

Número de cromossomos, microsporogênese e viabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] do Rio Grande do Sul e Santa Catarina

AULER, N.M.F.¹; BATTISTIN, A.²; REIS, M.S.³

¹Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria. (endereço para correspondência) Rua Rodolpho Behr nº 1359, Bairro Camobi. CEP: 97105-440. Santa Maria, RS. E-mail: frizonauler@yahoo.com.br ²Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária-Sede. Rua Gonçalves Dias nº.570, Bairro Menino Deus. CEP: 90130-060. Porto Alegre RS. E-mail: alice-battistin@fepagro.rs.gov.br ³Núcleo de pesquisas em Florestas Tropicais, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Caixa Postal 476, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, msreis@cca.ufsc.br.

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo buscar informações a respeito do número de cromossomos, formação dos gametas masculinos (microsporogênese) e viabilidade polínica, em oito populações de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja), nativas nos estados: Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sob diversas condições edafo-climáticas e tipos vegetacionais. Na contagem do número de cromossomos, foram analisadas em média 10 células metafásicas por população. O corante usado foi Giemsa 2% (v/v). Nas análises da microsporogênese, foram comparadas as fases de associação e distribuição dos cromossomos na meiose, a formação de tétrades e viabilidade polínica pelo teste do χ^2 ($\alpha = 0,01$). O corante usado na identificação das células foi o carmim propiônico 2% (m/v), e para a estimativa da viabilidade do pólen foram testados três diferentes corantes: carmim propiônico 2%, orceína acética 2% (m/v) e reativo de alexander. As populações analisadas são diplóides com $2n=2X=18$ cromossomos. Nas oito populações de *Baccharis trimera* (Less.) DC, tanto na meiose I quanto na meiose II, a porcentagem de células normais, índice meiótico e viabilidade do pólen foram acima de 85%. Estes dados confirmam que as populações possuem uma microsporogênese normal, no processo evolutivo da espécie, não ocorrendo problemas quando da sua introdução em programas de seleção, cruzamento e produção de sementes. Na comparação entre os três corantes, foram observadas diferenças significativas entre os mesmos, sugerindo o corante reativo de alexander como o mais indicado para estimar a viabilidade do pólen nesta espécie.

Palavras-chave: plantas medicinais, carqueja, pólen, cromossomos, *Baccharis trimera*.

ABSTRACT: Number of chromosomes, microsporogenesis and pollen viability in populations of carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] from Rio Grande do Sul and Santa Catarina. The objective of this work was to search for information regarding the number of chromosomes, the formation of male gametes (microsporogenesis) and the pollen viability in eight populations of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja) native from the states of: Rio Grande do Sul and Santa Catarina (Southern Brazil) under several edaphic-climatic and vegetational conditions. As for chromosome counting, an average of 10 metaphasic cells were analyzed by population. The dye used was Giemsa 2% (v/v). In the analysis of microsporogenesis, comparisons were established between the phases of association and distribution of chromosomes during meiosis, the formation of tetrads and the pollen viability by the χ^2 ($\alpha = 0,01$) test. The dye used to identify the cells was propionic carmine 2% (m/v), and three different dyes were tested to estimate pollen viability: propionic carmine 2% (m/v), orcein acetic 2% (m/v) and alexander reaction. The populations under analysis are diploid with $2n=2X=18$ chromosomes. In all the eight populations of *Baccharis trimera*, both during meiosis I and meiosis II, the percentage of normal cells, the meiotic rate, and the pollen viability were above 85%. The results support the thesis that the populations analyzed have normal microsporogenesis in the evolutionary process of the species, not presenting any problems for being introduced into programs of selection, crossing and seed production. As for the comparison between the three dyes, significant differences were observed suggesting alexander reaction as being the most reliable in estimating pollen viability for the species.

Key words: medicinal plants, carqueja, pollen, chromosomes, *Baccharis trimera*.

INTRODUÇÃO

Baccharis trimera (Less.) DC. popularmente conhecida como carqueja, carquejinha ou carqueja amarga pertence à família Asteraceae. É também conhecida por diversas sinonímias no Brasil: *Baccharis genistelloides* var. *trimera*; *Baccharis triptera*; *Cacalia decurrens*; *Coniza genietelloides*; *Molina reticulata*; *Molina trimera*. É uma planta herbácea, perene e ereta com até 80 cm de altura. Ocorre em todo Brasil, desde o nível do mar até altitudes de 2.800 m. Desenvolve-se em solos ácidos, pobres em nutrientes e matéria orgânica, nos campos nativos, com solos de textura média e bem drenados. Em solos férteis e úmidos, se desenvolve de forma mais exuberante, apresentando resistência à geadas. É uma espécie dióica e propaga-se tanto vegetativamente como por sementes. A multiplicação vegetativa ocorre a partir de rizomas e, com isso, formam-se as touceiras que vão aumentando de tamanho (Correa, 1926; Hansel, 1992; Barroso & Bueno, 2002).

