

Caracterização Isozimática de Acessos de *Bidens pilosa* L.¹

Oliveira, José Emilio Z.², Casali, Vicente W. D.³

^{2,3} Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (MG), 36571-000.

RESUMO: Foi estudada a variabilidade isozimática de sete acessos de picão (*Bidens pilosa* L., Asteraceae), obtidos nas altitudes de 5, 210, 475, 665, 890, 1.005 e 1.160 m (acessos A, B, C, D, E, F e G, respectivamente). Os frutos desses acessos foram cultivados na altitude de 665 m, sendo estudadas as plantas obtidas. Para as folhas e raízes (plantas com 21 dias), testaram-se sete sistemas isozimáticos, obtendo três sistemas monomórficos: isocitrato desidrogenase (IDH), leucina aminopeptidase (LAP) e chiquimato desidrogenase (SKDH); três polimórficos: fosfatase ácida (ACP), esterase (EST) e peroxidase (PO); e um sem resolução satisfatória: malato desidrogenase (MDH), sendo obtida a melhor resolução para as folhas nos sete sistemas. A análise conjunta dos sistemas ACP, EST e PO permitiu separar individualmente os acessos A, B, D e G. Observou-se que nos acessos extremos (A e G) as variações foram mais marcantes. O elevado número de bandas isozimáticas comuns a todos os acessos (27 das 35 bandas reveladas) pode ter favorecido a adaptação de *B. pilosa* a diversas altitudes.

Palavras Chave: *Bidens pilosa*, picão, isozima, polimorfismo, altitude.

ABSTRACT: Isozyme Characterization of Accesses of *Bidens pilosa* L. It were studied the variabilities of isozymes of seven accesses of beggarticks (*Bidens pilosa* L., Asteraceae) obtained at 5, 210, 475, 665, 890, 1.005 and 1.160 m altitudes (accesses A, B, C, D, E, F and G, respectively). These accesses fruits were grown at 665 m altitude, and the obtained plants were studied. For leaves and roots (21 days after emergence) it were tested the isozyme systems. From those systems three were monomorphic: isocitrate dehydrogenase (IDH), leucine aminopeptidase (LAP) and shikimate dehydrogenase (SKDH); three were polymorphic: acid phosphatase (ACP), esterase (EST) and peroxidase (PO); and one without a satisfactory resolution, that is, the malate dehydrogenase (MDH). A better resolution occurred for leaves in all systems. The analysis of the systems ACP, EST and PO together, allowed for separating individually the accesses A, B, D and G. It was observed that variation were more remarkable in the extreme accesses (A and G). The high number of the isozyme bands which were common to all accesses (27 from 35 revealed bands) may have favoured *B. pilosa* adaptation to those diverse altitudes.

Key Words: *Bidens pilosa*, beggarticks, isozyme, polymorphism, altitude.

INTRODUÇÃO

Bidens pilosa L. (Asteraceae), conhecida popularmente como picão ou picão-preto, possui ocorrência espontânea onde há intervenção do homem, devido a dispersão de seus frutos se processar grudada a seus pêlos ou vestes. Este fato, possivelmente, levou esta espécie a habitar diversas altitudes (desde o nível do mar até acima de 3.000m de altitude) e seus domínios se estenderem pelas regiões tropicais e subtropicais do globo (Strang et al., 1980; Lorenzi, 1982; Bastidas et al., 1989).

Por onde ocorre possui emprego medicinal, com uso interno e externo. Internamente, as folhas, na forma de suco e chá, são usadas nos casos de icterícia e hepatite, ainda na forma de chá são usadas para inflamações da garganta e diabetes. Externamente, em forma de banho são usadas para casos de hepatite, já o emplastro serve para aliviar inflamações, abscessos e furúnculos. Apresenta ainda

propriedades estimulante, antiescorbútica, sialagoga, odontálgica (principalmente a raiz), desobstruente, antidisentérica, vermífuga, vulnerária, diurética e antileucorréica. Embora todas as partes da planta sejam empregadas, é sobre as folhas que foi encontrado o maior número de referências para uso terapêutico (Strang et al., 1980; Vasques et al., 1986). Diversas propriedades foram testadas e comprovadas, como por exemplo, a ação colerética (Yomura et al., 1988).

O fato de *B. pilosa* L. ocorrer em diversas altitudes pode indicar que esta espécie apresenta variabilidade em nível bioquímico e/ou molecular. No entanto, para se detectar esta variabilidade é necessário que haja disponibilidade de marcadores (Sakiyama, 1993). Existem várias técnicas de detecção destas variações, sendo a eletroforese a mais simples. As potencialidades de se usarem as isozimas decorrem também da capacidade dessa técnica de detectar diferenças genéticas

¹Recebido para publicação em 20/05/99 e aceito para publicação em 20/08/99.

próximas ao nível molecular do DNA (Peirce & Brewbaker, 1973). Desta forma, algumas informações básicas sobre a diversidade genética entre os acessos desta espécie podem ser obtidas utilizando os marcadores isozimáticos.

