

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROPAGAÇÃO, VARIABILIDADE
GENÉTICA E QUÍMICA DE
Zeyheria montana Mart**

BIANCA WALÉRIA BERTONI
Química Industrial

Jaboticabal – São Paulo – Brasil

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROPAGAÇÃO, VARIABILIDADE
GENÉTICA E QUÍMICA DE
Zeyheria montana Mart**

BIANCA WALÉRIA BERTONI

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ferreira Damião Filho
Co-Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de DOUTOR EM
AGRONOMIA – Área de Concentração
Genética e Melhoramento de Plantas.

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
2003

Bertoni, Bianca Waléria
B547p Propagação, variabilidade genética e química de *Zeyheria montana* Mart. / Bianca Waléria Bertoni. – – Jaboticabal, 2003
ix, 165 f.:il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003

Orientador: Carlos Ferreira Damião Filho

Banca examinadora: José Roberto Môro, Muracy Belo, Suzelei de Castro Franca, José Odair Pereira

Bibliografia

1. Banco de germoplasma. 2. Micropropagação. 3. RAPD. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 575:631.53

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BIANCA WALÉRIA BERTONI - São José do Rio Preto, 12 de fevereiro de 1967. Graduada em Ciências com licenciatura plena em química pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de São José do Rio Preto. Graduada em Química Industrial pela Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP. Mestre em Agronomia pela Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal. Docente da Unidade de Biotecnologia da UNAERP, onde participa de projetos de cultura de tecido de plantas medicinais visando a conservação de recursos genéticos. Participou do projeto GENOMA ONSA – Sequenciamento do genoma da *Xylella fastidiosa* FAPESP e do GENOMA SUCEST – Genoma da Cana, Sequencing – FAPESP. Atualmente é membro da equipe responsável pela implantação do banco de germoplasma *in vitro* de plantas medicinais do Cerrado. Projeto FAPESP temático-Biota intitulado “Monitoramento e ampliação do banco de germoplasma de plantas medicinais do Cerrado”.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Suzelei de Castro França, pela preciosa convivência e eterna confiança.

À Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira, pelo exemplo de coragem e perseverança e principalmente pelo companheirismo.

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira Damião Filho, pela liberdade de escolha.

À Rosane de Castro França, pelo enorme carinho e paciência com que sempre me acolheu.

A todos os meus amigos da Unidade de Biotecnologia Vegetal da UNAERP, por terem de alguma maneira contribuído para este trabalho.

À UNAERP e FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO – 1	CONSIDERAÇÕES GERAIS
1.1.Introdução.....	1
1.2.Revisão de Literatura.....	3
1.3.Referências.....	10
CAPÍTULO – 2	PROPAGAÇÃO SEXUADA: AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Zeyheria montana</i> MART. COLETADAS EM TRÊS ESTADOS BRASILEIROS
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	16
2.1.Introdução.....	17
2.2.Material e Métodos.....	19
2.3.Resultados e Discussão.....	21
2.4.Conclusões.....	25
2.5.Referências.....	25
CAPÍTULO – 3	PROPAGAÇÃO ASSEXUADA: ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Zeyheria montana</i> MART
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	27
3.1.Introdução.....	28
3.2.Material e Métodos.....	30
3.3.Resultados e Discussão.....	32
3.4.Conclusões.....	40
3.5.Referências.....	40
CAPÍTULO - 4	SISTEMA REPRODUTIVO: DETERMINAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTIVO
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	43
4.1.Introdução.....	44
4.2.Material e Métodos.....	46
4.3.Resultados e Discussão.....	47
4.4.Conclusões.....	48
4.5.Referências.....	49

CAPÍTULO - 5	COLETAS E MAPEAMENTO DE RECURSOS GENÉTICOS DE <i>Zeyheria montana</i> NO ESTADO DE SÃO PAULO	
	RESUMO.....	51
	ABSTRACT.....	51
	5.1.Introdução.....	52
	5.2.Material e Métodos.....	53
	5.3.Resultados e Discussão.....	54
	5.4.Conclusões.....	93
	5.5.Referências.....	93
CAPÍTULO - 6	AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD DE RECURSOS GENÉTICOS DE <i>Zeyheria montana</i> LOCALIZADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO.	
	RESUMO.....	95
	ABSTRACT.....	96
	6.1.Introdução.....	97
	6.2.Material e Métodos.....	98
	6.3.Resultados e Discussão.....	101
	6.4.Conclusões.....	108
	6.5.Referências.....	108
CAPÍTULO - 7	MONITORAMENTO QUÍMICO DE RECURSOS GENÉTICOS DE <i>Zeyheria montana</i> NO CERRADO DO ESTADO DE SÃO PAULO	
	RESUMO.....	111
	ABSTRACT.....	111
	7.1.Introdução.....	112
	7.2.Material e Métodos.....	113
	7.3.Resultados e Discussão.....	114
	7.4.Conclusões.....	159
	7.5.Referências.....	159
CAPÍTULO - 8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	164

Abreviaturas

AIA	Ácido indolilacético
AFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
ANA	Ácido naftalenoacético
AMOVA	Análise de variância molecular
AVA	Autovalores
AVE	Autoverores
Bap	Benzilaminopurina
Bet	Ácido betulínico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CP	Componentes principais
CTAB	Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide
Flav	Flavonóide
GPS	Sistema de posicionamento global
2ip	Isopentelaminopurina
IBA	Ácido indolbutílico
Ole	Ácido oleanólico
RAPD	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
TDZ	Thidiazuron
TMF	6-hidroxi-5,7,8 - Trimetoxiflavona
WP	Woodo Plant
Urs	Ácido ursólico

LISTA DE FIGURAS

		Página
CAPÍTULO - 2	PROPAGAÇÃO SEXUADA: AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Zeyheria montana</i> Mart COLETADAS EM TRÊS ESTADOS BRASILEIROS	
Figura 1 -	Planta adulta de <i>Zeyheria montana</i>	18
Figura 2 -	Semente de <i>Zeyheria montana</i>	19
CAPÍTULO - 5	COLETAS E MAPEAMENTO DE RECURSOS GENÉTICOS DE <i>Zeyheria montana</i> NO ESTADO DE SÃO PAULO	
Figura 1 -	Localização das áreas de coleta e suas coordenadas....	91
Figura 2 -	Localização das áreas de coleta de <i>Zeyheria montana</i> no Estado de São Paulo.....	92
CAPÍTULO - 6	AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD DE RECURSOS GENÉTICOS DE <i>Zeyheria montana</i> LOCALIZADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO	
Figura 1 -	Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA de alguns indivíduos de <i>Zeyheria montana</i> com o primer 8 (ACA ACG CCT C).....	104
Figura 2 -	Dendograma de todos os acessos coletados em diferentes municípios do Estado de São Paulo.....	105
Figura 3 -	Dendograma baseado nas distâncias euclidianas médias inter-populacionais derivadas da AMOVA.....	106
Figura 4 -	Escalonamento multidirecional não métrico.....	107
CAPÍTULO - 7	MONITORAMENTO QUÍMICO DE RECURSOS GENÉTICOS DE <i>Zeyheria montana</i> NO CERRADO DO ESTADO DE SÃO PAULO	
Figura 1 -	Estruturas do flavonoide e triperpenos isolados de <i>Zeyheria montana</i>	119
Figura 2 -	Dendograma obtido com base nas distâncias genéticas entre 20 indivíduos de <i>Zeyheria Montana</i> com alto e baixo teor de 6-hidroxi 5,7, 8- trimetoxiflavona.....	120

Figura 3 -	Dispersão dos acessos de <i>Zeyheria montana</i> em relação aos dois primeiros componentes principais CP1 (flavonóide e ácido ursólico) e CP2 (ácido betulínico) obtidos na análise de quantificação química.....	151
Figura 4 -	Dendograma dos acessos do grupo 1 mostrado no gráfico de componentes principais.....	153
Figura 5 -	Dendograma dos acessos do grupo 2 mostrado no gráfico de componentes principais.....	154
Figura 6 -	Dendograma dos acessos do grupo 3 mostrado no gráfico de componentes principais.....	154
Figura 7 -	Dendograma dos acessos do grupo 4 mostrado no gráfico de componentes principais.....	155
Figura 8 -	Dendograma dos acessos do grupo 5 mostrado no gráfico de componentes principais.....	156
Figura 9 -	Dendograma dos acessos do grupo 6 mostrado no gráfico de componentes principais.....	157
Figura 10 -	Dendograma dos acessos do grupo 7 mostrado no gráfico de componentes principais.....	157
Figura 11 -	Dendograma dos acessos do grupo 8 mostrado no gráfico de componentes principais.....	158
Figura 12 -	Dendograma dos acessos do grupo 9 mostrado no gráfico de componentes principais.....	158