A carqueja é muito usada na farmacopéia popular, atribuindo-se a ela várias propriedades, especialmente a de estimular o sistema digestivo, para combater gripes, febre, problemas intestinais, diabetes, impotência, entre outros (Cruz, 1962; Balbach, 1963). Esta planta faz parte da composição de inúmeros chás emagrecedores a venda em lojas de produtos naturais (Montanari, 1999). É ainda usada na indústria de cervejaria como substituto do lúpulo, na aromatização de refrigerantes e de licores (Correa, 1926; Montanari, 1999). É uma planta muito visitada por abelhas durante a sua floração (Hansel, 1992), portanto, de importância ecológica na manutenção de polinizadores para outras espécies de seu ecossistema, podendo ser usada também na apicultura.

A destruição da flora nativa, causada principalmente pela expansão agrícola, exploração madeireira e o extrativismo predatório, representa uma grande ameaça a inúmeras espécies de plantas medicinais. Aliados ao atual avanço e revalorização destas espécies, têm aumentado o interesse das indústrias farmacêuticas e cosméticas, com isso a pressão econômica sobre estes recursos naturais tem crescido aceleradamente, colocando em perigo a sobrevivência de várias destas espécies, antes mesmo de conhecido seu potencial de uso. Conforme Reis, (1996) considerando-se o valor das plantas medicinais, não só como recurso terapêutico, mas também como fonte de recursos econômicos para as pequenas propriedades rurais, torna-se importante estabelecer linhas de ações voltadas para o desenvolvimento de técnicas de manejo, tendo em vista a utilização destas espécies pela humanidade, aspecto aliado à manutenção do equilíbrio dos ecossistemas tropicais.

Neste contexto, considerando-se o nível de exploração e a urgente necessidade de conservação e manejo, *Baccharis trimera* foi selecionada como uma das espécies prioritárias para realização de estudos de conservação e manejo, no ecossistema da Mata Atlântica (EMBRAPA/IBAMA, 2002). Estando também entre as dez espécies mais utilizadas na fitoterapia, no Rio Grande do Sul, conforme relatório da (EMATER/RS, 2003).

Assim, as análises citogenéticas podem trazer contribuições no sentido de aumentar a eficiência das estratégias de conservação e mesmo de trabalhos de melhoramento com a espécie. Estas pesquisas têm contribuído para o estudo da evolução, principalmente porque os cromossomos constituem o próprio material genético, o que os torna significativos para o rumo evolutivo das espécies. Cada cromossomo ou par de cromossomos representa um papel decisivo no desenvolvimento de um indivíduo. Por isso, o número de cromossomos e as variantes que cada um deles apresenta, dentro de uma espécie, são dados importantes para a determinação da posição filogenética e taxonômica das espécies (Guerra, 1988). Para Sybenga (1998), a citogenética fornece informações indispensáveis para a manipulação plantas. Neste contexto, o número cromossômico é um dos parâmetros mais utilizados para a caracterização citológica de uma espécie que, aliado a outros caracteres citológicos, fornece informações para o entendimento das alterações genéticas envolvidas.

Além da contagem cromossômica os estudos citogenéticos envolvem a análise da meiose. Considerando-se que é durante a meiose que ocorre a recombinação dos genes e os eventos da gametogênese são controlados por um grande número de genes, a meiose é considerada uma fonte de variabilidade genética que os organismos possuem para se adaptar ao meio ambiente em que vivem e, dessa forma, garantir a sua perpetuação através da descendência (Golubovkaya, 1979; Sing, 1993; Nassar, 1997; Pagliarini, 2000).

A viabilidade do pólen é um parâmetro de grande importância no estudo de plantas pois, além de evidenciar a potencialidade reprodutora masculina da espécie, contribui em estudos taxonômicos, ecológicos, palinológicos, fornecendo informações básicas para a aplicação prática na conservação genética, bem como na agricultura, para o planejamento de algum tipo de melhoramento ou cultivo (Alexander, 1980; Arroyo, 1981; Guinet 1989).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo buscar informações a respeito do número de cromossomos, formação dos gametas masculinos (microsporogênese) e viabilidade polínica, em oito populações de *Baccharis trimera*,

nativas nos estados: Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sob diversas condições edafo-climáticas e tipos vegetacionais.

MATERIAL E MÉTODO

As análises foram feitas no Laboratório de Citogenética Vegetal, do Departamento de Biologia, Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul – Brasil.

O material botânico utilizado compreendeu oito populações nativas coletadas nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sob diversas condições edafo-climáticas e tipos vegetacionais (Tabelas 1 e 2). As exsicatas das populações foram registradas no Herbário Santa Maria Departamento de Biologia (SMDB), do Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE) da Universidade Federal de Santa Maria (Tabela 1).

Para a determinação do número de cromossomos, sementes de *Baccharis trimera* foram germinadas, em placas de petri, com meio de cultura agar 6%, em um germinador com fotoperíodo, com temperatura em torno de 25°C. Radículas de cinco a oito milímetros de comprimento foram coletadas pré-tratadas a frio, numa temperatura em torno de 4° C, por 24 horas. Após fixadas em álcool absoluto-ácido acético (v/v), na proporção 3:1, por quatro horas, em temperatura ambiente. Após a fixação, foram estocadas em álcool 70% em geladeira. Na preparação das lâminas, as radículas pré-tratadas foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em ácido clorídrico (HCl) 1N, de cinco a dez minutos. O corante usado foi Giemsa, seguindo protocolo de Guerra (2002). As análises foram realizadas nas células cujos cromossomos apresentavam-se completamente espalhados e bem condensados, em microscópio ótico com aumento de 1000X. Dez metáfases por população, identificadas no microscópio, foram registradas no computador através do programa PixelView, com

aumento de 1000X. Após seguiu-se a contagem do número de cromossomos.