A origem geográfica das plantas medicinais é de considerável importância devido às variações sazonais e climáticas (Deans & Svoboda, 1990). A adaptação em diversas altitudes poderia proporcionar variação quanto à sua constituição genética e atividade fisiológica. Possivelmente esta variabilidade determine diferenças na produção de compostos medicinais.

O estudo das variações eletroforéticas de enzimas tem sido de grande utilidade em investigações de plantas silvestres. Quando comparado a outros caracteres tradicionais, os fenótipos isozimáticos apresentam as seguintes vantagens adicionais (Alfenas et al., 1991): permitem a análise de vários locos simultaneamente; permitem a identificação dos heterozigotos, com o comportamento codominantes dos alelos nos locos; quantificam a variabilidade genética em um nível mais próximo do DNA, pois constituem um produto direto da ação gênica. A aplicação contribui com informações para os mais diferentes aspectos, como por exemplo: a diferenciação geográfica de populações dentro de espécies (Diggle et al., 1998), a relação entre variabilidade isozimática e características de interesse (Lebot & Levesque, 1996).

A análise eletroforética de isozimas consiste na separação de moléculas enzimáticas, por sua carga elétrica, tamanho e forma, pela migração em um meio suporte utilizando tampões

adequados. Na análise isozimática utiliza-se o extrato bruto de diversos tecidos, tais como, folha, raiz, fruto, etc., que são macerados à baixa temperatura (Alfenas et al., 1991).

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, observou-se que o uso de marcadores isozimáticos no estudo de plantas medicinais é recente e tem sido pouco explorado (Carapetian et al., 1994; Lebot & Levesque, 1996; Pramanik & Raychaudhuri, 1997).

Pelas potencialidades como medicinais que têm algumas plantas que não são cultivadas, como *B. pilosa*, faz-se necessário realizar estudos que permitam o uso racional no futuro. Portanto, este trabalho tem como objetivo caracterizar, por meio de isozimas, sete acessos de *Bidens pilosa* oriundos de altitudes diferentes.

MATERIAL E MÉTODO

Os aquênios de *B. pilosa* foram obtidos de plantas que ocorriam naturalmente em sete altitudes diferentes, desde o nível do mar até 1160m, a intervalos de aproximadamente 200 m de altitude (Tabela 1). Para o trabalho, cada altitude foi representada por aquênios de uma única planta (acesso). Estes aquênios foram coletados em agosto-setembro/95. Os acessos foram identificados por ordem alfabética crescente de acordo com as altitudes. As exsiccatas de cada acesso foram identificadas por Selma Maria Sarmento Verardo, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora e se encontram depositadas, sob os números CESJ 28699-28701 e 28704-28709, no Herbário (CESJ) da mesma instituição.

TABELA 1 - Local, habitat e altitude de coleta dos sete acessos de *Bidens pilosa* L. 1995

Identidade dos Acessos	Local de Coleta	Habitat de Coleta	Altitude (Metros)
A	São Gonçalo (RJ)	Terreno baldio	5
B	Leopoldina (MG)	Milharal	210
C	Ponte Nova (MG)	Horta	475
D	Viçosa (MG)	Milharal	665
E	Canaã (MG)	Cafezal	890
F	Ouro Preto (MG)	Quintal	1.005
G	Barbacena (MG)	Jardim	1.160

O experimento foi instalado na área externa à Casa de Vegetação situada no Campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em ambiente ensolarado estando todos os acessos nas mesmas condições. A semeadura dos aquênios de cada acesso foi realizada dia 11.12.1995, em recipientes plásticos de 300 mL, utilizando como substrato solo, areia e esterco, na proporção 3:1:1, sendo estudadas as plantas obtidas. Após 21 dias do plantio, retiraram-se cerca de 100mg de folhas e raízes das regiões

apicais das plantas de cada acesso, que foram imediatamente maceradas em almofariz, iniciando as análises no Laboratório de Melhoramento de Hortaliças, do Departamento de Fitotecnia da UFV. Para a corrida eletroforética utilizou-se duas plantas de cada acesso por gel e, num total de cinco géis, cada acesso foi representado por dez plantas. O extrato foi absorvido em "wicks" (tiras de papel cromatográfico Whatman 3M, medindo 1,4 x 0,3 cm) e aplicados nos géis. Realizou-se, em temperatura de 4°C, uma pré-corrida de 30