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO - 2 PROPAGAÇÃO SEXUADA: AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>Zeyheria montana</i> MART. COLETADAS EM TRÊS ESTADOS BRASILEIROS.	
Tabela 1 - Porcentagem de germinação de sementes de <i>Zeyheria montana</i> coletadas em diferentes Estados Brasileiros.....	23
Tabela 2 - Porcentagem de germinação de sementes de <i>Zeyheria montana</i> armazenada por 30, 120 e 180 dias sob condição ambiente.....	24
Tabela 3 - Porcentagem de germinação de sementes de <i>Zeyheria montana</i> sob condições controladas de temperatura e luminosidade na presença e ausência de expansão alada.....	24
Tabela 4 - Conteúdo de umidade inicial e porcentagem de germinação de semente de <i>Zeyheria montana</i> antes e após exposição a -20°C e -196°C.....	25
CAPÍTULO 3- PROPAGAÇÃO ASSEXUADA: ESTABELECIMENTO DO PROTOCOLO DE MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Zeyheria montana</i> MART	
Tabela 1 - Trramento de assepsia utilizados para a descontaminação de sementes de <i>Zeyheria montana</i>	34
Tabela 2 - Efeito da assepsia na descontaminação de sementes de <i>Zeyheria montana</i>	35
Tabela 3 - Antibiógrama realizado com <i>Pseudomonas</i> isolada de <i>Zeyheria Montana</i>	36
Tabela 4- Efeito do tipo e concentração de citocinina nos segmentos nodais de <i>Zeyheria montana</i> inoculados em meio WP.....	37
Tabela 5 - Efeito do TDZ e da associação TDZ e AIA nos segmentos nodais de <i>Zeyhria montana</i> inoculados em meio WP.....	38
Tabela 6 - Efeito do tipo e concentração de auxinas no enraizamento de <i>Zeyheria montana</i>	39
Tabela 7 - Efeito do substrato na aclimação de <i>Zeyheria montana</i> ..	40
CAPÍTULO 4 - SISTEMA REPRODUTIVO: DETERMINAÇÃO DO SISTEMA REPRODUTIVO	
Tabela 1 - Determinação do número de pólen e óvulos por flor de	

<i>Zeyheria montana</i>	47
CAPÍTULO 5 - COLETAS E MAPEAMENTO DE RECURSOS GENÉTICOS DE <i>Zeyheria montana</i> NO ESTADO DE SÃO PAULO	
Tabela 1 - Acessos de <i>Zeyheria montana</i> coletadas dentro e fora do Estado de São Paulo.....	56
Tabela 2 - Localização geográfica da população A de <i>Zeyheria montana</i>	58
Tabela 3 - Localização geográfica da população B de <i>Zeyheria montana</i>	60
Tabela 4 - Localização geográfica da população C de <i>Zeyheria montana</i>	61
Tabela 5 - Localização geográfica da população D de <i>Zeyheria montana</i>	62
Tabela 6 - Localização geográfica da população E de <i>Zeyheria montana</i>	64
Tabela 7 - Localização geográfica da população F de <i>Zeyheria montana</i>	65
Tabela 8 - Localização geográfica da população G de <i>Zeyheria montana</i>	66
Tabela 9 - Localização geográfica da população H de <i>Zeyheria montana</i>	67
Tabela 10 - Distância em Km entre as plantas de <i>Zeyheria montana</i> dentro da população A.....	69
Tabela 11 - Distância em Km entre as plantas de <i>Zeyheria montana</i> dentro da população B.....	72
Tabela 12 - Distância em Km entre as plantas de <i>Zeyheria montana</i> dentro da população C.....	73
Tabela 13 - Distância em Km entre as plantas de <i>Zeyheria montana</i> dentro da população D.....	74
Tabela 14 - Distância em Km entre as plantas de <i>Zeyheria montana</i> dentro da população E.....	78
Tabela 15 - Distância em Km entre as plantas de <i>Zeyheria montana</i> dentro da população F.....	80
Tabela 16 - Distância em Km entre as plantas de <i>Zeyheria montana</i> dentro da população G.....	81
Tabela 17 - Distância em Km entre as plantas de <i>Zeyheria montana</i> dentro da população H.....	82
Tabela 18 - Distância média entre as diferentes populações de <i>Zeyheria montana</i>	90
CAPÍTULO 6 - AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD DE RECURSOS GENÉTICOS DE <i>Zeyheria</i>	

montana LOCALIZADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO..

Tabela 1 -	Primers utilizados.....	101
CAPÍTULO 7 - MONITORAMENTO QUÍMICO DE RECURSOS GENÉTICOS DE <i>Zeyheria montana</i> NO CERRADO DO ESTADO DE SÃO PAULO.		
Tabela 1 -	Teor de 6-hidroxi 5,7,8-trimetoxiflavona em acessos de <i>Zeyheria montana</i> coletados em diferentes localidades.....	121
Tabela 2 -	Média dos teores de 6-hidroxi 5,7,8-trimetoxiflavona (TMF) e triterpenos (mg/gps) em <i>Zeyheria montana</i> calculada dentro das subpopulações.....	126
Tabela 3 -	Médias dos teores de 6-hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona (TMF) e triterpenos (mg/gps) em <i>Zeyheria montana</i> calculada entre as populações.....	127
Tabela 4 -	Teor de ácido oleanólico em acessos de <i>Zeyheria montana</i>	127
Tabela 5 -	Teor de ácido ursólico em acessos de <i>Zeyheria Montana</i>	132
Tabela 6 -	Teor de ácido betulínico em acessos de <i>Zeyheria montana</i>	137
Tabela 7 -	Estimativa das variâncias (autovetores-AVA), associados aos componentes principais (CP) e respectivos coeficientes de ponderação (autovetores AVE) das características teores de flavonóide (Flav) ácido ursólico (Urs), betulínico (Bet) e oleanólico (Olé).....	145
Tabela 8 -	Estimativa das variâncias (autovetores-AVA) associado aos componentes principais (CP) e respectivos coeficientes de ponderação (autovetores AVE) das características teores de flavonóide (Flav), ácido ursólico (Urs) e betulínico (Bet).....	145
Tabela 9 -	Escore relativos aos 167 acessos de <i>Zeyheria Montana</i> , obtidos em relação aos componentes principais (CP) correspondentes às variáveis teor de flavonóide, ácido ursólico e betulínico.....	145
Tabela 10 -	Agrupamento de acessos de <i>Zeyheria Montana</i> pelo método de Tocher realizado a partir dos dados de análise química do flavonóide, ácido ursólico e betulínico.....	150
Tabela 11 -	Relação dos indivíduos que foram selecionados para a conservação em banco de germoplasma e suas localizações.....	152

LISTA DE QUADRO

	Página
CAPÍTULO 6 -	
AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA POR RAPD DE RECURSOS GENÉTICOS DE <i>Zeyheria montana</i> LOCALIZADOS NO ESTADO DE SÃO PAULO	
Quadro 1 -	
Diversidade genética de populações de <i>Zeyheria montana</i> calculada pelo índice de Shannon.....	102

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.Introdução

Muitas espécies da família Bignoniaceae são conceituadas por seu valor medicinal. Entre elas podemos citar as do gênero *Tabebuia*, *Tecoma*, *Catalpa* e *Zeyheria*, tendo esse último apenas dois representantes no Brasil: *Zeyheria montana* e *Zeyheria tuberculosa* (Bureau & Schumann, 1997) .

Z. montana Mart. é conhecida no Brasil como bolsa de pastor, o extrato aquoso de suas raízes é indicado, pela medicina popular, no combate de doenças da pele e como agente anti-tumoral. As raízes e caules dessa espécie contêm várias naftoquinonas e a substância majoritária com 0,011% é o lapachol. Esse valor representa 19 vezes o teor de lapachol encontrado em *Tabebuia avellanedae* que tem sido considerada a principal fonte dessa substância (Jácome et al, 1999). A essa naftoquinona têm sido atribuídas as atividades anti-inflamatórias (Almeida et al 1990), anti-úlceras gástricas (Goel et al, 1987), anti-neoplásica (Fávaro et al, 1990) e anti-microbiana (Ali et al, 1998; Oliveira et al, 2001). As folhas contêm principalmente triterpenos e flavonóides.

O extrativismo constante de plantas medicinais, em regiões endêmicas, tem comprometido as populações naturais de espécies nativas o que tem levado à extinção muitos grupos de plantas cuja atividade farmacológica já está preconizada assim como também comprometidas e extinguidas aquelas em que os estudos fitoquímicos e farmacológicos ainda são insipientes ou inexistentes.