Para a microsporogênese e viabilidade polínica os botões florais foram coletados em diferentes fases de desenvolvimento, fixados em etanol-ácido acético (3:1), mantidos em temperatura ambiente de quatro a seis horas, ou na geladeira durante 24 horas. Após, o material foi transferido para o álcool 70% e armazenado na geladeira.

Na análise da microsporogênese, as anteras foram esmagadas em ácido acético 45% e coradas com carmim propiônico 2%. Nas associações dos cromossomos em diacinese e metáfase I, foram consideradas células normais as que apresentaram nove bivalentes e na disjunção dos cromossomos em anáfase e telófase I, aquelas com separação regular de nove cromossomos duplicados em cada pólo. A disjunção dos cromossomos também foi analisada em anáfase e telófase II, considerando-se células normais àquelas que apresentaram distribuição de nove cromossomos simples para cada pólo. As tétrades, que apresentaram números diferentes de quatro, como díades, tríades etc., foram consideradas células com anormalidades. O índice meiótico (IM) foi calculado de acordo com Love (1949): $IM = \frac{\text{número de tétrades normais}}{\text{número total de tétrades}} \times 100$. Foram consideradas estáveis meioticamente as populações que apresentaram IM acima de 85%.

A estimativa da viabilidade do pólen foi comparada com os corantes: orceína acética 2%, carmim propiônico 2% e reativo de alexander (verde-malaquita + fucsina ácida, Alexander, 1980), conforme Protocolo de Técnicas Citogenéticas do Laboratório de Citogenética da UFSM (Battistin, 2000). Foram considerados inviáveis os grãos que apresentaram tamanho visivelmente anormal, coloração fraca, protoplasma reduzido e/ou ausente, e viáveis os que apresentavam a exina intacta, protoplasma bem corado com distribuição homogênea.

TABELA 1. Nome das populações, sigla, locais de coleta e número do registro no Herbário SMDB das oito populações de *Baccharis trimera* (Less.) DC. no Sul do Brasil. Santa Maria/RS - UFSM - 2004.

Populações	Nº Registro no SMDB****	Sigla	Local de Coleta
1. UFSM* – Campus	9839	UFSM	Santa Maria / RS
2. Arroio Grande	9838	AGE	Santa Maria / RS
3. Reserva Biológica da CORSAN**	9836	RBC	Val de Serra / RS
4. São Vicente do Sul	9837	SVS	São Vicente do Sul / RS
5. Torres	9834	TOR	Torres / RS
6. Fazenda Amola Faca	9830	FAF	EPAGRI Lajes / SC
7. Caçador	9831	CAC	Caçador / SC
8. Reserva da EPAGRI*** – Caçador	9832	EPA	EPAGRI Caçador / SC

* (UFSM) Universidade Federal de Santa Maria; ** (CORSAN) Companhia Rio - Grandense de Saneamento e Abastecimento de Água; *** (EPAGRI) Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina; **** (SMDB) Herbário Santa Maria Departamento de Biologia.

TABELA 2. Localização geográfica, altitude, tipo de solo e cobertura vegetal das oito populações de *Baccharis trimera* (Less.) DC. nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Santa Maria/RS - UFSM - 2004.

Populações	Coordenadas	Altitude(m)	solo	Vegetação
1. UFSM*	39° 51' 25" S 53° 48' 42" W	113	Argissolo	Floresta Estacional Decidual
2. AGE	39° 51' 48" S 53° 46' 42" W	113	Argissolo	Floresta Estacional Decidual
3. RBC	29° 41' 25" S 53° 48' 42" W	450	Neossolo lítico	Floresta Estacional/Ombrófila Mista/Ombrófila Densa
4. SVS	40° 51' 25" S 54° 40' 00" W	120	Argissolo	Campo (Estepe Estacional)
5. TOR	29° 18' S 49° 44' W	12	Argissolo arenoso	Floresta Ombrófila Densa
6. FAF	27° 48' 58" S 50° 19' 34" W	918	Cambissolo	Campos do Planalto
7. CAC	26° 46' 32" S 51° 00' 50" W	950	Nitossolo (avermelhado)	Floresta Ombrófila Mista
8. EPA	26° 46' 32" S 51° 00' 50" W	950	Nitossolo (avermelhado)	Floresta Ombrófila Mista

*UFSM – Universidade Federal de Santa Maria; AGE – Arroio Grande; RBC – Reserva Biológica da CORSAN; SVS – São Vicente do Sul; TOR – Torres; FAF – Fazenda Amola Faca; CAC – Caçador; EPA – EPAGRI Caçador.

Os dados foram obtidos das análises de 15 indivíduos, onde foram escolhidos ao acaso três botões florais por indivíduo, para cada corante. Em cada lâmina os grãos de pólen foram contados em quatro campos inteiramente casualizados.

