



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

## Seleção de Genótipos de *Artemisia annua* L. via BLUP

### SELECTION OF *Artemisia annua* L. GENOTYPES USING BLUP

Bárbara Nicole Daboit\*, José Abramo Marchese†,

Lucas Vinicius Dallacorte‡, Alexia Kozelinski §, Emanuelli Pereira da Silva¶,

Luiz Rafael Stunder<sup>l</sup>

#### RESUMO

Este trabalho teve como objetivo selecionar genótipos superiores de *Artemisia annua* L., dentro da variedade brasileira CPQBA 3, ricos em artemisinina (ART), através do uso de caracteres agronômicos, fisiológicos e fitoquímicos, para a criação de novas cultivares. O trabalho foi conduzido na área experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, com 13 “famílias”, sendo implantados três blocos com três plantas de cada família por bloco, a partir da utilização do teste de progênes de meios-irmãos. A seleção foi feita dentro de cada família, onde a melhor planta em cada bloco foi selecionada para as variáveis biomassa, relação folha-caule, estatura, número de ramos primários e secundários, taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, eficiência no uso da água e condutância estomática. As avaliações fisiológicas foram obtidas por meio do equipamento IRGA e para análise de Modelos Lineares Mistos, foi empregado o sistema estatístico SELEGEN-REML/BLUP. Dentre os três melhores genitores obtidos, (35, 25 e 6) o 25 apresentou resultados satisfatórios para o maior número de variáveis, principalmente para a produção de biomassa vegetal, o que indica que este detém os caracteres desejados para um aumento do teor de ART por planta.

**Palavras-chave:** melhoramento, artemisinina, CPQBA 3, biomassa.

#### ABSTRACT

This work aimed to obtain superior *Artemisia annua* L. genotypes, within the Brazilian variety CPQBA 3, rich in artemisinin (ART), through the use of agronomic, physiological and phytochemical characters for the creation of new cultivars. The experiment was conducted in Federal Technological University of Paraná experimental area, in Pato Branco Campus, with 13 "families", being implanted three blocks with three plants of each family per block, using the half-brothers progeny test. The selection was made within each family, where the best plant in each block was selected for the variables biomass, leaf-stem ratio, height, primary and secondary branches number, CO<sub>2</sub> assimilation rate, water use efficiency and stomatal conductance. The physiological evaluations results were obtained using the IRGA equipment and for the analysis of Mixed Linear Models the SELEGEN-REML/BLUP statistical system was used. Among the three best parents (35, 25 and 6), the 25 number parent presented the expected results for the largest number of variables, mainly plant biomass production, which indicates that it has the desired characters for an increase in the ART content per plant.

**Keywords:** breeding, artemisinin, CPQBA 3, biomass.

\* Agronomia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil; [barbaradaboit@alunos.utfpr.edu.br](mailto:barbaradaboit@alunos.utfpr.edu.br)

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco (Pato Branco); [abramo@utfpr.edu.br](mailto:abramo@utfpr.edu.br)

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil; [lucasv.dallacorte@gmail.com](mailto:lucasv.dallacorte@gmail.com)

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil; [alexia kozelinski@alunos.utfpr.edu.br](mailto:alexia kozelinski@alunos.utfpr.edu.br)

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil; [eps.emanuelli@gmail.com](mailto:eps.emanuelli@gmail.com)

<sup>l</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil; [luizr.stunder@hotmail.com](mailto:luizr.stunder@hotmail.com)



## 1 INTRODUÇÃO

*Artemisia annua* L. é uma planta anual herbácea pertencente à família Asteraceae, caracterizada como uma planta de dias curtos obrigatória, com fotoperíodo crítico de 13 horas (MARCHESE *et al.*, 2002), além de ser detentora de mecanismo fotossintético C<sub>3</sub> (MARCHESE *et al.*, 2005). Originária da China e aclimatada no Brasil, é definida como uma espécie aromática devido à presença de compostos bioativos, os quais são provenientes de seu metabolismo especializado, como terpenos, alcaloides e compostos fenólicos, produzidos por meio da rota do ácido mevalônico e do ácido chiquímico, com objetivo de proteção e atração de organismos (MARCHESE, 2006; FRAGOSO, 2014; CERVEZAN, 2017; TAIZ *et al.*, 2017). Esses metabólitos estão localizados nos tricomas glandulares das folhas e flores da planta e podem constituir o óleo essencial (PERES, 2004).