Atualmente, os trabalhos realizados na área de conservação têm contado com o recurso da tecnologia do Sistema de Posicionamento Global (GPS) que, ao plotar dados de localização geográfica em mapas, permite correlacionar indivíduos, populações, ecossistemas, biomas com dados de topografia, geologia, pedologia, geomorfologia, hidrografia etc. A análise

desses dados associados ao teor de metabólitos secundários, pode fornecer informações importantes quanto à influência desse fatores no metabolismo da planta e, até mesmo, na atividade biológica dela. Além disso o sistema de geoprocessamento permite mapear áreas onde se encontra a maior diversidade de uma espécie sendo uma ferramenta útil e atualmente indispensável em programas de conservação *in situ* e *ex situ*.

No mundo todo há vários programas de conservação *in situ* e *ex situ* de recursos genéticos de plantas cultivadas e não domesticadas, cuja meta principal é proteger o patrimônio genético de espécies potencialmente úteis. Segundo Villalobos & Engelmann (1995), de todo material vegetal do mundo conservados em coleções *ex situ* as plantas medicinais representam apenas 0,07%.

Uma das principais questões relacionadas com essa baixa porcentagem de coleção de plantas medicinais é o alto custo de manutenção dos bancos de germoplasmas. Atualmente, a utilização de marcadores moleculares tem representado uma alternativa viável de redução desse custo, uma vez que permite caracterizar os acessos e, com isso, apenas os indivíduos que realmente representam a diversidade da espécie, são conservados.

Técnicas de cultura de tecidos têm sido apontadas como ferramentas úteis na conservação e propagação de plantas medicinais (Hannweg et al, 1996; Ajith et al, 1998; Rao et al 1998; McCartan & Van Staden, 1998; McCartan & Van Staden, 1999;). As plantas medicinais alógamas produzidas por sementes, em geral apresentam grande variabilidade genética, portanto, geram quimiotipos com teores de princípios ativos variáveis e ação biológica diversa. A micropropagação tem sido usada como uma das técnicas mais viáveis para a produção de clones elites com características superiores quanto o teor de metabólito secundário e atividade biológica.

A conservação de recurso genético através de bancos de germoplasma, por meio de coleções de sementes, indivíduos adultos ou cultura de tecido é atualmente a medida mais viável para preservar espécies silvestres potencialmente úteis. Conservar esses materiais é uma necessidade premente tendo em vista a velocidade com que os habitats vêm sendo destruídos ou

transformados pelas diversas atividades humanas. As conseqüências disso são a redução drástica da viabilidade genética ou mesmo extinção de espécies, a subdivisão de habitats, a formação de novos ambientes, o aumento das condições de estresse, a mistura de conjuntos gênicos antes isolados, a intensificação da hibridação introgressiva e mesmo a origem de novas taxa.

Considerando as informações acima expostas, o presente trabalho teve por objetivo fazer um estudo multidisciplinar com *Z. montana* visando a conservação dessa espécie. A diversidade genética foi avaliada por meio do marcador molecular RAPD. Foram realizados estudos de propagação sexuada e assexuada (micropropagação) e, também, a quantificação de metabólitos secundários de interesse. Com as informações geradas por esse trabalho consideramos estar de alguma forma, dando uma pequena contribuição para o que foi estabelecido e preconizado no Brasil, em 1992, na Eco 92, com os acordos da Agenda 21 e Convenção sobre a diversidade biológica.

1.2. Revisão de Literatura

O aumento da população do mundo, assim como a necessária elevação da qualidade de vida de seus habitantes, particularmente nos países em desenvolvimento, está gerando um aumento considerável na demanda de produto agrícola, seja em relação a alimentos ou mesmo a fitoterápicos. Essa demanda tem estimulado a expansão de áreas cultivadas para habitats silvestres o que tem comprometido a biodiversidade de grandes biomas. Essa realidade mostra para todas as nações a necessidade urgente de se investir recursos financeiros e humanos no desenvolvimento de tecnologia e conhecimento sobre a conservação de recursos genéticos.

A biotecnologia, em seu sentido amplo, é o conjunto de técnicas que utiliza os seres vivos e suas propriedades para a produção de bens, e nos últimos anos, tem permitido, através da biologia molecular, com as diversas técnicas de marcadores moleculares, associada à cultura de células, tecidos e

órgãos *in vitro*, o desenvolvimento de técnicas eficientes de conservação de espécies vegetais potencialmente úteis (Toribio & Celestino, 2000).

As plantas produzem substâncias destinadas ao seu crescimento a exemplo dos polissacarídeos, açúcares e proteínas, os quais são considerados compostos do metabolismo primário. Elas sintetizam, também, compostos especiais, denominados metabólitos secundários, que são produzidos por diferentes rotas metabólicas gerando uma imensa diversidade de estruturas químicas dentro da classe dos alcalóides, flavonóides, cumarinas, terpenóides etc. Os metabólitos secundários exercem importantes papéis de proteção contra microorganismos, herbívoros, intempéries ambientais, além de interferirem em processos simbióticos e atração de polinizadores (Briskin, 2000). São também fontes armazenadoras de carbono e nitrogênio que retornam ao metabolismo primário quando isso é requerido pela planta. O balanço entre a atividade do metabolismo primário e secundário da planta é dinâmico e pode ser consideravelmente afetado pelo crescimento da planta, diferenciação dos tecidos, fase vegetativa e estresse ambiental.

Mais de 100.000 compostos secundários de plantas já foram isolados e identificados e, a cada ano, centenas de novas descobertas têm aumentado esse número (Verpoorte et al., 1998). Muitos desses compostos são consumidos, diariamente, por nós na forma de dentifrícios, sabonetes, perfumes ou mesmo ingeridos de alguns alimentos, condimentos, chás, xaropes etc.

O consumo de cosméticos e medicamentos, elaborados a partir de produtos naturais, tem crescido nos últimos anos e isso tem estimulado empresas como a Merck a investir 10% de seus recursos financeiros em pesquisas com novas substâncias de origem vegetal (Nader & Mateo, 1998). Apesar do grande consumo direto ou indireto e, também, do investimento financeiro de muitas empresas em produtos naturais esses, sem dúvida alguma, têm sido pouco estudados em relação ao seu potencial farmacológico.

Especialistas em mercado financeiro estimam que as vendas, no varejo, de produtos derivados de plantas medicinais situam-se na ordem de US\$ 15 bilhões por ano. Destes, US\$ 7 bilhões são gerados na Europa, US\$ 3 bilhões

nos Estados Unidos, US\$ 1 bilhão na América Latina e os restantes US\$ 4 bilhões na Ásia e na África. Estima-se, ainda, que o volume de vendas irá triplicar nos próximos dez anos. O maior crescimento é esperado nos Estados Unidos seguido da América Latina e da Europa (Grunwald, 1997; Calixto, 2001).

A eficácia e segurança de muitas plantas medicinais já foram comprovadas cientificamente o que as legitimizam como recurso terapêutico benéfico e indispensável à humanidade. Entretanto, há problemas de vários níveis que limitam seu uso. Entre eles podemos citar:

- Dificuldade de identificação botânica, muitas plantas possuem semelhanças morfológicas que só podem ser distinguidas por especialista.
- Algumas espécies sintetizam os metabólitos secundários em concentrações muito baixas, o que exige processos de extração dispendiosos e elaboração de formulações farmacêuticas complexas. Os exemplos mais importantes são os das substâncias com atividade anti-câncer.
- Algumas espécies apresentam enorme variabilidade genética com alterações quanti e qualitativas nos metabólitos secundários o que dificulta a obtenção de droga padronizada.
- Muitas espécies estão sob forte pressão antrópica, expostas à erosão genética e redução drástica de populações endêmicas o que dificulta sua utilização em larga escala.

A cultura de células e tecidos pode ser empregada no sentido de resolver ou minimizar alguns dos pontos citados acima, seja na multiplicação sistematizada de plântulas elites, pelo processo de micropropagação ou seja na produção de metabólitos secundários que tenham relevância do ponto de vista terapêutico e que por algum tipo de impedimento não podem ser produzidos por síntese.

A produção de células e tecidos vegetais por meio de cultura de calos, de raízes, de plântulas, de células em suspensão, fusão de protoplasto etc. são estabelecidas a partir dos objetivos que se pretende alcançar.

Várias técnicas podem, por exemplo, auxiliar na seleção de sementes ou propágulos para domesticação e multiplicação de plantas.