Dos dados obtidos das diferentes fases da microsporogênese e do índice meiótico, foram feitas comparações entre as populações, e, na estimativa da viabilidade do pólen, foram feitas comparações entre e dentro de cada população, para o três corantes, com a utilização do teste do χ^2 com $\alpha = 0,01$. Para estas análises foi utilizado o programa estatístico SAS (SAS, 1996).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Número de cromossomos

Nas células metafásicas, obtidas na região do meristema radicular, nas oito populações de *Baccharis trimera*, foi confirmado serem plantas diplóides apresentando número de cromossomos $2n = 2X = 18$ (Figura 1 A). O número cromossômico pode trazer informações importantes sobre as afinidades de uma espécie com outras e, juntamente com as demais características citológicas, auxilia no entendimento de variações genéticas envolvidas na evolução do grupo. Uma vez que os cromossomos constituem o próprio material genético, qualquer alteração nos mesmos, são sempre significativas no rumo evolutivo das espécies (Guerra, 1988).

Nas populações de RBC, FAF e TOR, foram observadas células poliplóides nos indivíduos analisados, porém em níveis pouco expressivos, cerca de 1,5%. Esta característica é comumente encontrada em espécies nativas, especialmente em

leguminosas, que possuem com frequência polissomatia em células meristemáticas (Garcia & Battistin, 2002).

Das espécies utilizadas na medicina popular, algumas delas já tem o número de cromossomos determinado. Por exemplo: na família Asteraceae a espécie *Achyroline satureioides* com $2n = 2X = 14$ cromossomos (Ming, 1998); em 12 populações de *Mikania micrantha*, foram encontradas oito populações com $2n = 2X = 36$ e 42 e quatro (tetraplóides) com $2n = 4X = 72$ cromossomos (Maffei et al., 1999); na família Amaranthaceae, a espécie *Pffafia glomerata* com $2n = 2X = 26$ (Tascheto et al., 2000). No gênero *Discaria*, foram encontrados: *D. articulata*, *D. chacaye* e *D. trimera*, com $2n = 2x = 22$ e *D. americana* (tetraplóide) com $2n = 4X = 44$ cromossomos (Tortosa, 1983).

Microsporogênese

Os resultados obtidos das análises nas fases da microsporogênese estão registrados na Tabela 3 e Figuras 1B, 2C, 2D.

Nas oito populações de *Baccharis trimera*, tanto na meiose I como na meiose II, a amplitude de variação da porcentagem de células normais ficou contida entre 86,04 % a 97,34%. Nas oito populações da espécie ocorreram diferenças pouco expressivas, ainda que significativas (Tabela 3), entre as mesmas, em todas as fases.

Na diacinese (Figura 1B) e metáfase I o maior percentual de normalidade foi para a população EPA (97,34%) e o menor para UFSM (88,89%). As mesmas evidenciaram diferenças significativas entre si (Tabela 3). EPA diferiu também das populações

RBC e TOR, não apresentando diferenças em relação às populações: AGE, SVS, FAF e CAC. Para anáfase e telófase I, FAF foi aquela que apresentou o maior percentual de normalidade (97,31%), não diferindo estatisticamente das populações de AGE, CAC e EPA. Enquanto que o menor percentual ocorreu na população de TOR (87,50%), sendo que a mesma não diferiu estatisticamente de UFSM (Tabela 3).

Na metáfase II, o maior percentual foi para a população de SVS (97,24%) e o menor para TOR (86,04). As mesmas diferiram estatisticamente. SVS não apresentou diferenças estatísticas quando comparada com UFSM, AGE, FAF, CAC e EPA. Além de SVS, TOR também diferiu estatisticamente de CAC, não diferindo das demais (Tabela 3).

Na anáfase/telófase II (Figura 1C), o maior percentual foi para CAC (96,68%) e o menor para TOR (88,90%). Estas populações diferiram estatisticamente entre si. CAC apresentou também diferenças de UFSM e EPA. Além de diferir de CAC,

TOR diferiu de SVS, sendo semelhante às demais populações (Tabela 3).

A meiose é considerada um mecanismo de produção de variabilidade genética que os organismos possuem para se adaptar ao meio ambiente em que vivem e, dessa forma, garantir sua perpetuação através da descendência. Alterações podem ocorrer em diferentes estágios da meiose, uma vez que já foram identificados genes atuando tanto na primeira como na segunda divisão meiótica (Golubovskaya, 1979). O comportamento meiótico é considerado regular quando as células apresentarem os cromossomos pareados na forma de bivalentes em diacinese, não apresentarem cromossomos retardatários em número significativo nas anáfases e telófases e as tétrades não possuírem micronúcleos (Wilms, et al. 1970). É durante a meiose que ocorre a recombinação dos genes, de fundamental importância na adaptação das populações ao meio ambiente (Nassar et al., 1997).

TABELA 3. Análise da microsporogênese em oito populações naturais de *Baccharis trimera* (Less.) DC, procedentes do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Santa Maria / RS - UFSM - 2004.