minutos, a 150 V, após esse período, retirou-se os "wicks" e retomou-se a eletroforese, agora em 300 V, permanecendo assim até o final da corrida. Empregou-se a eletroforese horizontal conduzida em géis de amido hidrolisado (Sigma) e de milho, a 12%. No preparo dos géis foram utilizados 42 g de amido e 350 mL de solução-tampão (descrita na Tabela 2), sendo o tempo de cozimento de quatro minutos para amido hidrolisado e cinco minutos para o amido de milho. Foram analisados os sistemas isozimáticos fosfatase ácida (ACP), esterase (EST), peroxidase (PO), isocitrato desidrogenase (IDH), leucina aminopeptidase (LAP), chiquimato desidrogenase (SKDH) e malato desidrogenase (MDH). Os sistemas tampão gel/eletrodo utilizados foram os propostos por Shaw & Prasad (1970), Brown (1978) e Soltis et al. (1983) e se encontram na Tabela 2. Terminada a corrida, os géis foram fatiados e coloridos. O procedimento de coloração de IDH, LAP e SKDH foi o método proposto por Soltis et al. (1983); de ACP foi o de Hildebrant et al. (1980); e de EST foi o de Amaral Júnior et al. (1994). Modificações protocolares foram introduzidas visando obter resolução satisfatória em MDH e PO. A solução para coloração de MDH foi obtida pela adição de 15mg de NAD⁺, 1mg de PMS, 15mg de MTT, 5mL de Na-L malato a 0,1M (pH 7,0), 2,5mL de NaCN 0,1M, 7,5mL de tampão Tris-HCl 0,5M (pH resolução satisfatória em MDH e PO. A solução para coloração de MDH foi obtida pela adição de 15mg de NAD⁺, 1mg de PMS, 15mg de MTT,

7,1) e 35mL de água destilada. A coloração para PO constituiu-se de 50mL de 3-amino-9-etil-carbazole, 2,5mL de Dimetilformamida (DMF), 95mL de tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5), 2mL de CaCl₂ 0,1 M e 2mL de H₂O₂ em 3%. Para revelação dos sistemas ACP, EST, IDH, LAP, SKDH e MDH, foi colocada a cuba com os géis em uma estufa a 37°C, no escuro, enquanto para os sistema PO o gel foi submetido a 4°C, em refrigerador, até a revelação das bandas, que ocorria em uma hora, aproximadamente. Após a revelação, procederam-se ao descarte da solução, à lavagem dos géis em água corrente e, em seguida, à sua fixação em solução de glicerina 10%, por cerca de 12 horas, em refrigerador, a aproximadamente 4°C. Após adquirirem consistência, os géis foram secos pelo "método do bastidor", descrito por Alfenas et al. (1991). Para a elaboração dos zimogramas denominou-se a banda de maior migração como banda 1 e a região de maior migração como região *a* (uma região não necessariamente corresponde a um loco). Para a mobilidade relativa (Mr), a banda de maior migração recebeu o valor 1,0; para as demais, seguiu-se a equivalência até a origem, tendo esta o valor zero. O conjunto de bandas de diferentes mobilidades eletroforéticas, em suas posições, para os respectivos acessos foi denominado de padrão.

TABELA 2 - Soluções-tampão utilizadas no preparo do gel para eletroforese dos acessos de *Bidens pilosa* L. Viçosa-MG, 1995

Tampão do Eletrodo		Tampão do Gel		Enzima	Resolução (*)		Referência
					Folha	Raiz	
Tris (0,135M)	16,35 g	Solução-tampão do eletrodo	66,70 mL	ACP	+	+	SHAW & PRASAD (1970)
Ácido cítrico (0,043M)	9,04 g	Água destilada	1.000,00 mL	IDH	+	±	
Água destilada	1.000,00 mL			MDH	-		
pH 7,0		pH 7,0					
Ácido bórico (0,3M)	18,55 g	Ácido bórico (0,03M)	1,86 g	ACP	±		SHAW & PRASAD (1970)
NaOH (0,012M)	2,00 g	NaOH (0,012M)	0,48 g	EST	-		
Água destilada	1.000,00 mL	Água destilada	1.000,00 mL	LAP	-		
pH 8,0		pH 8,5					
Ácido bórico (0,3M)	18,55 g	Tris (0,015M)	1,84 g	ACP	+	-	SOLTIS et al. (1983)
NaOH (0,1M)	4,00 g	Ácido cítrico (0,004M)	0,69 g	EST	+	±	
Água destilada	1.000,00 mL	Água destilada	1.000,00 mL	LAP	+	+	
pH 8,6		pH 7,8					
Ácido cítrico (0,400M)	117,64 g	Histidina-HCl (0,005M)	1,05 g	IDH	-		SOLTIS et al. (1983)
Tris-HCl (1,0M)	Titule para	L-histidina-HCl (1,0M)		MDH	-		
		Titule NaOH (1,0M)	para	SKDH	±		
pH 7,0		pH 7,0					
Ácido cítrico (0,05M)	13,00 mL	NaOH (0,1M)	4,00 g	ACP	±	-	BROWN (1978)
Tris (0,19M)	25,00 mL	Ácido bórico (0,3M)	18,55 g	EST	+	-	
Água destilada (q.s.p.)	280,00 mL	Água destilada (q.s.p.)	1.000,00 mL	LAP	+	+	
pH 8,13		pH 8,7		PO	±		

(*) Resolução: + = atividade e resolução boa, ± = atividade aceitável e resolução regular e - = atividade aceitável, mas resolução baixa.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os sistemas-tampão mais adequados para os tecidos testados de *B. pilosa* foram os descritos por Soltis et al. (1983) e Brown (1978). Verificou-se que as bandas reveladas no sistema descrito por Brown (1978) apresentaram menor mobilidade, mantendo-se mais unidas, em comparação com as reveladas por Soltis et al. (1983).