Os principais produtos metabólicos de *A. annua* são a artemisinina, o ácido artemisínico, a deoxiartemisinina, artenuina B, dihidroartemisinina e a cânfora (CERVEZAN, 2017). Algumas dessas biomoléculas são utilizadas na produção de agroquímicos e medicamentos (FERRARI, 2013), sendo, por exemplo, empregadas no tratamento de uma doença parasitária negligenciada, a malária, a qual é provocada por protozoários do gênero *Plasmodium* e transmitida a partir da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles* (FERREIRA, 2021).

A artemisinina (ART) é uma lactona sesquiterpênica isolada de *A. annua* que possui efeito antimalárico comprovado contra cepas resistentes de *P. falciparum*, sendo esta a espécie causadora das formas mais graves da doença (MARCHESE, 2006; WEATHERS *et al.*, 2011). Sua produção ocorre pelo metabolismo especializado da planta, através do precursor denominado ácido dihidroartemisínico (DHAA) (FERREIRA *et al.*, 2018). Entretanto, a concentração total de ART por planta é baixa, variando entre 0,1 e 1%, em peso seco de folha. A produção da ART é diretamente influenciada pelo genótipo da planta e pelas condições ambientais em que a mesma encontra-se, sendo que em relação a esse último quesito, a sua exposição adequada ao fotoperíodo favorece a produção dessa biomolécula (ELFAWAL *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2018; ZANATTA, 2018). Desse modo, o reduzido teor na planta acarreta alto valor monetário e limita a produção em grande escala, a qual é necessária para suprir a demanda do mercado (BOLINA, 2011; FERREIRA *et al.*, 2018).

Para a redução no preço dos antimaláricos cujo princípio ativo é a ART, é fundamental o aumento do conteúdo dessa molécula por planta. A partir da seleção e do cruzamento de plantas de *A. annua* com alto teor de ART e DHAA com plantas da mesma espécie, que convertem bem o DHAA para ART, pode-se promover a formação de indivíduos melhorados geneticamente (híbridos). Esses terão maior teor de artemisinina do que os genótipos atualmente disponíveis, o que possibilitaria tornar esta planta uma cultura comercial viável para agricultores, direcionada para a indústria farmacêutica (FERREIRA *et al.*, 2018). Dessa forma, levanta-se a seguinte hipótese: é possível aumentar o teor de artemisinina em plantas de *Artemisia annua*, por meio do cruzamento entre famílias da variedade brasileira CPQBA3?

Os modelos mistos são aplicados no melhoramento genético de espécies, a partir de procedimentos biométricos, os quais tem por finalidade estimar os componentes de variância, predizer os valores genéticos e esclarecer os efeitos genotípicos e ambientais, o que permite a seleção apurada de indivíduos superiores (ATROCH *et al.*, 2010; CRUZ *et al.*, 2012). A melhor predição linear imparcial (BLUP) é a análise estatística direcionada a esse modelo, a qual aumenta a precisão seletiva e é ideal para efeitos genéticos aditivos, genotípicos e de dominância, levando em conta a relação genética entre plantas, a casualidade entre as unidades de seleção e o desequilíbrio entre elas (RESENDE, 2016). Logo, a partir dele é possível a seleção de genitores pelos componentes de média.



Assim, através do uso de técnicas de propagação por meio de sementes, visa-se formar populações homogêneas de plantas com potencial de rendimento de 2% de artemisinina. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi obter genótipos superiores de *A. annua*, dentro da variedade brasileira CPQBA 3, ricos em ART, selecionados através do uso caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos, para criação de cultivares, por meio da metodologia BLUP.

## 2 MÉTODO

O trabalho foi conduzido na área experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco, com sementes oriundas de *A. annua* de anos anteriores, em que foram selecionados genótipos dentro de uma população de plantas originadas do genótipo CPQBA 3. A semeadura foi efetuada no mês de junho de 2020 em tubetes contendo substrato orgânico esterilizado. O desenvolvimento das mudas ocorreu dentro de estufa plástica, sob condições controladas de iluminação. As plântulas com aproximadamente 20 cm de altura foram transplantadas, na segunda quinzena do mês de outubro do mesmo ano para uma área previamente selecionada com solo corrigido quimicamente. O delineamento adotado foi blocos ao acaso com avaliação de progênies de meios-irmãos, sendo 13 “famílias” implantadas em três blocos com três plantas de cada família por bloco. O espaçamento utilizado foi de um metro entre linhas e entre plantas. Os indivíduos de bordadura foram implantados a um metro de distância dos estratos.