Populações	Meiose I				Meiose II					
	Associação Diacinese		Disjunção Anáfase II/		Metáfase II		Disjunção anáfaseII/		Tétrades	
	Metáfase I		Telófase I				telófase II			
	N**	%	N	%	N	%	N	%	N	IM
01 - UFSM*	135	88,89d	120	90,00de	153	90,19 ^a bc	176	91,47bc	1063	89,84bc
02 - AGE	152	94,08abcd	138	92,75abc	132	92,42 ^a bc	156	91,02abc	1185	90,46bc
03 - RBC	174	89,66cd	114	90,35cd	131	90,10bc	173	94,21abc	1042	90,40bc
04 - SVS	212	96,70ab	216	92,12bcd	145	97,24 ^a	207	95,65ab	980	94,47 ^a
05 - TOR	196	90,31bcd	112	87,50e	129	86,04c	126	88,90c	995	88,74c
06 - FAF	208	94,33abcd	177	97,10a	102	94,12 ^a bc	117	93,16abc	964	89,73bc
07 - CAC	217	95,85abc	163	96,31ab	123	95,12 ^a b	151	96,68a	1056	92,05ab
08 - EPA	263	97,34a	147	96,60ab	164	94,51 ^a bc	171	90,64bc	988	91,40bc

*UFSM – Universidade Federal de Santa Maria; AGE – Arroio Grande; RBC – Reserva Biológica da CORSAN; SVS – São Vicente do Sul; TOR – Torres; FAF – Fazenda Amola Faca; CAC – Caçador; EPA – EPAGRI Caçador; ** número de células analisadas; % percentual de normalidade; Letras na coluna correspondem as diferenças significativas pelo Teste do c^2 com $\alpha = 0,01$.

TABELA 4. Comparação das estimativas (%) da viabilidade do pólen entre corantes dentro de cada população e entre populações dentro de cada corante, em oito populações de *Baccharis trimera* (Less.) DC., provenientes de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Santa Maria/RS - UFSM - 2004.

Populações	Orceína acética 2%		Carmim propiônico 2%		Reativo de Alexander	
	N**	% viabilidade	N	% viabilidade	N	% viabilidade
UFSM*	2891	98,65 a A	2821	97,13 a BC	2799	90,10 b DE
AGE	2459	98,74 a A	2536	98,15 a A	2408	91,57 c DE
RBC	2434	97,99 a A	2428	96,91 a BC	2740	91,69 b BCD
SVS	2649	98,75 a A	2376	96,80 a BC	2907	93,36 b A
TOR	2625	98,02 a A	2226	96,74 b C	2620	88,90 c E
FAF	2705	98,41 a A	2700	97,63 b ABC	2895	90,57 c CD
CAC	2442	98,85 a A	2487	97,99 b AB	2827	92,71 c CDE
EPA	2758	97,64 a A	2489	97,23 a ABC	2420	92,31 b BC

*UFSM – Universidade Federal de Santa Maria; AGE – Arroio Grande; RBC – Reserva Biológica da CORSAN; SVS – São Vicente do Sul; TOR – Torres; FAF – Fazenda Amola Faca; CAC – Caçador; EPA – EPAGRI Caçador; ** número de polens viáveis; % percentual de viabilidade; Letras (minúsculas) diferentes nas linhas correspondem às diferenças dentro da população, entre corantes; Letras (maiúsculas) diferentes nas colunas correspondem às diferenças entre as populações dentro de cada corante. pelo Teste do c^2 com $\alpha = 0,01$.

A alta porcentagem de tétrades normais (Figura 1D) refletiu um índice meiótico (IM) com amplitude de variação contido entre o maior percentual na SVS (94,47%) e o menor registrado na população de TOR (88,74%). As anormalidades encontradas, na formação de tétrades, foram, na maioria células, em tríades e díades. Houveram diferenças estatísticas entre SVS e TOR. SVS deferiu também de UFSM e EPA. TOR foi semelhante estatisticamente de UFSM, AGE, RBC, FAF e EPA. Segundo Love (1949), a estabilidade meiótica é projetada pelo índice meiótico dando uma estimativa da viabilidade gamética destas plantas.

Portanto, embora pequenas, as diferenças sugerem variabilidade genética que pode estar relacionada a suas diferentes estratégias de adaptação ao meio onde elas ocorrem.

O IM é um parâmetro que tem sido levado em consideração em estudos do comportamento meiótico das plantas nativas. Vários exemplos podem ser citados. Em plantas medicinais, para cinco espécies da família Urticaceae procedentes do Rio Grande do Sul, Karsburg (2002), estimou um IM acima de 80%, as quais foram consideradas normais, exceto duas populações de *Urera baccifera* que apresentaram o IM abaixo de 80%. Para *syzygium cumini* (Myrtaceae) foi encontrado IM acima de 90% para nove acessos (Loguercio, 2003). Em espécies nativas com fins forrageiros, existem um número significativo de trabalhos com IM. Entre eles destacamos espécies de *Adesmia* (Tedesco, 2000) e *Macroptilium* (Garcia & Battistin, 2002) com IM acima de 90. Estes valores corroboram com os encontrados na espécie *Baccharis trimera*, sugerindo altas porcentagens de células viáveis na microsporogênese para estas espécies.

Viabilidade do pólen

Na Tabela 4 encontram-se os resultados da comparação das estimativas da viabilidade do pólen com três diferentes corantes para as oito populações. Em todas as populações, ocorreram diferenças significativas dentro de cada população, entre os três corantes testados. Observou-se, pela análise dos resultados, que o coranteorceína acética 2% foi o que apresentou maior porcentagem de viabilidade para todas as populações, enquanto que o corante reativo de alexander foi aquele que apresentou a menor porcentagem de viabilidade.