A grande maioria das plantas medicinais são coletadas em habitat natural e por maior que seja o número de indivíduos numa localidade, não são suficientes para atender a uma demanda constante e ininterrupta, principalmente, quando a espécie tem multi-usos. Apenas o cultivo sistematizado pode garantir produção regular e em larga escala. Para se estabelecer sistemas de cultivo adequados se faz necessário material propagativo como sementes, tubérculos, estolões, enfim, algum tipo de estrutura que permita a multiplicação da planta alvo.

Muitas espécies medicinais apresentam problemas com as sementes ou com partes vegetativas que limitam a sua multiplicação em escala. É para essas espécies que as técnicas de cultivo *in vitro* são indicadas. Exemplos importantes são: espécies de *Dioscorea*, *Digitalis*, *Chlorophytum*, *Psychotria ipecacuanha*, *Commiphora wightii*, *Taxus brevifolia*, *Cinchona* etc.

A germinação de sementes, de algumas espécies medicinais, pode aumentar muito quando são utilizados procedimentos de cultura de tecidos, principalmente quando as sementes apresentam dormência, endosperma reduzido, ou grande infestação de microorganismos (Fay, 1992).

A micropropagação é a técnica de maior aplicabilidade da cultura de tecido e tem sido utilizada para multiplicar centenas de espécies medicinais. Essa técnica é usada rotineiramente para multiplicar genótipos selecionados, ou para substituir acessos que tenham adquirido caracteres indesejáveis como baixa produtividade e susceptibilidade à doenças. Plantas que são cultivadas em larga escala, fora de seu centro de origem, também têm sido micropropagadas como, por exemplo, a *Atropa belladonna*, *Rauwolfia serpentina*, *Dioscorea floribunda*, várias espécies de *Mentha* etc.

O declínio no teor de princípios ativos ou de óleos essenciais, em plantas medicinais, é comum quando estas são cultivadas por longos períodos e submetidas a vários cortes. Nesses casos, renovação e reintrodução de plantas são necessárias quando se deseja manter alta produtividade desses constituintes ativos para a manutenção de programas de cultivo viáveis economicamente. Espécies de *Mentha*, *Citronella* e *Cymbopogon* têm sido micropropagadas em larga escala para atender a esses programas.

Eclipta alba (L) Hassk. é uma Asteraceae cosmopolita, possui atividade anti-hepatotóxica que é atribuída a dois cumestanos: wedelolactona e demetilwedelolactona. As sementes dessa espécie apresentam boa germinação, entretanto o estabelecimento de um cultivo em escala, a partir de sementes, visando à produção de extratos é inviável, uma vez que apresenta diferentes quimiotipos com produção irregular dos compostos de interesse. França et al (1995) desenvolveram a micropropagação a partir de segmentos nodais dessas espécies e estabeleceram um protocolo eficiente para produção em escala de *E. alba*. Esse tipo de propagação promove o desenvolvimento de estruturas morfológicamente pré-existent e a exposição de segmentos nodais a concentrações adequadas de fitoreguladores e nutrientes estimula a quebra de dormência das gemas axilares promovendo uma rápida multiplicação de novas plântulas.

Protocolos de micropropagação de *Maytenus aquifolia* e *Maytenus ilicifolia*, espécies que também apresentam quimio e morfotipos, foram desenvolvidos nos laboratórios da Unidade de Biotecnologia da UNAERP visando ao cultivo em escala. Plantas micropropagadas apresentaram a mesma produtividade em fitomassa e o mesmo perfil químico das matrizes doadoras de explantes (Pereira et al, 1994; Pereira et al 1995). A mesma metodologia de propagação *in vitro* foi desenvolvida com o *Stryphnodendron polyphythum* (barbatimão) cuja atividade cicatrizante é atribuída aos taninos presentes na casca da árvore (França et al, 1995).

Pothomorphe umbellata, uma espécie medicinal também conhecida como caapeba ou pariparoba, está inscrita na farmacopéia brasileira devido à sua ação anti-úlceras, colagoga e anti-hepatotóxica. Recentemente, foi isolado dessa espécie um composto denominado *N-benzoilmesalina* que tem atividade bactericida contra *Helicobacter pylori* (Isobe, et al 2002). Micropropagação via organogênese direta a partir de segmento de folha foi estabelecida com objetivo de se obter plântulas em escala para cultivo convencional, uma vez que as sementes apresentam graves problemas com a germinação (Pereira et al, 2000).

Atualmente, as técnicas de biologia molecular com marcadores do tipo RAPD, AFLP, RFLP e microsatélite têm permitido conferir a fidelidade genética dos clones obtidos a partir da micropropagação. Estudos realizados com *Angelica acutiloba* e *Angelica sinensis* cultivadas na Ásia, utilizando marcadores do tipo RAPD e RFLP, mostraram a proximidade genética existente entre as plantas avaliadas e, os acessos que foram micropropagados a partir de *Angelica acutiloba*, quando comparados à planta matriz, não apresentaram bandas polimórficas (Watanabe et al, 1998). *Angelica sinensis*, espécie extremamente popular na China, contém ligustilido como componente majoritário do óleo essencial e a planta é utilizada por mulheres para regular a menstruação, e também, para prevenir doenças vasculares.

Achillea millefolium é uma espécie medicinal utilizada em vários países da Europa e América e consta nas principais farmacopéias do mundo devido sua ação anti-inflamatória atribuída ao azuleno e ação espasmódica devido a presença de flavonóides. Entretanto, há quimiotipos nessa espécie que apresentam substâncias alergênicas, o que compromete a questão de eficácia e segurança da droga. Além disso, espécies denominadas *Achillea asplenifolia*, *A. roseoalba* e *A. collina* são quase sempre confundidas com *A. millefolium* devido à semelhança morfológica. Wallner et al, (1996) desenvolveram um protocolo de micropropagação de *Achillea* e avaliaram a proximidade genética de todas essas plantas com objetivo de encontrar uma metodologia adequada para avaliar diferentes acessos de *Achillea*. Os resultados obtidos, com marcadores do tipo RAPD e RFLP, apontaram variações intra e interespecíficas nos materiais avaliados e num dos clones foi registrado uma mutação, o que permitiu constatar variabilidade criada sob condições *in vitro*.

Gavidia et al. (1996) selecionaram 15 plantas de *Digitalis obscura*, espécie medicinal que produz cardenolídeo e, após quantificarem esse composto em todos os acessos selecionaram a planta que apresentou maior teor da droga e a micropropagaram por dois anos consecutivos. Após esse período, compararam o perfil genético do clone e da matriz, concluindo que o protocolo de micropropagação utilizado preservou a integridade genética do material estudado e esse resultado foi corroborado pelas análises realizadas

em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) cujos cromatogramas mostraram similaridade entre o clone e a matriz.

Estudos realizados sobre fidelidade genética usando RAPD também foram conduzidos com plantas micropropagadas de *Zingiber officinales* e os resultados foram semelhantes aos obtidos com *Digitalis obscura*, ou seja dos quinze “primers” utilizados todos promoveram bandas monomórficas confirmando a fidelidade genética entre clones e plantas doadoras de explante (Rout et al, 1998).

Uma importante aplicabilidade da cultura de tecidos é a conservação de germoplasma *in vitro*. Segundo Villalobos & Engelmann (1995) de todo material vegetal do mundo conservado em coleções *ex situ* as plantas medicinais representam apenas 0,07%.

As coleções *in vitro*, além de conservarem acessos que sejam representativos da diversidade genética das populações naturais, permitem fornecer um fluxo constante de explantes e plântulas com excelentes condições fitossanitárias. A conservação de germoplasma *in vitro* pode ser realizada com sementes sintéticas, fragmentos de tecidos e órgãos, assim como a partir aglomerados celulares.

Os diferentes tipos de estruturas vegetais podem ser conservados sob dois diferentes sistemas: o primeiro é conservado por curto ou médio tempo sob condições de temperatura que variam de 12 a 18°C e o meio de cultura é suplementado com compostos promotores de estresse osmótico e substâncias que retardam o crescimento; o segundo sistema é realizado à temperatura de -196°C em nitrogênio líquido e é denominado criopreservação. Diferentes sistemas de criopreservação têm sido desenvolvidos para preservar gemas apicais, embriões zigóticos e somáticos, calos e células em suspensão.

Mannonen et al. (1990) trabalharam com células de *Catharanthus roseus* e *Panax ginseng* com o objetivo de estudarem a conservação dessas células em dois diferentes sistemas. Células de *P. ginseng*, com teor de 37,22 mg/g de ginsenosídeo, foram preservadas em óleo mineral e também criopreservadas. Após a regeneração das células, no primeiro sistema houve redução drástica no teor de ginsenosídeo (0,89 mg/g) enquanto o material

criopreservado se manteve com o mesmo teor (37,22mg/g), resposta semelhante foi obtida com os teores de ajmalicina e catharantina em células de *C. roseus*.

