54
SI	20,99
NI	0,88
SP	11,64
FL	7,28
AF	3,21

As distâncias genéticas obtidas entre os cinco acessos de mentrasto, relativos aos 26 locos polimórficos de marcadores RAPD, variaram de 0,1515 (entre API e ARB) a 0,6280 (entre AMA e AVP).

A análise de agrupamento, utilizando-se o método de Tocher, definiu dois grupos: um com os acessos API, ARB, AVB e AVP, e outro com o acesso AMA como único integrante.

Os resultados mostraram a viabilidade do uso de marcadores RAPD no estudo da diversidade genética em acessos de mentrasto. Assim como em outros trabalhos realizados, em *Caesalpinia echinata* (5), em cultivares do gênero *Rosa* (10) e em *Oryza sativa* (23), a técnica de marcadores RAPD foi eficiente na detecção de variabilidade genética.

### *Experimento 3- Divergência genética avaliada por características fitoquímicas*

No acesso ARB foi verificado o maior valor de teor do óleo essencial, 0,7015%, e no acesso API foi obtido o maior número de compostos detectado na análise por cromatografia gasosa (Quadro 2).

Os compostos identificados no óleo essencial dos acessos de mentrasto, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, podem ser divididos em: monoterpenos, sesquiterpenos, cromenos e fenilpropenos (Quadro 2).

Foram identificados dois compostos majoritários, ambos cromenos: o precoceno I, que foi o majoritário no acesso API, e o precoceno II, majoritário nos outros acessos. Outro cromeno identificado, relatado pela primeira vez nessa espécie, foi o 6-hidroximetil-7-metoxi-2,2-dimetil-2H-cromeno, constituinte minoritário não encontrado no acesso AVB.

Os monoterpenos identificados foram o terpinen-4-ol e o acetato de bornila. Os sesquiterpenos identificados foram o (*E*)-cariofileno, o  $\gamma$ -muroleno, o  $\delta$ -cadineno, o  $\alpha$ -muroleno e o óxido de cariofileno. O  $\delta$ -cadineno, composto presente somente no acesso API, é precursor do gossipol, composto que atua na defesa química da planta (4).

QUADRO 2 - Concentração relativa (%), obtida por cromatografia gasosa, dos constituintes do óleo essencial da parte aérea de cinco acessos de mentrasto

Acessos	Constituintes do óleo essencial (%)												NC	RO
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11			
AMA	0,63	0,64	3,60	0,28	10,46	0,63	-	0,70	1,44	70,77	0,48	53	0,49	
API	1,24	0,56	0,54	3,94	76,57	0,63	0,46	0,48	1,33	0,41	0,38	67	0,48	
ARB	0,14	-	2,23	0,11	30,67	0,37	-	0,29	1,19	61,35	0,21	26	0,70	
AVB	-	-	2,09	-	37,75	0,42	-	0,38	0,82	56,85	-	12	0,49	
AVP	-	0,14	2,21	0,15	15,63	0,37	-	0,29	0,67	76,71	0,20	24	0,51	
TR	13,48	18,21	24,08	24,50	28,83	26,69	28,46	28,50	30,82	34,08	39,51			

C1 = terpinen-4-ol; C2 = acetato de bornila; C3 = cariofileno; C4 = cumarina I; C5 = precoceno I; C6 =  $\gamma$ -muroleno; C7 =  $\delta$ -cadineno; C8 =  $\alpha$ -muroleno; C9 = óxido de cariofileno; C10 = precoceno II; C11 = 6-hidroximetil-7-metoxi-2,2-dimetil-2-cromeno; NC = número de compostos; RO = rendimento do óleo essencial em %; TR = tempo de retenção em minutos.

Em relação aos fenilpropenos, identificaram-se as cumarinas, sendo a maior concentração encontrada no acesso API (3,94%).

O par de acessos mais divergente, com base nas características fitoquímicas, foi API e AVP, e o menos divergente foi AVB e AVP.

A análise de agrupamento, utilizando o método de Tocher, definiu dois grupos: um formado com os acessos AMA, ARB, AVB e AVP, e outro com o acesso API.

As características que mais contribuíram para a divergência genética foram: precoceno I, precoceno II e número de compostos (Quadro 3).

### *Correlação de Spearman*

Os coeficientes de correlação foram não-significativos, indicando que não existe associação linear entre as distâncias genéticas estimadas

com base em características botânico-agronômicas, moleculares e fitoquímicas (Quadro 4).