Na população UFSM, quando os grãos de pólen foram corados comorceína acética e carmim propiônico, as porcentagens de viabilidade não apresentaram diferenças significativas entre si, porém quando coradas com reativo de alexander as mesmas diferiram. O mesmo ocorreu com as populações de AGE, RBC, SVS e EPA. Nas populações de TOR, FAF, e ECA, os três corantes

apresentaram diferenças estatísticas entre si (Tabela 4).

Na comparação entre as populações, dentro de cada corante, não houveram diferenças significativas entre as oito populações para o coranteorceína acética. Para o corante Carmim propiônico, ocorreram diferenças entre as populações. AGE diferiu de TOR, UFSM, COR, e SVS, sendo semelhante a FAF, CAC e EPA. O Corante reativo de alexander foi o que apresentou maiores diferenças entre as populações (Tabela 4).

No presente trabalho, a viabilidade polínica foi considerada alta acima de 85%, evidenciando-se diferenças significativas entre as populações analisadas.

Alta porcentagem de viabilidade do pólen, semelhante a encontrada em carqueja, também foi observada em espécies nativas com características medicinais. Em cinco espécies da família Urticaceae (urtigas), procedentes do Rio Grande do Sul, Karsburg (2002), encontrou acima de 87% de pólen viável. *Passiflora edulis* (maracujá) apresentou um valor médio superior a 80% (Souza et al., 2002); em *Syzygium cumini* (Jambolom) da família Myrtaceae o percentual foi acima de 93,19% (Loguercio, 2003). Entre outros gêneros de plantas nativas, de modo geral nas leguminosas, com características forrageiras destacam-se: Gênero *Leucaena*, variando de 71 a 98% (Boff, 2002). Em 17 espécies do gênero *Adesmia*, a viabilidade do pólen apresentou-se acima de 90% para a maioria dos os acessos estudados (Tedesco, 2000). Nos gêneros *Eriosema* e *Rhynchosia*, também nativas na Região Sul, foi encontrada uma porcentagem de viabilidade do pólen superior a 94%, demonstrando alto potencial de fertilidade dos gametas masculinos, com exceção de *E. glabrum*, que apresentou alta inviabilidade do pólen, 14 a 27%, (Biondo & Battistin, 2001).

Na comparação entre os três corantes, constatamos que: o coranteorceína acética superestimou a viabilidade, pois cora polens viáveis e inviáveis com a mesma intensidade (Figura 1E). Nos pólen corados com carmim propiônico, os considerados viáveis mostraram uma coloração mais intensa e os inviáveis uma cor mais fraca. Como não existe outro parâmetro comparativo, às vezes a distinção entre viáveis e inviáveis torna-se duvidosa (Figuras 1F, 1G). O corante reativo de alexander é o mais indicado para estimar a viabilidade do pólen na carqueja, pois permitiu distinguir com mais segurança pólen viável do inviável. O viável apresenta parede celulósica de cor verde, pelo fato de ter afinidade com a corante verde-malaquita, que em reação química cora a celulose e hemicelulose presentes na parede da célula. O protoplasma celular do pólen reage quimicamente com a fucsina ácida dando cor púrpura (Figura 1H). O pólen inviável