Em março de 2021 foi realizada a primeira avaliação agrônômica para seleção e eliminação de plantas dentro dos estratos. Em todas as plantas foram avaliados os seguintes caracteres agrônômicos: altura (m), diâmetro das seções inferior, mediana e superior do dossel (m), número de ramificações (unidade) primárias e secundárias. Além destes, quando as plantas atingiram o nível de florescimento médio (50% + 1), realizou-se a colheita de ramos e de folhas individualmente, deixando a porção terminal do ramo principal, de aproximadamente 30 cm, para produção de sementes. O material vegetal foi colhido separadamente e colocado para secar até peso constante em estufa com circulação de ar e temperatura de 40 °C. Após secagem, foram separadas as folhas dos ramos e ambos foram pesados para aferição de rendimento de peso seco de ramos (kg), peso seco de folha (kg) e biomassa de plantas (kg ha<sup>-1</sup>).

As plantas foram selecionadas a partir da avaliação agrônômica, considerando ainda aspectos sanitários, galhos quebrados, plantas caídas ou atacadas por insetos, permanecendo a melhor planta de cada família dentro de cada bloco. O restante foi descartado por meio de corte raso, incluindo as plantas de bordadura.

As avaliações fisiológicas foram realizadas utilizando o sistema de medição de trocas gasosas, equipado com um analisador infravermelho de gases (IRGA) modelo LI-6400XT (LICOR, Lincoln, Nebraska – USA), com injetor automático de CO<sub>2</sub> e fonte artificial de luz vermelha e azul.

As variáveis analisadas foram biomassa total (BM\_T, kg ha<sup>-1</sup>), biomassa foliar (BM\_F, kg ha<sup>-1</sup>), relação folha-caule (R\_FC), estatura (ESTAT, m), rendimento total de ramos (RT\_R, kg ha<sup>-1</sup>), número de ramos principais (N\_prin), número de ramos secundários (N\_sec), taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (PHOTO, μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), eficiência no uso da água (EUA, μmol<sup>-1</sup>) e condutância estomática (COND, mol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>).

A seleção foi feita dentro de cada família, em cada bloco, na qual a planta com melhor desempenho agrônômico e fisiológico foi selecionada. Foi utilizado o software de sistema estatístico e seleção genética computadorizada SELEGEN-REML/BLUP para a análise de Modelos Lineares Mistos (RESENDE, 2002).

## 3 RESULTADOS



**Tabela 1 – Seleção de genitores (GEN) baseado nos valores de Nova Média (N\_M) pelo método de BLUP para as variáveis: biomassa total (BM\_T), biomassa foliar (BM\_F) relação folha/caule (R\_FC), estatura (ESTAT), rendimento total de ramos (RT\_R), número de ramos principais (N\_prin), número de ramos secundários (N\_sec), taxa de assimilação de CO2 (PHOTO), eficiência no uso da água (EUA) e condutância estomática (COND) de *Artemisia annua*, UTFPR, Pato Branco, 2021.**

Ordem	BM_T		BM_F		R_FC		ESTAT		RT_R	
	GEN	N_M	GEN	N_M	GEN	N_M	GEN	N_M	GEN	N_M
1	35	6081,64	35	2901.61	61	30.816	53	2.50	35	3040,82
2	25	5967,85	25	2899.04	4	30.804	63	2.50	25	2983,92
3	6	5925,86	6	2897.89	25	30.793	35	2.49	6	2962,93
4	61	5896,84	54	2897.26	63	30.787	54	2.49	61	2948,42
5	54	5876,96	61	2896.83	53	30.783	61	2.49	54	2938,48
6	49	5857,75	43	2896.31	66	30.779	4	2.49	49	2928,87
7	55	5833,41	49	2895.88	54	30.773	6	2.48	55	2916,70
8	53	5814,69	66	2895.22	43	30.769	72	2.48	53	2907,34
9	63	5799,04	53	2894.69	55	30.764	66	2.47	63	2899,52
10	4	5777,45	55	2894.23	6	30.761	43	2.46	4	2888,72
11	43	5757,72	4	2893.63	72	30.756	25	2.46	43	2878,86
12	72	5740,80	63	2893.13	49	30.751	49	2.45	72	2870,40
13	66	5716,28	72	2892.68	35	30.745	55	2.45	66	2858,14