Nos sistemas isozimáticos testados detectou-se apenas atividade anodal. As folhas jovens da porção apical apresentaram, em geral, bandas mais nítidas que as raízes. No tecido radicular foram formados padrões e grupos semelhantes aos das folhas, na maioria dos sistemas revelados. No entanto, em EST, o padrão e os grupos formados pelo tecido radicular diferiram da folha, por isso foram representados os dois padrões para esse sistema.

Nos sistemas isozimáticos ACP e IDH, a melhor resolução foi obtida com géis de amido de milho (Maizena). Este meio-suporte é mais barato que o amido hidrolisado e já havia sido utilizado, com resultados satisfatórios, na investigação de polimorfismos isozimáticos em moranga (*Cucurbita maxima* L.) (Amaral Júnior et al., 1994). Nos demais sistemas, o amido hidrolisado (Sigma) foi o melhor suporte. As resoluções obtidas em cada sistema encontram-se na Tabela 2.

A avaliação dos fenótipos isozimáticos foi realizada por meio de zimogramas, com a representação de bandas em função das distâncias de migração, espessura e intensidade. Os padrões obtidos encontram-se indicados como I, II ou III, dispostos na base do zimograma. Bandas que apresentavam mobilidades eletroforéticas próximas foram, em alguns casos (EST, LAP e SKDH), designadas como regiões para facilitar a análise do zimograma.

O sistema malato desidrogenase (MDH), apesar de mostrar atividade, não apresentou resolução satisfatória, sendo por isso desconsiderado neste trabalho. Dentre as enzimas analisadas, ACP, EST e PO apresentaram polimorfismo, enquanto IDH, LAP e SKDH mostraram-se monomórficos nas condições testadas. A enzima LAP apresentou boa resolução em dois sistemas e para os dois tecidos testados (Tabela 2).

A sistema ACP apresentou boa resolução para os tecidos foliares e radiculares, com melhor resolução para as folhas. Na FIGURA 1, pode-se notar a presença de três padrões, revelando 10 bandas, com mesma espessura, conforme visto no padrão I. Segundo Alfenas et al. (1991), a ACP pode apresentar atividade na forma monomérica e/ou dimérica. Comparando o padrão I com o III, pôde-se notar a presença da banda 1 de maior migração presente apenas no padrão I. Em todos