Tubérculos de *Diocorea* são fontes de saponinas esteroidais e a diosgenina é considerada, sob o ponto de vista econômico, a mais importante substância dessa classe por ser matéria prima para a indústria farmacêutica que a converte em derivados esteroidais. Malaurie et al. (1993) estabeleceram, no centro ORSTOM, em Montpellier na França, um banco de germoplasma *in vitro* de *Dioscorea*, com acessos de 11 espécies coletados em diferentes países, inclusive no Brasil. Esses autores determinaram que 12 indivíduos por clone, com duas replicatas, é o número adequado para garantir que o material introduzido no banco de germoplasma esteja assegurado do ponto de vista da conservação dos acessos.

Na Unidade de Biotecnologia Vegetal várias espécies de plantas medicinais estão sendo introduzidas no Banco de Germoplasma de Plantas Medicinais do Cerrado (UNAERP), onde os protocolos de conservação *in vitro* foram estabelecidos como parte de um projeto temático dentro do programa Biota/Fapesp. O Biota é um programa que tem como objetivo inventariar e caracterizar a biodiversidade do Estado de São Paulo, definindo os mecanismos para sua conservação, seu potencial econômico e sua utilização sustentável.

1.3..Referências

- Ajith, A.; Rao, C.S.; Latha, R.; Josekutty, P.C; Balakrishna, P. 1998. Micropropagation of *Uraria picta*, a medicinal plant through axillary bud culture and callus regeneration. In-Vitro cellular and developmental biology-Plant.,34(2): 136-140
- Ali, R.M.; Houghton, P.J.; Hoo, T.S. 1998. Antifungal activity of some bignoniaceae found in Malaysia. Phytotherapy Research, vol 12, 331-334.

- Almeida, E.R.; Silva, Filho,A.A.; Santos,E.R.; Lopes,C.A. 1990. Antiinflammatory action of lapachol. J. Ethnopharmacol 29 (2): 239-241.
- Briskin, D. Medicinal Plant and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. Plant Physiology, 124: 507-514. 2000.
- Bureau. E.; Schumann,C.;. Bignoniaceae. In Flora Brasiliensis(C.F.P von Martius, A. G. Eichler and I. Urbans, eds), vol 8, part 2. Verlag von J. Cramer, Weinheim. P. 352-355,1897.
- Fay, M.F. Conservation of rare and endangered plant using in vitro methods. In Vitro Cell. Dev. Biol. 28P:1- 4, 1992.
- Fávaro, O.C.N.;Oliveira,M.M.;Rossini,M.A.A.; Kamakura,C.R.; Pinto, A.V.;Pinto, M.C.F.R.1900 Seleção por peio de célula KB de substâncias e extrato potencialmente ativo em quimioterapia do câncer.An. Acad. Bras. Cien. 62(3) 217-224.
- França, S.C; Duarte, IB; Cerdeira, R.M.M; Pereira, A.M.S. Micropagation of *Stryphnodendron polyphythum* (Barbatimão). Plant, Cell, tissue & Organ Culture. 42: 291- 293,1995.
- França, S.C.; Bertoni, B.W.; Pereira, A.M.S. Antihepatotoxic agent in micropropagated plantles of *Eclipta alba*. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 40: 297-299,1995.
- Gavidia, I.; Agudo, L.C.; Pérez-Bermúdez, P. Selection and long-term cultures of high-yelding *Digitalis obscura* plants: RAPD markers for analisis of genetic stability. Plant Science,121: 197-205, 1996.
- Grunwald, J. The market situation and marketing of Herbal Medicinal Products (HMP) in Europe. In: II World Congress on Medicinal and Aromatic Plants

- for Human Welfare. 1997. ICMAP/ISHS/SAIPA: Buenos Aires..., Mendoza (Argentina), 10-15 nov. L. 33
- Goel, R.K. Pathaak,N.K.; Biswas, M.;Pandey,V.B. Sanyal,A.K. 1987. Effect on lapachol, a naphtaquinone isolated from *Tectona grandis* on experimental on experimental peptic ulcer and gastric secretion. J. Pharm Pharmacol 39(2) 138-140.
- Hannweg, K.; Watt, M.P.; Berjak, 1996 P. A simple method for the micropropagation of *Bowiea volubilis* from inflorescence explants. Bot. Bull. Acad. Sin. 37: 213-218
- Isobe, T.; Ohsaki, A.; Nagata, K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, Pariparoba. Yakugaku Zasshi, 122 (4) 291-294, 2002.
- Jácome L. R. P.; Oliveira, A. B.; Raslan,D.; Muller, A.; Wagner,H. 1999. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria montana* M. (bolsa de pastor). Quimica Nova, 22(2) 175-177.
- Jácome L. R. P.; Oliveira, A. B.; Raslan,D.; Muller, A.; Wagner,H. 1999. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria montana* M. (bolsa de pastor). Quimica Nova, 22(2) 175-177.
- McCartan, S.A.; Van Staden, J. 1998. Micropropagation of the medicinal plant, *Scilla natalensis* Planch. Plant Growth Regulation 25: 177-180.
- McCartan, S.A.; Van Staden, J. 1999. Micropropagation of members of the Hyacinthaceae with medicinal and ornamental potential - A review. South African Journal of Botany, 65: 361-369

- Malaurie, B. Pungu,O.; Dumont,R.; Trouslot, M,F. The creation of na *in vitro* germoplasm collection of yam (*Dioscorea* spp.) for genetic resources preservation. Euphytica, 65:113-122,1993
- Mannonem,L. Toivonen, L.; Kauppinen,V. Effects long-term preservation on growth and productivity of *Panax ginseng* and *Catharanthus roseus* cell cultures. Plant Cell Reports , 9: 173-177, 1990.
- Nader, W & Mateo,. Biodiversity-resource for new products, development and self reliance. In: Barthlott, W. & Winiger, M. Biodiversity – A challenge for development research and policy. Springer, Berlin, 1998. p121-126.
- Oliveira, C.G.T.; Miranda, F.F.; Ferreira, V.F.; Freitas,C.C.; Rabello,R. F. Carballido, J.M. Corrêa, L.C.D. 2001.Synthesis and Antimicrobiol Evaluation of 3-Hydrazino-Naphthoquinones as Analogs of Lapachol. J.Braz.Chem.Soc.12(3):339-345.
- Pereira A.M.S., Câmara F.L.A., França S.C. Vegetative propagation in *Mikania glomerata*: Micropropagation and Cuttings. Acta Horticulturae. Vol.3. (502), 357-362,1999.
- Pereira, A.M.S; Moro, J.R; Cerdeira, R.M.M; França, S.C. Micropropagation of *Maytenus aquilolia* . Journal of Herbs, Spices & Medicinal plants 2(3):11-19,1994.
- Pereira, A.M.S; Moro, J.R; Cerdeira, R.M.M; França, S.C.Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. Plant, Cell, tissue & Organ Culture. 42: 295-297,1995.
- Pereira, A.M.S.; Bertoni, B. W.; Apezato-da-Gloria, B.; Araújo, A.R.B.; Januário, A.H.; Lourenço,M.V.; França,S.C. Micropropagation of

Pothomorphe umbellata via direct organogenesis from leaf explants. Plant Cell Tissue and Organ Culture 60: 47-53, 2000.

Rout, G.R.; Das, P.; Goel, S.; Raina, S.N. Determination of genetic stability of micropropagated plant of ginger using Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Bot. Bull. Acad. Sin, 39: 23-27, 1998.

Toribio, M. Celestino, C. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. Invest. Agric. Sist. Recur. For 2000. (2):p249-260.

Verpoorte R, van der Heijden, Hoopen HH J G and Memelink J. Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production. Plant Tissue Culture and biotechnology . p.4:3-20. 1998.

Villalabos, V.M. ; Engelmann, F. Ex situ conservation of plant germplasm using biotechnology. World Journal of Microbiology & biotechnology, 11, 375-382, 1995.

Wallner, E.; Weising, K.; Rompf, R.; Kahl, G.; Kopp, B. Oligonucleotide fingerprinting and RAPD analysis of *Achillea* species: Characterization and long-term monitoring of micropropagated clone Plant Cell Report, 15: 647-652, 1996.