  

Ordem	N_prin		N_sec		PHOTO		EUA		COND	
	GEN	N_M	GEN	N_M	GEN	N_M	GEN	N_M	GEN	N_M
1	53	21.52	72	51.33	49	9.10	72	0.49	55	0.28
2	35	21.06	63	51.07	66	9.07	54	0.42	66	0.26
3	55	20.60	61	50.81	63	8.96	25	0.37	49	0.24
4	6	20.25	4	48.72	55	8.89	49	0.35	63	0.23
5	61	19.95	66	47.39	72	8.85	63	0.33	4	0.21
6	4	19.34	6	46.30	54	8.80	6	0.32	25	0.20
7	66	18.72	54	45.40	25	8.71	61	0.31	53	0.19
8	43	18.19	43	44.30	35	8.64	35	0.29	54	0.18
9	25	17.74	53	43.43	6	8.56	66	0.29	35	0.18
10	72	17.20	55	42.52	4	8.50	43	0.28	43	0.17
11	49	16.75	25	41.67	53	8.42	55	0.27	72	0.16
12	63	16.38	49	40.53	43	8.36	53	0.26	6	0.16
13	54	15.85	35	39.38	61	8.30	4	0.25	61	0.15

Fonte: autoria própria (2021)

Para a variável BM\_F, característica desejável para a obtenção de maior de ART e DHAA, os três melhores genitores foram o 35, 25 e 6, respectivamente (Tab. 1). Esses se apresentaram nas mesmas posições para as variáveis BM\_T e R\_RT. Para EUA e R\_FC, dentre os três (35, 25 e 6), o genitor 25 destacou-se com os melhores resultados (0.37 e 3.0793, respectivamente). Ambos resultados correlacionam-se com a maior quantidade de biomassa foliar. Machado *et al.* (2010) salienta que a água evapotranspirada produz certa quantidade de matéria seca, logo, quanto maior a EUA, maior será a quantidade de matéria a ser produzida. Apesar da maior EUA, o genitor 25 detém valores médios para PHOTO e COND, não demonstrando grande eficiência nas trocas gasosas, o que justifica os altos valores de BM\_T e R\_RT.

Para a variável R\_FC, o genótipo 25 ficou em terceiro lugar, enquanto para N\_prin, N\_sec e ESTAT, apresentou os menores resultados. Portanto, a maior quantidade de biomassa está concentrada nas folhas,



característica desejável para tal seleção. O alto valor de  $R_{RT}$  em relação aos baixos de  $N_{prin}$  e  $N_{sec}$  significa que apesar de baixa quantidade de ramos, estes se apresentaram com maior massa. Os genitores 35 e 6 apresentaram maior  $N_{prin}$  do que  $N_{sec}$ , além de menor  $R_{FC}$ , o que indica que direcionaram seus recursos para produção de ramos e não para folhas. É possível destacar que o genótipo 72 apresentou baixos valores médios para  $BM_F$  e  $R_{FC}$ , podendo assim ser descartado da seleção.

#### 4 CONCLUSÃO

Na seleção de genitores de *Artemisia annua* L., o genitor 25 foi o que demonstrou resultados mais satisfatórios para os caracteres avaliados. Dessa forma, tendo sido selecionado o melhor genótipo e se mantida as condições ambientais adequadas, tais como exposição ao fotoperíodo necessária à planta, pode-se ter altas concentrações de ART. Destaca-se que as análises do teor de artemisinina, e perfil fitoquímico do óleo essencial, não foram realizadas em função da pandemia da Covid-19.

Os trabalhos de melhoramento de *A. annua* devem continuar afim de maximizar a produção de moléculas bioativas, buscando plantas eficientes na produção destinadas a esse propósito, por meio de cruzamentos entre variedades com quimiotipos desejáveis, com o objetivo de tornar estas culturas viáveis à produção e redução dos custos associados à terapêutica das doenças de interesse.

Os resultados obtidos evidenciam que o método de seleção por BLUP pode ser viável no melhoramento genético da *Artemisia annua* L., para os caracteres avaliados.

#### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à Fundação Araucária pelo auxílio por meio da bolsa de Iniciação Científica. À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, ao Prof<sup>o</sup>. Dr. José Abramo Marchese e ao mestrando Lucas Vinicius Dallacorte, pela orientação e viabilização deste trabalho.