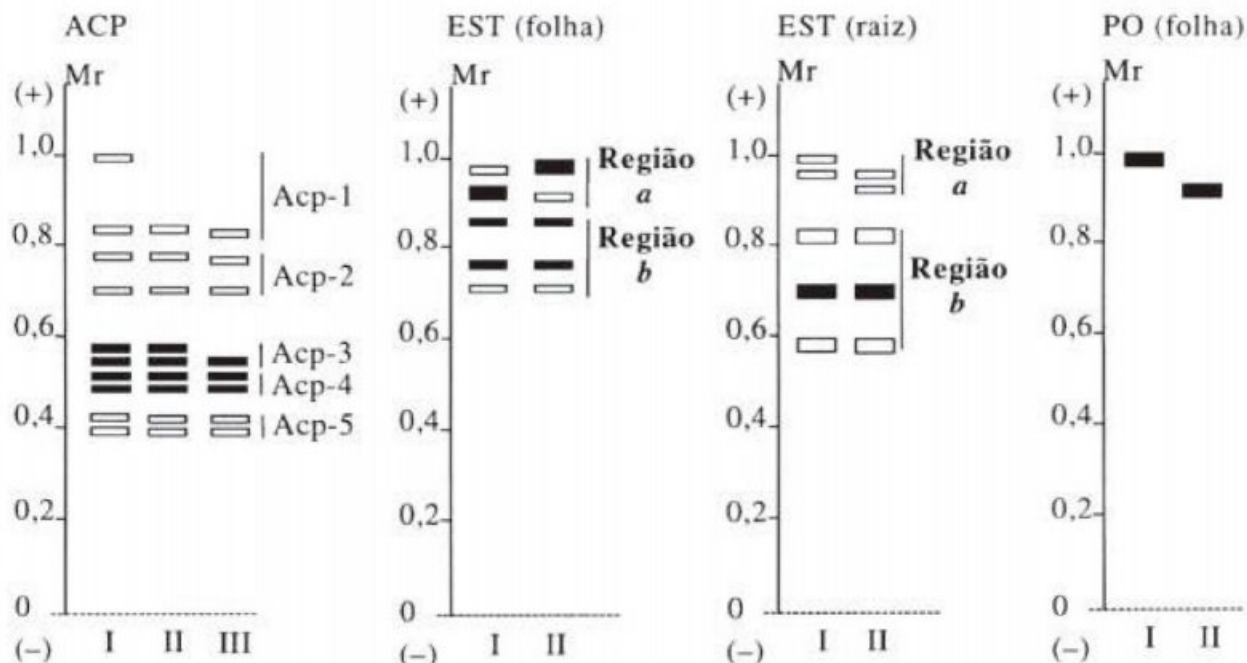


FIGURA 1 - Padrões de bandeamento da ACP, EST e PO, obtidos por eletroforese em gel de amido, do tecido foliar e radicular de sete acessos de *Bidens pilosa* L., com a respectiva mobilidade relativa (Mr). Viçosa-MG, 1995.

os padrões foi encontrada a banda 2, que possuía mesma intensidade que a banda 1, indicando ser esta enzima monomérica e estar em heterozigose no padrão I e em homozigose nos demais, para o loco Acp-1. Este padrão presença/ausência de bandas também pôde ser notado no loco Acp-3, nas bandas 5 e 6, sendo estas de mesma intensidade de coloração e de espessura. Adotando a atividade enzimática na forma monomérica para ACP e observando a ausência da banda 5 apenas no padrão III, pode-se considerar que o loco Acp-3 estava em homozigose no padrão III e em heterozigose nos padrões I e II, que apresentavam as bandas 5 e 6. Os demais locos foram monomórficos com duas bandas cada, caracterizando-se, desse modo, a heterozigose em todos os locos desses acessos. Este elevado número de bandas seria esperado na espécie em foco, por ser poliplóide (Matsumoto

& Marin-Morales, 1996). O comportamento monomérico desta enzima foi detectado também por Irwin & Abbott (1992), estudando um híbrido natural tetraplóide de *Senecio vulgaris* e *S. squalidus* (Asteraceae).

Na Tabela 3, se encontram distribuídos os acessos nos três padrões. Os padrões I e III foram obtidos nos acessos A e G, extremamente contrastantes quanto às altitudes de coleta, respectivamente ao nível do mar e a 1.160 m. O padrão II esteve presente nos demais acessos.

A ocorrência e a manutenção de múltiplas formas moleculares em populações naturais permitiram a especulação de relativa homeostasia e heteroses (Peirce & Brewbaker, 1973). A seleção natural pode ser esperada em níveis, locos e populações diferentes. A vantagem do heterozigoto pode manter a variabilidade genética (Gottlieb, 1971).

TABELA 3 - Grupos formados pelos sete acessos de *Bidens pilosa* L. que revelaram mesmo padrão nos sistemas isozimáticos polimórficos, ACP, EST e PO, na análise de tecidos foliar e radicular. Viçosa-MG, 1995.

Sistema isozimático	Padrão	Acessos
ACP (folha)	I	A
	II	B, C, D, E, F
	III	G
EST (folha)	I	A, C, D, E, F, G
	II	B
EST (raiz)	I	B, C, E, F, G
	II	A, D
PO (folha)	I	A, B, C, D, E, F
	II	G

O sistema EST expressou-se em todos os tecidos, com atividade enzimática na raiz bem menor, em decorrência de que a coloração das bandas apresentou-se mais clara quando comparada com a das folhas (Tabela 2). Cinco bandas foram observadas nas folhas e seis nas raízes (FIGURA 1). Os padrões obtidos das folhas agruparam acessos distintos das raízes (Tabela 3). Em ambos os tecidos foram reveladas duas regiões (**a** e **b**). A região **b** apresentou-se invariável para todos os acessos, e a região **a** exibiu polimorfismo, possibilitando dois padrões para ambos os tecidos, com grupos distintos.

O tecido foliar apresentou na região **a** diferenciação de dois padrões (FIGURA 1), com os respectivos acessos (Tabela 3). Essa região foi composta de duas bandas, que diferiram em razão da espessura e coloração. O padrão I apresentou a primeira banda com menor espessura e coloração que a segunda; no padrão II, observou-se o inverso. Os padrões permitem separar o acesso B dos demais, como visto na Tabela 3. A região **b** foi invariável em todos os

acessos, revelando três bandas de igual espessura. As bandas 3 e 4 apresentaram coloração mais intensa que a banda 5.

No tecido radicular, a região **a** apresentou polimorfismo de presença/ausência de bandas (FIGURA 1). Nessa região, a banda 1 se encontrava presente somente no padrão I e a banda 3, no padrão II. A intermediária (banda 2) estava presente nos dois padrões. Todas as bandas da região **a** tinham coloração e espessura semelhantes. A região **b** foi invariável para todos os acessos, revelando três bandas mais espessas do que a região **a** e a banda intermediária com maior coloração.