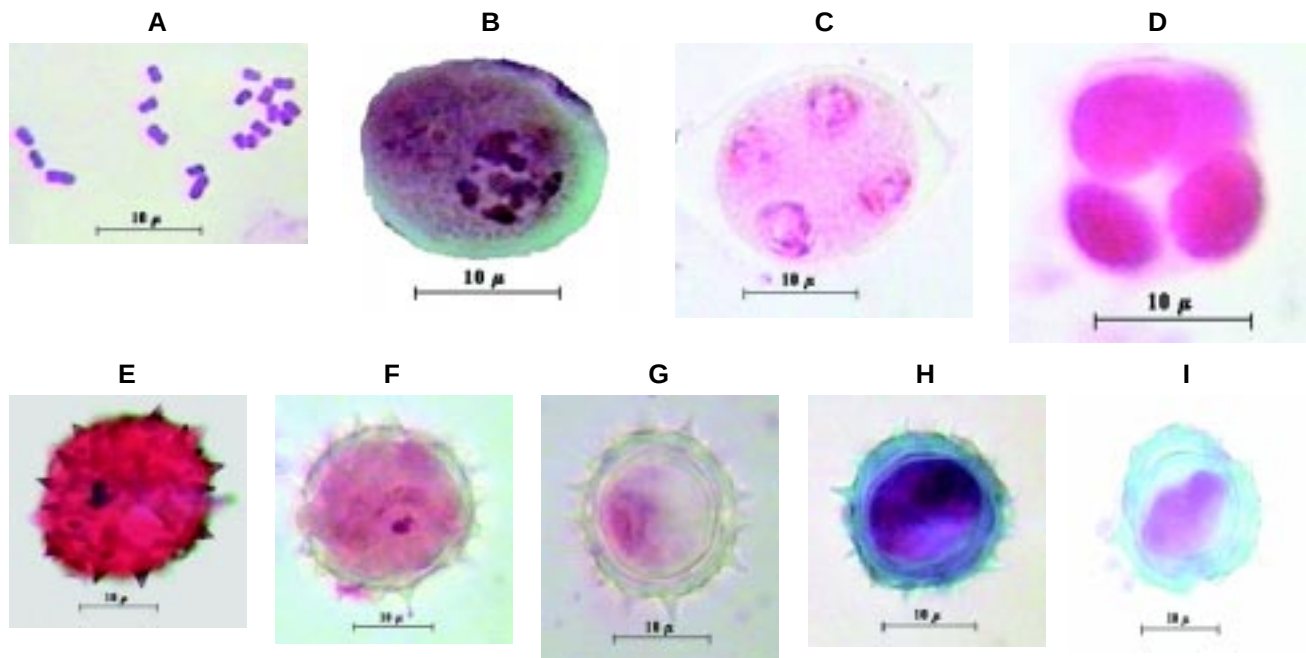


FIGURA 1 – *Baccharis trimera* (Less.) DC.: A) metáfase mitótica $2n=2x=18$ cromossomos; B) diacinese (9II); C) telófase II normal; D) tétrade normal; E) pólen corado com orceína acética; F) pólen normal corado com carmim propiônico; G) pólen anormal corado com carmim propiônico; H) pólen normal corado com reativo de alexander; I) pólen anormal corado com reativo de alexander.

apresenta a parede celulósica verde e o protoplasma, mal distribuído, pouco corado e não raramente ausente (Figura 1I).

A taxa de viabilidade polínica é um fator importante para o melhoramento, conservação e cultivo de plantas, pois em espécies alógamas, como a carqueja, o fluxo gênico através do pólen aumenta a possibilidade de formação de diferentes combinações entre alelos, e, em última análise, de variabilidade genética.

As diferenças significativas, encontradas para as fases no processo de microsporogênese entre as populações, bem como para a viabilidade do pólen, revelam a ocorrência de variabilidade genética entre e dentro das mesmas, característico com sua forma de reprodução e fluxo gênico: dioicidade, fecundação cruzada, polinização por abelhas, dispersão de sementes pelo vento, condições edafo-climáticas e os diferentes biomas em que elas ocorrem. Estes aspectos devem ser levados em consideração na determinação de estratégias de cultivo e conservação genética desta espécie.

No contexto da variabilidade genética de plantas medicinais Scheffer et al. (2004), ressaltaram a importância das variabilidades interespecíficas e intraespecíficas, em especial das espécies nativas. Segundo os autores, a variabilidade existente é o resultado da pressão ambiental nos diversos biomas, produzindo características que são muito importantes nos trabalhos de conservação. Deve-

se considerar que o status da variabilidade genética das plantas medicinais resulta na necessidade de se estabelecer diferentes estratégias de manejo e conservação. Ainda, a existência de diferentes tipos de compostos ativos produzidos, por estas plantas, podem resultar em usos diferenciados e consequentes diferenças de estratégias.

Os resultados obtidos pelo presente estudo permitem concluir que: a) As oito populações de *Baccharis trimera* (Less.) DC. são diplóides com $2n=2x=18$ cromossomos; b) Nas oito populações de *Baccharis trimera* (Less.) DC., tanto na meiose I quanto na meiose II, a porcentagem de células normais, índice meiótico e viabilidade do pólen foram acima de 85%. Estes dados confirmam que as populações possuem uma microsporogênese normal, no processo evolutivo da espécie, não ocorrendo problemas quando da sua introdução em programas de seleção, cruzamento e produção de sementes; c) O corante mais indicado para a estimativa da viabilidade do pólen, na espécie *Baccharis trimera* (Less.) DC. é o reativo de Alexander; d) As diferenças significativas, encontradas para as fases no processo de microsporogênese entre as populações, bem como para a viabilidade do pólen, revelam a ocorrência de variabilidade genética entre e dentro das mesmas. Este aspecto deve ser levado em consideração na determinação de estratégias de cultivo e conservação genética desta espécie.