Watanabe, A.; Araki, S.; Kobari, H.; Sudo, H.; Tsuchida, T.; Uno, T.; Kosaka, N.; Shimomura, K.; Yamazaki, M.; Kazuki, S. *In vitro* propagation, restriction fragment length polymorphism, and random amplified polymorphic DNA analyses of *Angelica* plant. Plant Cell Reports, 18: 187-192. 1998.



Propagação Sexual, Assexual e Determinação do sistema reprodutivo.

CAPÍTULO 2 - Propagação Sexuada

Avaliação do índice de germinação de sementes de *Zeyheria montana* Mart. coletadas em três Estados brasileiros

RESUMO: *Zeyheria montana* é uma espécie arbustiva conhecida no Brasil como bolsa de pastor. Tintura das raízes tem sido popularmente utilizada para eliminar tumores e, as folhas para combater inflamações de modo geral. Neste trabalho, foram avaliados índices de germinação de sementes de *Z. montana* coletadas nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás e também a influência do período de armazenamento das sementes e incidência de luz na germinação. Foi constatado que os índices de germinação das sementes coletadas nos diferentes estados Brasileiros diferem entre si, provavelmente em decorrência da variabilidade genética existente entre os acessos estudados ou devido aos distintos graus de maturação e ou qualidade fisiológica. A incidência de luz não interferiu na germinação. A exposição das sementes à temperaturas sub-zero mostrou comportamento ortodoxo, porém elas não são longévoas.

Palavras chave: conservação, fotoblastia, propagação sexuada

CHAPTER 2 – Sexual Propagation:

Germination ratio of *Zeyheria montana* Mart. Seeds collected in three different States of Brazil

ABSTRACT: Root extracts of *Zeyheria montana* a shrub species well known in Brazil as *bolsa de pastor*, have been popularly used to eliminate tumors and leaf extracts to combat general inflammations. In this work, seeds of *Z. montana*

collected in the states of São Paulo, Minas Gerais and Goiás were evaluated for germination and influence of the period of storage and light incidence. It was verified that germination rates of the seeds collected in the different states of Brazil varied significantly, probably due to the genetic diversity existent among the studied accesses or to different stages of maturation and physiologic quality. Light didn't interfere on germination. Seeds exposed to sub-zero temperatures showed orthodox behavior, but they are not longevous.

Keywords: conservation, photoblasty, sexual propagation,

2.1.Introdução

Zeyheria montana (Figura 1) é descrita, botanicamente, como arbusto medindo de 1 a 3 m de altura, flores andróginas, folhas de disposição oposta, compostas, pecioladas, geralmente com 5 folíolos. Possui inflorescência do tipo panícula terminal e flores tubulosas, de coloração amarela. Seu fruto , considerado cápsula loculicida bivalvar, abre-se ao atingir a maturidade, espalhando grande quantidade de sementes (Figura 2) suborbiculares com 3,5 cm de diâmetro. A distribuição é restrita ao Cerrado brasileiro ocorrendo em locais cuja altitude está entre 350 a 1000 m de elevação em relação ao nível do mar (Flora NeoTropica, 1992).

No Brasil é conhecida como bolsa de pastor e as populações que habitam o Cerrado utilizam a tintura das raízes para eliminar tumores e as folhas de *Z. montana* para combater inflamações de modo geral.

Devido à coleta indiscriminada de *Z. montana* e à devastação do Cerrado, área de ocorrência natural, esta espécie está sob forte pressão antrópica e com elevado risco de extinção.

Para que o potencial de muitas espécies do Cerrado venha a ser descoberto e utilizado, justificando investimentos significativos em preservação e manejo sustentado, é fundamental que estudos de fenologia dessas

espécies sejam realizados o mais rápido possível. A revisão de literatura especializada mostra que o número de trabalhos a respeito de fisiologia da germinação de plantas endêmicas do Cerrado é extremamente reduzido frente ao manancial de no mínimo 7 mil espécies que aguardam estudos básicos de propagação.

Os objetivos deste trabalho foram verificar o índice de germinação de sementes de *Z. montana* coletadas nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás bem como a influência do período de armazenamento das sementes e incidência de luz na germinação.



Figura 1. Planta adulta de *Zeyheria montana* Mart.



1 cm

Figura 2. Semente de *Zeyheria montana* Mart.

2.2. Material e Métodos

Todas as sementes utilizadas foram submetidas a tratamento prévio de descontaminação com solução de benomil 0.5% (p/v) por 24 horas sob agitação.

Experimento 1

Sementes foram coletadas nos Estados de: São Paulo, no município de Pedregulho no dia 15 de junho de 2000 (Lat. 20° 17' 06'', Long. 47° 26' 12'', Alt.968 m); de Minas Gerais, no município de Araxá no dia 19 de junho de 2000, em três locais diferentes (**1Hp**- Lat. 19° 36' 39'', Long. 47° 11' 46'', Alt.920 m; **2Re** - Lat. 19° 36' 30'', Long. 47° 12' 46'', Alt.850 m; **3Br**- Lat. 19° 37' 32'', Long. 47° 10' 42'', Alt.820 m) e de Goiás, no município de Rio Verde no dia 20 de julho de 2000 (Lat. 18° 08' 39'', Long. 49° 57' 33'', Alt.523 m). Uma semana após a coleta, as sementes provenientes dos três diferentes Estados, apresentando expansão alada, foram colocadas para germinar em caxilhos de isopor contendo substrato solo e areia 50% e mantidas em casa de vegetação com regas diárias. Os dados de germinação foram coletados 40 dias após o plantio das sementes. O experimento foi realizado com 40 replicatas e repetido 3 vezes. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Experimento 2

Sementes com expansão alada, coletadas no município de Pedregulho no dia 25 de maio de 2001(SP), foram armazenadas em sacos de papel e mantidas em condição ambiente. Após diferentes períodos de armazenagem (30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias) as sementes foram colocadas para germinar em papel de filtro umedecido e acondicionado em saco plástico, na sala de crescimento com temperatura de 23°C (± 2) e fotoperíodo de 16 horas/luz onde permaneceram por 30 dias. O experimento foi realizado com 30 replicatas e repetido 3 vezes. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Experimento 3

Sementes com e sem expansão alada, coletadas no município de Pedregulho no dia 25 de maio de 2001, SP, foram colocadas para germinar sobre papel de filtro umedecido em água e mantidas a 25°C, no escuro, sob luz contínua ou sob fotoperíodo de 16 horas/dia. Os dados de germinação foram coletados em intervalos de 10, 20, 30 e 40 dias. O experimento foi realizado com 40 replicatas e repetido 6 vezes. Para a comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Experimento 4

Trinta dias após a coleta, sementes provenientes do Município de Pedregulho, SP, foram enviadas ao laboratório de Controle de Qualidade da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia onde foi determinado o conteúdo umidade inicial das sementes, pelo método de estufa a 105°C por 48 h, com três repetições de cinco sementes. Os resultados foram expressos em porcentagens médias, com base no peso fresco.

Testes de germinação foram conduzidos à temperatura de incubação de 25°C, substrato rolo de papel, antes e após a exposição das sementes por 24 horas às temperaturas de -20°C e -196°C (nitrogênio líquido), com quatro

repetições de 20 sementes cada. Os dados de germinação foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), $P \geq 0,5\%$.

2.3. Resultados e Discussão

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que o índice de germinação de sementes coletadas, nos diferentes Estados brasileiros, diferem entre si. Isso pode ser em decorrência da variabilidade genética existente entre os acessos estudados, ou de distintos graus de maturação ou qualidade fisiológica das sementes, características estas próprias de plantas não domesticadas. O armazenamento das sementes por 6 meses sob condições ambientais, afetou a porcentagem de germinação das sementes (Tabela 2), revelando que esse material, quando armazenado por período maior que trinta dias apresenta prejuízo para a germinação. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por Joly & Felipe (1979) que demonstraram que 50 dias após a colheita, a germinação das sementes de *Z. montana* diminuiu para 37% e após 125 dias de armazenamento as sementes não germinaram.

A incidência ou ausência de luz, assim como a condição de fotoperíodo não interferiram na germinação das sementes de *Z. montana*. Contudo, diante dos dados obtidos (Tabela 3), é possível afirmar que embora não tenha sido registrada diferença estatística entre os tratamentos, esta espécie apresenta tendência a ser fotoblástica negativa. Esses resultados estão coerentes com os relatados por Joy & Felipe (1978) em trabalho conduzido com *Z. digitalis* (sinônima de *Z. montana*).