Essa variação ocorreu nas isozimas em razão do grau de ploidia, revelando-se no gel com maior número de bandas ou com aumento da intensidade e da espessura delas causado pela dose dos alelos presentes (Gottlieb, 1982). Em espécies poliplóides como trigo e centeio, foi possível detectar algumas bandas de esterase de coloração e espessura diferenciadas, mas com mesma mobilidade (Salinas & Benito, 1985).

Bidens pilosa, como citado por Matsumoto & Marin-Morales (1996), possui diferentes graus de ploidia.

A resolução da PO foi apenas regular nos tecidos foliares do ápice caulinar (Tabela 2). Foi obtida apenas uma região, com duas bandas caracterizando dois padrões (FIGURA 1). O padrão I reuniu a maioria dos acessos (Tabela 3) e apresentou apenas a banda de maior migração (banda 1). O padrão II representou acesso individual (acesso G) e apenas a banda de menor migração (banda 2). Pode ser suposto que os dois padrões estão em homozigose, tratando-se de alelos diferentes, em decorrência das diferentes migrações. Os padrões obtidos (bandas rápidas/ bandas lentas) e o pequeno número de bandas

foram semelhantes aos encontrados por Amaral Júnior et al. (1994), para tecidos foliares de moranga. Apesar disso, não se descartou a possibilidade de não separação das bandas observadas em cada padrão, uma vez que a enzima peroxidase é formada por um complexo enzimático (Scandalios, 1969).

Os sistemas enzimáticos ACP, EST e PO são muito utilizados como marcadores, graças ao seu freqüente polimorfismo, e por compreenderem complexos multienzimáticos, com atuação em diversas rotas metabólicas (Alfenas et al., 1991).

Nos sistemas monomórficos IDH, LAP e SKDH detectou-se, respectivamente, três, quatro e cinco bandas (FIGURA 2).

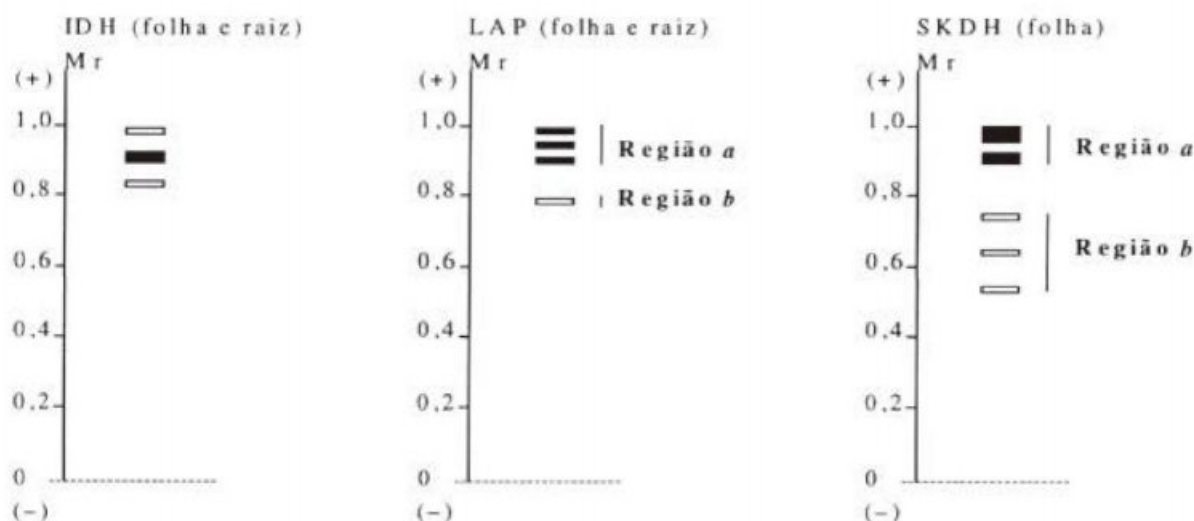


FIGURA 2 - Padrões de bandejamento da IDH, LAP e SKDH, obtidos por eletroforese em gel de amido, do tecido foliar e radicular de sete acessos de *Bidens pilosa* L., com a respectiva mobilidade relativa (Mr). Viçosa-MG, 1995.

O sistema IDH apresentou a banda intermediária com maior espessura e coloração que as demais. Nesse sistema houve a mesma mobilidade relativa (Mr) para folha e raiz, entretanto esta última apresentou maior atividade enzimática.