#### REFERÊNCIAS

- ATROCH, André Luiz. Avaliação e seleção de progênies de meios-irmãos de guaranazeiro. **Rev. Ciências Agrárias**. v.53, n.2, p.123-130, 2010.
- BOLINA, Cristiane de Oliveira. **Variabilidade genética e associação entre caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos em variedades de *Artemisia annua* L.** Pato Branco, UTFPR, 2011.
- CERVEZAN, Thalita Cristina Marques. **Perfil fitoquímico de *Artemisia annua* L. em diferentes tipos de manejo pós-colheita.** Botucatu: UNESP, 2017.
- CRUZ, Cosme Damião; RAGAZZI, Adair José; CARNEIRO, Pedro Crescêncio Souza. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético.** 4 ed. Viçosa, MG: UFV, 2012. v. 2. 514 p.
- ELFAWAL, Mostafa; TOWLER, Melissa; REICH, Nicholas; WEATHERS, Pamela; RICH, Stephen. Dried whole-plant *Artemisia annua* slows evolution of malaria drug resistance and overcomes resistance to artemisinin. **PNAS**, California, v. 112, n.3, p. 821-826, 2015.



- FERRARI, Ana Paula. **Atividade alelopática, antioxidante e antimicrobiana de plantas com uso popular antimalárico**. Pato Branco: UTFPR, 2013.
- FERREIRA, Jorge; MARCHESE, José Abramo; BENEDITO, Vagner; SANDHU, Devinder; LIU, Shuoqian. Seasonal and Differential Sesquiterpene Accumulation in *Artemisia annua* Suggest Selection Based on Both Artemisinin and Dihydroartemisinic Acid may Increase Artemisinin in planta. **Frontiers in Plant Science**, [S.I.], v. 9, 1096, 2018.
- FERREIRA, Marcelo Urbano. **Parasitologia contemporânea**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 336 p. ISBN 9788527737159. 2021.
- FRAGOSO, Thaís Palmeira. **Análise do uso medicinal do gênero *Artemisia* no Brasil com base em fatores tradicionais, científicos, políticos e patentários para subsidiar o programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2014.
- MACHADO, A. F. L.; FERREIRA, L.R.; SANTOS, L.D.T.; FERREIRA, F.A.; VIANA, R.G. MACHADO, M.S. Eficiência fotossintética e uso da água em plantas de eucalipto pulverizadas com glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.28, n.2, p. 319-327, 2010.
- MARCHESE, José Abramo; CASIRAGHI, Vanessa; LIRA, Rodrigo; TEDESCO, Angela Cristina; REHDER, Vera Lúcia Garcia. Flowering in plants of *Artemisia annua* L. standed to diferent conditions of photoperiod and temperature. **Acta Horticulturae**, Bélgica, v. 569, p. 275-280, 2002.
- MARCHESE, José Abramo; BROETTO, Fernando; LIN, Chau Ming; DUCATTI, Carlos; RODELLA, Roberto Antônio; VENTRELLA, Marília Contin; RODRIGUES, Greice Daiane Gomes; FRANCESCHI, Lúcia de . Carbon isotope composition and leaf anatomy as a tool to characterize the photosynthetic mechanism of *Artemisia annua* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology** (Impresso), Londrina, v. 17, n.1, p. 187-190, 2005.
- MARCHESE, José Abramo. **Caracterização do mecanismo fotossintético e aspectos relacionados à floração de *Artemisia annua* L.** Botucatu: UNESP, 2006.
- PERES, Lázaro Eustáquio Pereira . **Metabolismo Secundário**. São Paulo: ESALQ, 2004.
- RESENDE, Marcos Deon Vilela de. **SELEGEN-REML/BLUP**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. 67p.
- RESENDE, Marcos Deon Vilela de. Software Selegen-REML/BLUP: a useful tool for plant breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Brazil, v. 16, p. 330 -339, 2016.
- TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo; MOLLER, Ian Max; MURPHY, Angus. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888p. ISBN 978-85-8271-367-9.
- WEATHERS, Pamela; ARSENAULT, Patrick; COVELLO, Patrick; MCMICKLE, Anthony TEOH, Keat; REED, Darwin . Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies in planta and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases. **Phytochemistry Reviews**. [S.I.], v. 10, n. 2, p. 173-183, 2011.
- ZANATTA, Jorge Luiz. **Utilização de caracteres agrônômicos, fisiológicos e fitoquímicos na seleção e melhoramento de *Artemisia annua* L.** Pato Branco: UTFPR, 2018.