AGRADECIMENTO

Ao CNPq e a FAPERGS, pelo suporte financeiro. Ao professor Dr. José Henrique Silva, pela colaboração na análise estatística.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALEXANDER, M.P. A. Versatile stain for pollen fungi, yeast and bacterium. **Stain Technology**, v.1, n.5, p.13-8, 1980.
- ARROYO, M.T.K. Breeding systems and pollination biology in leguminosae. In: POLHILL, M.; RAVEN, P.H. (Eds). **Advances in legumes systematics**, Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. p.723-69.
- BALBACH, A. **A Flora Nacional na Medicina Doméstica**. 11.ed. São Paulo: MVP, 1963. 230p.
- BARRET, S.C.H. ; KOHN, J. R. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: FALK, D.A.; HOLSINGER, K.E. (Eds.). **Genetic and conservation of rare plants**. New York: Oxford University Press, 1991. p.3-30.
- BARROSO, G.M.; BUENO, O.L. **Compostas subtribo: Baccharidinae**. Itajaí: Flora Ilustrada Catarinense, 2002. 302p.
- BATTISTIN, A. **Técnicas para mitose e meiose em vegetais**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2000. 11p. (Notas de aula).
- BIONDO, E.; BATTISTIN, A. Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) e *Rhynchosia* LOUR (Leguminosae-Faboideae), nativas na região sul do Brasil. **Bioikos**, v.15, n.1, p.39-44, 2001.
- BOFF, T. **Comportamento meiótico e fertilidade do pólen em espécies de *Leucaena* Benth (Leguminosae/Mimosoidae)**. Dissertação (Mestrado), 2002. 159p. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CORREA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1926. p.205, 214.
- CRUZ, G.L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1962. 177p.
- EMATER/RS. **Plantas medicinais mais usadas no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EMATER, 2003. 46p.
- EMBRAPA/IBAMA. **Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas**. Resultados da 1ª reunião técnica. Brasília: EMBRAPA/IBAMA, 2002. 184p.
- GARCIA, A.G.; BATTISTIN, A. Microsporogênese de três espécies do Gênero *Macroptilium* (BENTH.) URBAN (leguminosae – Papilionoideae) nativas no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.8, n.1-2, p.121-9, 2002.
- GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142p.
- GUERRA, M. **Como observar cromossomos**. Um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 131p.
- GOLVBOVSKAYA, I.N. Genetics control of meiosis. **International Review of Cytology**, v.58, p.247-90, 1979.
- GUINET, P.H. **Advances in legume biology**: struture evolution, and biology of pollen in Leguminosae. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 1989. 842p.
- HANSEL, R. **Hagers Handbuch fuer die Pharmazeutische Praxis**. Berlim: Springer Verlag, 1992. p.795-801.
- KARSBURG, I.V. **Citogenética, eletroforese e concentração de proteínas totais em cinco espécies da família Urticaceae do Rio Grande do Sul**. 2002. 104p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- LOGUERCIO, A.P. **Microsporogênese, eletroforese e atividade antimicrobiana de *Syzygium cumini* (L.) Skeels oriundo do Rio grande do Sul**. 2003. 89p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- LOVE, R. A. **Estudos citológicos preliminares de trigos Riograndenses**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura do Rio Grande do Sul, 1949. 14p. (Circular n.74)
- MAFFEI, E.M.D. et al. Chromosomal polymorphism in 12 populations of *Mikania micrantha* (Compositae). **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.3, p.433-44, 1999.
- MING, L.C. **Plantas medicinais aromáticas e condimentares**. Botucatu: Unesp Campus Botucatu, 1998. v.1, p.46.
- MONTANARI JR., I. **Inventário dos recursos florestais da Mata Atlântica: plantas medicinais. exploração, impactos atuais e potencialidades de manejo**. Campinas: CCQBA – UNICAMP, 1999. 84p.
- NASSAR, N.M.A.; FREITAS, M. Prospects of polyploidizing Cassava, *Manihot esculenta* Crantz, by unreduced microspores. **Plant Breeding**. n.116, p.195-7, 1997.
- OLIVEIRA, E.J.; BATISTA, S.V.G.; MALUF, W.R. **Cultive carqueja em sua horta**. Lavras: Departamento de Agricultura. 1999. 28p. (Boletim Técnico de Hortaliças, n.27)
- PAGLARINI, M.S. Meiotic behavior of economically important plant species: the relationship between fertility and male sterility. **Genetics and molecular Biology**, v.23, n.4, p.997-1002, 2000.
- REIS, M.S. Manejo sustentado de plantas medicinais em ecossistemas tropicais. In: STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um Guia de Estudo Interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. p.199-215.
- S.A.S. Institute. **SAS/STAT Guide for personal computers**, SAS, Institute Inc., Cary, NC. Version 6.03, 1996.
- SCHEFFER, M.C.; MING, L.C.; ARAÚJO, A.J. Conservação de recursos genéticos de plantas medicinais. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro, 2003. Disponível em: www.cpatsa.embrapa.br/livroorg/medicinasconservacao.doc. Acesso em: 12 out. 2004.
- SINGH, R.J. **Plant cytogenetics**. Urbana: University of Illinois, 1993. 391p.
- SOUSA, M.M.; PEREIRA, T.N.S.; MARTINS, E.R. Microsporogênese e Microgametogênese Associadas ao tamanho do botão floral, antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). **Ciência Agrotécnica**, v.26, n.6, p.1209-17, 2002.
- SYBENGA, J. Forty years of cytogenetics in plant

breeding a personal view. In: LELLEY, T. **Current Topics in plant cytogenetics related to plant improvement**. Viena: Universitäts Verlag, 1998. p.22-33.

TASCHETO, O.M.; PAGLIARINI, M.S. Número de cromossomos em populações de *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 46., 2000, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: SBG, 2000. p.368.

TEDESCO, S.B. **Morfologia, microsporogênese e modo de reprodução das espécies Brasileiras do**

gênero *Adesmia* DC. (Leguminosae). 2000. 163p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

TORTOSA, R. D. El genero *Discaria* (Rhamanaceae). **Boletin de la Sociedad Argentina de Botánica**, v.22, n.1-4, p.301-35, 1983.

WILMS, H.J.; CARMICHAEL, J.W; SCHANK, S.C. Cytolical and morphological investigations on the grass *Hemarthria altissima* (poir) Starpf et C.E. Hubb. **Crop Science**, v.10, p.309-12, 1970.