Esses resultados mostram certa discordância entre os dados moleculares e os dados botânico-agronômicos. Trabalhos realizados em *Brassica oleraceae* (2), *Phaseolus vulgaris* (22) e *Baccharis myriocephala* (7) também mostraram que o relacionamento entre os padrões de variação molecular e os padrões de variação genética indicam associação positiva em alguns casos, enquanto noutros inexistente associação entre a variação dos características moleculares e as características morfológicas geneticamente controladas.

### *Correlação de Pearson*

Verificou-se coeficiente de correlação significativo entre biomassa seca e precoceno I. Maior produção de biomassa seca indicou maior teor de precoceno I no óleo essencial (Quadro 5).

QUADRO 3 - Contribuição relativa percentual para a divergência genética de 13 características fitoquímicas, de cinco acessos de mentrasto, analisada com base no critério de Singh (19)

Características	Contribuição relativa (%)
C1	0,013
C2	0,005
C3	0,055
C4	0,136
C5	32,002
C6	0,001
C7	0,002
C8	0,001
C9	0,005
C10	43,586
C11	0,002
NC	24,192
RO	0,0004

C1 = terpinen-4-ol; C2 = acetato de bornila; C3 = cariofileno; C4 = cumarina; C5 = precoceno I; C6 =  $\gamma$ -muroleno; C7 =  $\delta$ -cadineno; C8 =  $\alpha$ -muroleno; C9 = óxido de cariofileno; C10 = precoceno II; C11 = 6-hidroximetil-7-metoxi-2,2-dimetil-2-cromeno; NC = número de compostos; RO = rendimento do óleo essencial.

QUADRO 4 - Coeficientes de correlação (Spearman) entre as características botânico-agronômicas (BOT), moleculares (RAPD) e fitoquímicas (FIT), com base nas distâncias dos acessos

	BOT	RAPD	FIT
BOT	1	0,0909 <sup>ns</sup>	-0,1758 <sup>ns</sup>
RAPD	-	1	-0,0909 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> = não-significativo pelo teste t, a 10% de probabilidade.

QUADRO 5 - Correlações de Pearson entre as características botânico-agronômicas (biomassa fresca-BF, biomassa seca-BS, número médio de sementes por inflorescência-SI e número de sementes por planta-SP) e fitoquímicas (precoceno I-PI, precoceno II-P II, número de compostos-NC e rendimento do óleo essencial-RO) de cinco acessos de mentrasto

	BF	BS	SI	SP
PI	0,4223 <sup>ns</sup>	0,6881 <sup>***</sup>	0,0183 <sup>ns</sup>	0,4989 <sup>ns</sup>
P II	-0,2222 <sup>ns</sup>	-0,6008 <sup>ns</sup>	0,0764 <sup>ns</sup>	-0,3159 <sup>ns</sup>
NC	-0,5830 <sup>ns</sup>	0,1059 <sup>ns</sup>	0,4417 <sup>ns</sup>	-0,4160 <sup>ns</sup>
RO	-0,0320 <sup>ns</sup>	0,1237 <sup>ns</sup>	0,0146 <sup>ns</sup>	0,0393 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> = não-significativo pelo teste t, a 10% de probabilidade.

<sup>\*\*\*</sup> = significativo pelo teste t, a 10% de probabilidade.

## CONCLUSÕES

1) As características botânico-agronômicas, moleculares (marcadores RAPD) e fitoquímicas (teor e composição do óleo essencial) são eficientes na avaliação da diversidade genética entre acessos de mentrasto.

2) A utilização de marcadores RAPD e de características fitoquímicas, na caracterização de variedades em *Ageratum conyzoides*, pode ser utilizada em adição às características botânico-agronômicas.

3) São não-significativos os coeficientes de correlação entre as características botânico-agronômicas, moleculares e fitoquímicas, com base nas distâncias dos acessos.

4) A disparidade entre a diversidade genética estimada com base nos três tipos de caracteres mostra que no programa de melhoramento do

mentrasto por hibridação a escolha dos genitores deve estar relacionada com a diversidade de caracteres de interesse.

### AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação Estadual do Norte Fluminense (FENORTE) e ao Parque de Alta Tecnologia do Norte Fluminense (TECNORTE).

### REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, V. P. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Análise enzimática e quimiotaxonomia de duas variedades de *Ocimum nudicaule* Benth. (Labiatae). *Revista Brasileira de Botânica*, 9: 75-80, 1986.
2. AMARAL JÚNIOR, A.T.; SILVA, D.J.H.; SEDIYAMA, M.A.N.; CASALI, V.W.D. & CRUZ, C.D. Dissimilaridade genética de descritores botânico-agronômicos e isozimáticos em clones de couve-comum. *Horticultura Brasileira*, 12: 113-7, 1994.
3. BOWERS, W.S.; OHTA, T.; CLEERE, J.S. & MARSELLA, P.A. Discovery of insect anti-juvenil hormones in plants. *Science*, 193: 542-7, 1976.
4. BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W. & JONES, R.L. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Maryland, American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367 p.
5. CARDOSO, M.A.; PROVAN, J.; POWEL, W.; FERREIRA, P.C.G. & OLIVEIRA, D.E. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. *Molecular Ecology*, 7: 601 - 8, 1998.
6. CASTRO, H.G. Diversidade genética, interação genótipo x ambiente e análise do óleo essencial de acessos de mentrasto (*Ageratum conyzoides*). Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 2002. 123p. (Tese de doutorado).
7. CASTRO, H.G.; SILVA, D.J.H.; FERREIRA, F.A. & RIBEIRO JUNIOR, J.I. Estabilidade da divergência genética em seis acessos de carqueja. *Planta Daninha*, 18: .33-7, 2002.
8. CRUZ, C.D. Programa Genes: aplicativo computacional em Genética e Estatística. Viçosa, UFV, 1997. 442p.
9. CRUZ, C.D. & REGAZZI, A.J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento Genético. 2nd ed. Viçosa, UFV, 1997. 390p.
10. DEBENER, T.; BARTELS, C. & MATTIESCH, L. RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species. *Molecular Breeding*, 2: 321-7, 1996.
11. DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-5, 1987.
12. HAY, R. K. M. & SVOBODA, K. P. Botany. In: Hay, R.K.M. & Waterman, P.G (eds). *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*. Essex, Longman Group, 1993. p.47-61.
13. LADEIRA, A.M.; ZAIDAN, L.B.P. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. *Ageratum conyzoides* L. (Compositae): germinação, floração e ocorrência de derivados fenólicos em diferentes estádios de desenvolvimento. *Hoehnea*, 15:53-62, 1987.
14. MARQUES NETO, J.F.; COSTALLAT, L.T.L.; FERNANDES, S.R.M.; NAPOLI, M.D.M. & SAMARA, A.M. Efeitos de "*Ageratum conyzoides*, Linee" no tratamento da artrose. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 28: 109-14, 1988.

15. MENUT, C.; LAMATY, G.; ZOLLO, P.H.A.; KUIATE, J.R. & BESSIERE, J.M. Aromatic plants of tropical central África. Part x chemical composition of the essential oils of *Ageratum houstonianum* Mill. and *Ageratum conyzoides* L. from Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal*, 8: 1 - 4, 1993.
16. OLIVEIRA, F.; LÚCIA, M. & GARCIA, L.O. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de mentrasto – *Ageratum conyzoides* L. *Lecta*, 11: 63 - 100, 1993.
17. RIBEIRO JÚNIOR, J.I. Análises estatísticas no SAEG. Viçosa, UFV, 2001. 301p.
18. ROBBINS, N.S. & PHARR, D.M. Leaf area prediction models for cucumber from linear measurements. *HortScience*, 22: 1264-6, 1987.
19. SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. *Indian Journal Genetic and Plant Breeding*. 41: 237-45, 1981.
20. SILVA, D.J.H.; COSTA, C.P.; CRUZ, C.D.; CASALI, V.W.D. & DIAS, L.A.S. Stability of genetic divergence among eggplant accesses in three stages of development. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 1: 135-43, 2001.
21. TANKSLEY, S.D.; YOUNG, N.D.; PATERSON, A.H. & BONIERBALE, M.W. RFLP mapping in plant breeding: new tools for na old science. *Biotechnology*, 7: 257-64, 1989.
22. VIEIRA, E.S.N. Similaridade genética entre cultivares de feijão do grupo Carioca por meio de marcadores morfológicos e moleculares visando a certificação da pureza genética. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2000. 84p. (Tese de mestrado).
23. VIRK, P.S.; FORD – LLOYD, B.V.; JACKSON, M.T. & NEWBURY, H.J. Use of RAPD for the study of diversity within plant germplasm collections. *Heredity*, 75: 170 – 9, 1995.
24. WANDJI, J.; BISSANGOU, M.F.; OUAMBRA, J.M. & SILOU, T. L'huile essentielle de *Ageratum conyzoides*. *Fitoterapia*, 77: 427-31, 1996.
25. ZEDAN, H. Loss of plant diversity: a call for action. In: Guarino, L.; Rao, V. R. & Reid, R. (eds.). *Collecting plant genetic diversity: technical guidelines*. Wallingford Oxon, CAB Internacional, 1995. p. IX-XIV.