A retirada da expansão alada foi fundamental para a germinação das sementes que foram inoculadas em papel sob condições controladas de temperatura e luminosidade. A expansão alada não interferiu na germinação das sementes que foram plantadas em substrato solo e areia. Este fato está provavelmente relacionado ao tipo de substrato utilizado. Certamente, a presença da expansão alada e a alta umidade favoreceram o aparecimento de

fungos que interferiram e prejudicaram a germinação das sementes de *Z. montana*.

Os resultados observados após a exposição das sementes às temperaturas sub-zero, indicam que essa espécie possui sementes de comportamento ortodoxo. Apesar de não ter havido diferença estatística entre as porcentagens de germinação, antes e após tratamentos, houve redução das porcentagens finais de germinação de sementes expostas às temperaturas de – 20°C e –196°C. É possível que o conteúdo de umidade das sementes (5,5%) tenha influenciado nos resultados obtidos após os tratamentos (Tabela 4).

Um dado relevante sobre as sementes de *Z. Montana*, que convém ser ressaltado nesse trabalho, é que a produção anual de sementes foi inconstante, sendo observada grande incidência de sementes no campo, no ano de 2000, o que não ocorreu em 2001. Segundo Felipe & Silva (1984) trabalhos com plantas do Cerrado são dificultados principalmente pela questão de coleta e obtenção de sementes de espécies que frutificam num determinado ano e podem passar longos períodos sem florescer e sem frutificar.

Tabela 1. Porcentagem de germinação de sementes de *Zeyheria montana* coletadas em diferentes estados Brasileiros.

Local de coleta da semente	% de germinação
Município de Araxá Hp (MG)	33,33 b
Município de Araxá Re (MG)	61,33 a
Município de Araxá Br (MG)	38,16 ab
Município de Pedregulho (SP)	49,66 ab
Município de Rio Verde (GO)	31,33 b
	Cv% 32,97

As médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (0,5%). Cv%=coeficiente de variação.

Tabela 2. Porcentagem de germinação de sementes de *Zeyheria montana* armazenadas de 30 a 180 dias sob condição ambiente (28±2).

Tempo de armazenamento (dias)	% de germinação
30	90,2 a
60	66,6 ab
90	50,0 bc
120	50,2 bc
150	33,3 c
180	30,5 c
	Cv% 34,00

As médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (0,5%). Cv% = coeficiente de variação.

Tabela 3. Porcentagem de germinação de sementes de *Zeyheria montana* sob condições controladas de temperatura e luminosidade na presença e ausência de expansão alada.

Tempo (dias)	Escuro		Fotoperíodo		Luz continua	
	Sem EA	Com EA	Sem EA	Com EA	Sem EA	Com EA
10	56,25 aA	0	56,25 aA	0	56,25 aA	0
20	68,75 aA	6,00 a	75,00 aA	0	56,25 aA	7, 21 a
30	75,00 aA	25,01 a	75,00 aA	25,00 a	56,00 aA	25, 40a
40	75,00 aA	25,55 a	81,25 aA	38,00 a	50,00 aA	25, 91a
Cv%	28,75	44,41	30,95	48,99	22,22	54,54

As médias acompanhadas das mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (0,5%). Letras minúsculas são comparação entre médias na mesma coluna e maiúsculas comparação entre linhas.

EA = expansão alada

Cv% = coeficiente de variação

Tabela 4. Conteúdo de umidade inicial e porcentagens de germinação de sementes de *Zeyheria montana* antes e após exposição a -20°C e -196°C

Conteúdo de umidade (%)	Germinação (%)		
	testemunha	-20°C	-196°C
5,5	95a	89a	88a

2.4. Conclusões

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que as sementes de *Z. montana* são ortodoxas, o que possibilita seu armazenamento sob condições especiais em baixas temperaturas e, ao mesmo tempo não são longévoas o que dificulta sua conservação sob condições ambientais assim como a produção de mudas a partir de sementes colhidas em tempo superior a trinta dias.

2.5. Referências

- Felippe, G. M.; Silva, J. C. S. 1984. Estudo de germinação em espécies do Cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, 7 (2): 157-163.
- Flora Neotropica –Monograph 25(II) 1992 .Organization for Flora Neotropica By the New York Botanical Garden 293-297.
- Hayashi, K.; Hayashi, T.; Otsuka, H.; Takeda, Y. 1997 Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39: 821-824.
- Joly, C. A.; Pelippe, G. M. 1978. Fenologia e germinação de *Rapanea guianensis* e *Zeyheria digitalis*. *Ciência e Cultura*, 30 (supl.): 418.

Joly, C. A.; Pelippe, G. M. 1979. Germinação e fenologia de *Zeyheria digitalis*.
Hoehnea, 8: 35-40.

Kutney, J. P.; Hanssen, H. W. H. 1971. 5,6,7-trimethoxyflavone and 5,6,7,8-tetramethoxyflavone from *Zeyheria tuberculosa*. Phytochemistry, 10: 3298-302.

CAPÍTULO 3 - Propagação Assexuada

Estabelecimento do Protocolo de Micropropagação de *Zeyheria montana* Mart

RESUMO: *Zeyheria montana* é uma planta medicinal endêmica do cerrado conhecida no Brasil como bolsa de pastor. O extrato aquoso de raízes é usado na medicina popular para doenças de pele e como agente antitumoral. Um protocolo de micropropagação foi desenvolvido a partir de gemas axilares advindas de plântulas germinadas *in vitro*. Neste trabalho foi constatado que as sementes de *Z. montana* apresentam elevado índice de contaminação endógena que pode ser controlada com a retirada parcial da expansão alada da semente antes do início do processo de assepsia. O meio basal WP suplementado com 0,1mg/l de TDZ produzindo 4 gemas por haste e foi considerado o meio mais adequado para a multiplicação de *Z. montana*. O enraizamento *in vitro* ocorreu em meio WP/2 suplementado com 1mg/L de ANA e também foi obtido enraizamento das plântulas sob condições *ex vitro* em casa de vegetação.

Palavras chave: bignoniaceae, cultura de tecido, planta medicinal

CHAPTER 3 – Asexual Propagation

Establishment of the micropropagation protocol of *Zeyheria montana* Mart.

ABSTRACT: *Zeyheria montana* an endemic medicinal plant of the cerrado known in Brazil as *bolsa de pastor*. *Z. montana* aqueous root extract is popularly used in the folk medicine for skin diseases and as an anti-tumor

agent. A micropropagation protocol was developed using axillary buds harvested from plantlets cultured *in vitro*. In this work was evidenced that *Z. montana* seeds present high index of endogenous contamination that may be controlled with the partial retreat of the winged expansion of the seed before starting surface sterilization. Basal WP medium supplemented with 0.1 mg/l TDZ, increased shoot proliferation, 4 buds per stem. Rooting was achieved *in vitro* using WP/2 medium supplemented with 1mg/L ANA and ex vitro inside a greenhouse.

Keywords: bignoniaceae, medicinal plant , tissue culture

3.1. Introdução

A propagação vegetativa *in vitro* denominada de micropropagação, devido ao tamanho dos propágulos, é a aplicação mais concreta e de maior impacto da cultura de tecido. Diferentes tipos de meios de cultura basais, com diversas variações nas concentrações de micro e macronutrientes, podem ser empregados para a obtenção de plântulas sob condição *in vitro*. Em geral são adicionados também ao meio de cultura fitorreguladores para suprir deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes que se encontram isolados das regiões produtoras na planta matriz; além de estimular respostas ao crescimento e alongamento das partes aéreas, de acordo com o estado fisiológico dos explantes e estado geral da planta matriz (Grattapaglia & Machado, 1998).

O crescimento e a morfogênese de tecidos cultivados *in vitro* dependem de diferentes fatores: genéticos, físicos, químicos e fisiológicos que determinam a viabilidade, ou não, da conservação do genótipo de interesse.

Uma das alternativas para amenizar o impacto da destruição da biodiversidade, principalmente das plantas medicinais, é o desenvolvimento de pesquisa na área de conservação *ex situ* onde espécies vegetais de alto valor

econômico ou cultural podem ser conservadas em coleções no campo, em câmara fria, ou *in vitro*. A conservação de germoplasma *in vitro* engloba dois tipos de coleções, de acordo com o IBPGR (Internacional Board for Plant Genetic Resources) (Fao, 1982): conservação de germoplasma a longo prazo através de criopreservação e coleção ativa *in vitro* em que o germoplasma é mantido em crescimento mínimo sob condições controladas.

A manutenção *in vitro*, de espécies medicinais, atende a duas questões importantes: a preservação de genótipos elites sob condições controladas e, ao mesmo tempo, permite a multiplicação em larga escala através da repicagem de plântulas conservadas.