Para esse sistema, pode-se supor, com grande possibilidade de acerto, a presença de um loco em heterozigose. Essa afirmação pode ser corroborada pelo fato desta enzima em milho ser codificada por dois locos gênicos não ligados, cujos produtos interagem e formam enzimas híbridas intra e interlocos (Goodman et al., 1980). Também, em cultivares de soja (*Glycine max* Merrill), esta enzima foi codificada por genes duplicados (Gottlieb, 1982). Ademais, o

comportamento semelhante para os sete acessos pode ser devido ao fato de a enzima isocitrato desidrogenase estar ligada ao ciclo de Krebs, que exerce função primordial no metabolismo vegetal, e à respiração celular (Taiz & Zeiger, 1991); a seleção não se processa sobre mecanismos vitais da planta, para assegurar-lhe a sobrevivência. Diferentes padrões isozimáticos foram obtidos por Lefèvre & Charrier (1993) em mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), e o polimorfismo encontrado no loco *Idh-B* foi atribuído à heterogeneidade de germinação das sementes de mandioca (30 a 90% de germinação). A diferença na germinação possivelmente se relacionou ao processo respiratório do qual essa enzima participou.

Oliveira et al. (1996) avaliaram a taxa de germinação dos acessos de *B. pilosa* utilizados neste estudo e obtiveram alta taxa de germinação (74 a 99%). O padrão monomórfico desta enzima ocorreu também em acessos de açafrão (*Carthamus tinctorius* L., Asteraceae) de diversas origens geográficas (Carapetian et al., 1994).

O sistema LAP apresentou boa resolução nos tecidos foliares e radiculares e, sob idênticas condições, apresentaram a mesma mobilidade e quatro bandas monomórficas de mesma espessura, mas com colorações diferentes, possibilitando a divisão em duas regiões: a região **a**, com três bandas equidistantes de mesma intensidade de coloração; e a região **b**, com apenas uma banda de coloração menos intensa que a das demais (FIGURA 2).

O sistema SKDH revelou duas regiões (FIGURA 2). Na região **a** ocorreram duas bandas de coloração e espessura mais acentuadas que as da região **b**, com a banda 1 mais espessa que a banda 2. Na região **b**, as três bandas apresentaram espessura e coloração iguais, mostrando-se equidistantes. Essa característica monomórfica da SKDH pode ser adaptativa, por esta enzima estar envolvida no metabolismo secundário (rota do chiquimato) e na síntese de

compostos de defesa da planta (Taiz & Zeiger, 1991).

A análise dos sistemas isozimáticos polimórficos (Tabela 4) permitiu a separação dos sete acessos em quatro padrões individuais: padrões A (São Gonçalo - RJ), B (Leopoldina - MG), D (Viçosa - MG) e G (Barbacena - MG). Os acessos de altitudes extremas (A e G) apresentaram as variações mais marcantes, sendo o acesso G o mais diferente, caracterizado individualmente pelos sistemas ACP e PO.

Considerando finalmente todas as isozimas, foram reveladas 35 bandas nos seis sistemas evidenciando que em apenas oito bandas houve polimorfismo (Tabela 5). A permanência da maioria das bandas monomórficas parece indicar a variabilidade genética que caracterizaria a grande adaptação dessa espécie às diversas altitudes. Além disso, caracterizaria a ampla capacidade de resposta ao ambiente, sendo esta atribuída à produção de compostos químicos pelo metabolismo secundário. Esses compostos são de interesse medicinal para o homem, o que pode evidenciar o seu uso generalizado por onde ocorre. Tais compostos, como o óleo essencial, serão posteriormente analisados para estes acessos.

TABELA 4 - Resumo dos sistemas enzimáticos polimórficos testados em sete acessos, de diferentes altitudes, de *Bidens pilosa* L. Viçosa-MG, 1995

Acessos	Padrões							
	ACP			EST-Folha		EST-Raiz		PO
	I	II	III	I	II	I	II	I II
A	X			X			X	X
B		X			X	X		X
C		X		X		X		X
D		X		X			X	X
E		X		X		X		X
F		X		X		X		X
G			X	X		X		X

TABELA 5 - Resumo dos sistemas enzimáticos testados em sete acessos de *Bidens pilosa* L. de diferentes altitudes. Viçosa-MG, 1995

Sistemas	Número de Bandas		Grupos Distintos
	Totais	Polimórficas	
ACP	10	2	3
EST-folha	5	2	2
EST-raiz	6	2	2
PO	2	2	2
IDH	3	0	0
LAP	4	0	0
SKDH	5	0	0
Total	35	8	9

AGRADECIMENTOS

À CAPES e FAPEMIG, pelo suporte financeiro; À UFV e ao Grupo Entre Folhas - Plantas Medicinais, pelo aprendizado e apoio logístico.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALFENAS, A.C., PETERS, I., BRUNE, W., PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa, MG: UFV, 1991. 242p.
- AMARAL JÚNIOR, A.T., CASALI, V.W.D., ALFENAS, A.C., PASSADOR, G.C., SILVA, D.J.H. Análise isozimática de acessos de moranga. **Horticultura Brasileira**, v.12, n.1, p.37-9, 1994.
- BASTIDAS P., P.I., VILLEGAS P., J.C., MUÑOZ F., J.E. Contribucion al conocimiento de la papunga, *Bidens pilosa* L. **Acta Agronomica**, v.39, n.3/4, p.182-96. 1989.
- BROWN, A.D.H. Isozymes, plant population, genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, v.52, n.4, p.145-57, 1978.
- CARAPETIAN, J., ESTILAI, A., HASHEMI, A. Variation and inheritance of isozymes in safflower. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.119, n.3, p.624-8, 1994.
- DEANS, S.G., SVOBODA, K.P. Biotechnology and bioactivity of culinary and medicinal plants. **AgBiotech News and Information**, v.2, n.2, p.211-6, 1990.
- DIGGLE, P.K., LOWER, S., RANKER, T.A. Clonal diversity in alpine populations of *Polygonum viviparum* (Polygonaceae). **International Journal of Plant Science**, v.159, n.4, p.606-15, 1998.
- GOODMAN, M.M., STUBER, C.W., NEWTON, K., WEISSINGER, H.H. Linkage relationships of 19 enzyme loci in maize. **Genetics**, v.96, n.3, p.697-710, 1980.
- GOTTLIEB, L.D. Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. **Bioscience**, v.21, n.18, p.939-44, 1971.
- GOTTLIEB, L.D. Conservation and duplication of isozyme in plants. **Science**, v.216, n.4544, p.373-9, 1982.
- HILDEBRANT, D.F., ORF, J.H., HYMOWITZ, T. Inheritance of an acid phosphatase and its linkage with the kunitz tripsin inhibitor in seed proteins of soybean. **Crop Science**, v.20, n.1, p.83-5, 1980.
- IRWIN, J.A., ABBOTT, R.J. Morphometric and isozyme evidence for the hybrid origin of a new tetraploid radiate groundsel in York, England. **Heredity**, v.69, n.5, p.431-9, 1992.
- LEBOT, V., LEVESQUE, J. Genetic control of kavalactone chemotypes in *Piper methysticum* cultivars. **Phytochemistry**, v.43, n.2, p.397-403, 1996.
- LEFÈVRE, F., CHARRIER, A. Heredity of seventeen isozyme loci in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Euphytica**, v.66, n.3, p.171-8, 1993.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas no Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. São Paulo: Nova Odessa, 1982. 868 p.
- MATSUMOTO, S.T., MARIN-MORALES, M.A. Análise citogenética de cinco populações de *Bidens pilosa* (Asteraceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 47, 1996, Nova Friburgo. **Resumos ...** Nova Friburgo: Colégio Anchieta, 1996. p.503.
- OLIVEIRA, J.E.Z., CASTELLANI, D.C., LARA, A.L.P., CASALI, V.W.D. Efeito do local de coleta sobre o potencial germinativo de *Bidens pilosa* L. In: ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS, 18, 1996, Belo Horizonte. **Resumos ...** Belo Horizonte: PUC, 1996. p.31.
- PEIRCE, L.C., BREWBAKER, L.C. Applications of isozymes analysis in horticultural science. **HortScience**, v.8, n.1, p.17-22, 1973.
- PRAMANIK, R., RAYCHAUDHURI, S.S. DNA content, chromosome composition, and isozyme patterns in *Plantago* L. **The Botanical Review**, v.63, n.2, p.124-39, 1997.
- SAKIYAMA, N.S. Marcadores moleculares e as hortaliças. **Horticultura Brasileira**, v.11, n.2, p.204-6, 1993.
- SALINAS, J., BENITO, C. Esterase isozymes in rye: characterization, genetic control and chromosomal location. **Theoretical and Applied Genetics**, v.71, n.1, p.136-40, 1985.
- SCANDALIOS, J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants: a review. **Biochemical Genetics** v.3, n.1, p.37-79, 1969.
- SHAW, C.R., PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. **Biochemical Genetics**, v.4, n.2, p.297-320, 1970.
- SOLTIS, D.E., HAUFLE, C.H., DARROW, D.C., GASTONY, G.J. Starch gel electrophoresis of fern: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. **American Fern Journal**, v.73, n.1, p.9-27, 1983.
- STRANG, H.E., CARAUTA, J.P.P., VIANNA, M.C., AIDA, V. Manual ilustrado de algumas plantas espontâneas no Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v.32, n.53, p.121-49, 1980.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. **Plant physiology**. California: The Benjamin Cummings, 1991. 559p.
- VASQUES, C.A.V.; VASQUES, N.V., GELLER, M. Revisão farmacognóstica do picão (*Bidens pilosa* L.). **Arquivos Brasileiros de Medicina**, Rio de Janeiro, v.60, n.2, p.107-8, 1986.
- YOMURA, M.H., CURY, P.R., JESUS, M.A.L., COELHO, C.A.R. Efeitos da suspensão aquosa de folhas secas do picão (*Bidens pilosa* L.). sobre o fluxo biliar em ratos. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v.62, n.4, p.281-2, 1988.