A conservação de plantas medicinais do Cerrado em banco de germoplasma é fundamental como estratégia para garantir a sua sobrevivência e manter a variabilidade genética, possibilitando futuros trabalhos de prospecção gênica e de metabólitos secundários. Assim, qualquer esforço no sentido de utilizar espécies medicinais provenientes do Cerrado, passa pelo processo de estudo sobre a sua conservação e caracterização. No que se refere a ações de conservação de plantas medicinais, a adoção de técnicas biotecnológicas é quesito essencial. (Nodari & Guerra, 1999).

De acordo com Schumacher (1991), o desenvolvimento de protocolos de micropropagação são particularmente úteis em programas de conservação quando não é conhecida a forma de propagação da espécie em estudo, ou quando as sementes são recalcitrantes, possuem baixa viabilidade ou a perdem em curto período de tempo

Centenas de plantas medicinais têm sido micropropagadas com objetivo de preservação e multiplicação em grande escala: *Atropa belladonna* (Schumacher, 1991), *Catharantus roseus*, (Hirata, et al 1994), *Maytenus ilicifolia* (Pereira, et al 1995), *Dioscorea composita* (Alizedehs, 1998), *Podophyllum peltatum* (Cerdeira, et al 1998), *Mikania glomerata* (Pereira, et al 1999). Além dessas, espécies que crescem no Cerrado também têm sido micropropagadas com vistas à preservação e, entre elas, podemos citar *Gomphrena officinalis* (Mercier et al 1992), *Stryphnodendron pollyphythum* (França et al, 1995) e *Hancornia speciosa* (Pereira Neto 1996)

O objetivo do presente estudo foi desenvolver um protocolo de micropropagação de *Zeyheria montana* visando futuros trabalhos de conservação *in vitro*.

3.2. Material e Métodos

A coleta de sementes e material botânico para confecção de exsicatas foi realizada no município de Pedregulho, SP, e a exsicata foi depositada no Herbário de Plantas Medicinais da Unidade de Biotecnologia Vegetal da UNAERP com registro HPM-063.

Assepsia:

A assepsia das sementes foi realizada com diferentes agentes antimicrobianos e a expansão alada foi mantida, retirada de forma parcial, manualmente, antes da assepsia e, retirada totalmente após a mesma (tabela 1). Depois do procedimento de assepsia as sementes foram inoculadas em meios WP (Wood Plant) (Smith & McCown, 1983) basal e foram avaliadas quanto à contaminação em períodos de 30 e 60 dias.

Todos os tratamentos de assepsia foram realizados com três repetições contendo 40 replicatas cada.

A bactéria presente nas sementes, que sobreviveu ao processo de assepsia foi submetida a ensaio anti-biograma no laboratório de análises clínicas da UNAERP, com intuito de identificar a espécie e, ao mesmo tempo, encontrar um antibiótico eficiente para conter a contaminação dos explantes.

As sementes germinadas *in vitro* e que não apresentaram contaminação, forneceram segmentos nodais axênicos de 0,5 cm de altura e foram inoculados em meio de cultura WP suplementado com Bap (benzilaminopurina, sigma®), cinetina, sigma® e 2ip (isopentenilaminopurina, sigma®) nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0mg/l e, também, inoculados em meio de cultura WP suplementado com 0,1; 1,0; 3,0; e 5,0 mg/l de TDZ(thidiazuron, sigma®). Um

outro experimento foi realizado com as concentrações 1,0; 3,0 e 5,0 mg/L de TDZ associadas a 0,1 mg/l de AIA (ácido indolilacético, sigma®). As avaliações quanto ao número de brotos por explante, número de gemas por haste, altura da plântula, porcentagem de calos na base, porcentagem de vitrificação e índice de sobrevivência foram realizadas após 40 dias da inoculação do explante.

Plântulas com um par de folhas medindo 1,0 cm de comprimento foram transferidas para meio de enraizamento, ou seja, WP e WP/2 suplementados com IBA(ácido indolbutílico, sigma®) ou ANA (ácido naftalenoacético, sigma®) nas concentrações de 0,1 e 1,0 mg/l. Após 60 dias foram avaliadas as porcentagens de plantas enraizadas, o número de raízes, altura da plântula, porcentagem de calos na base e porcentagem de sobrevivência. Posteriormente, as plantas enraizadas *in vitro* foram transferidas para caixilhos de isopor com 72 compartimentos em forma de cone, com abertura superior 4 x 4 cm contendo substrato terra/areia 1:1, ou areia ou plantimax®, onde permaneceram em casa de vegetação cobertos com um frasco de 5,5 X 8,5 cm por 30 dias e a avaliação, quanto à porcentagem de sobrevivência, foi realizada após 60 dias.

Plântulas sem raiz com 2 cm de altura também foram transferidas para caixilhos de isopor sob as mesmas condições descritas acima. Após 60 dias foi realizada a porcentagem de sobrevivência das plântulas.

O delineamento experimental adotado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. Os tratamentos realizados com segmentos nodais e plântulas foram repetidos três vezes, sendo 10 explantes por repetição e, para a comparação das médias dos tratamentos, foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5%.

3.3. Resultados e Discussão

Plantas lenhosas, normalmente, apresentam maior dificuldade para o estabelecimento do protocolo de micropropagação do que as plantas herbáceas as primeiras principalmente por apresentarem crescimento lento e elevada contaminação microbiana endógena e exógena. Essas contaminações são difíceis de serem controladas, ou eliminadas sem causar danos ou morte ao tecido vegetal (Skirvin, 1981; Bonga, 1982).

Ensaio preliminares realizados *in vitro* na Unidade de Biotecnologia vegetal - UNAERP, com *Zeyheria montana*, mostraram elevados níveis de contaminação por fungo e bactéria nos explantes advindos diretamente do campo o que inviabilizou em primeira instância, o trabalho de micropropagação, por essa razão, optamos por trabalhar com plântulas germinadas sob condição *in vitro*.

Os protocolos de assepsia N° 1 e N° 2 foram ineficientes na descontaminação das sementes introduzidas *in vitro* (Tab.2). Foi observada uma contaminação generalizada por bactéria constatada, de forma mais pronunciada, após 2 meses de cultivo *in vitro*. Algumas bactérias endógenas se mantêm em estado latente dentro do explante devido, principalmente, à alta concentração de sais e sacarose nos meios de cultura. Com o desenvolvimento e nutrição dos explantes há redução natural da concentração desses elementos, o que promove em alguns casos condições nutricionais ideais para o desenvolvimento de determinados tipos de microorganismos endógenos.

Experimentos de identificação de microorganismo revelaram que a bactéria isolada dos explantes de *Z. montana* é uma *Pseudomonas* sp. O antibiograma realizado com cepas da bactéria isolada mostrou que três antibióticos foram eficientes na inibição do seu crescimento dela (Tab.3). O protocolo de assepsia N° 3 não foi eficiente para conter ou eliminar a contaminação bacteriana, apesar de se ter utilizada solução de Cloranfenicol, um dos antibiótico indicados como eficiente no ensaio antibiograma. Esse problema só foi solucionado de maneira efetiva quando a expansão alada foi

removida de forma parcial antes da assepsia, resultando em 96% de eficiência ou com a remoção total da expansão alada após o procedimento de desinfecção com 99% de explantes sem contaminação (protocolos N° 4 e N° 5).

Esse resultado mostra que a expansão alada é uma estrutura propícia para o desenvolvimento de microrganismo na espécie em estudo e que sua retirada é fundamental para o sucesso da desinfecção dos explantes de *Z. montana*.

Grandes perdas de material clonal, cultivado *in vitro* têm sido registradas, em vários laboratórios comerciais e de pesquisa, devido à contaminação de plântulas por bactérias endógenas (Cassells 1986; Boxus & Terzi 1987; Cassells 1990) e esta questão é limitante no desenvolvimento de protocolos de micropropagação.

Os experimentos realizados com BAP, cinetina e 2 ip apresentaram, em geral, um baixo índice de proliferação de brotos ($m=1,0$), altura reduzida dos mesmos (1,3 cm), alta incidência de calos na base (tabela 4) além de apresentarem elevada mortalidade de plântulas. As concentrações 3,0 ou 5,0 mg/l de 2ip apesar de não apresentarem respostas diferenciadas, quanto a análise estatística em relação aos outros tratamentos, foram consideradas as concentrações mais adequadas dentro desse grupo de experimentos por não apresentarem mortalidade dos explantes.

A utilização de 0,1 ml/L TDZ aumentou a altura das plântulas (2 cm) e promoveu em média 4,1 gemas por haste (Tab 5). Esta concentração foi a única que não apresentou vitrificação e também não provocou mortalidade nos explantes. O TDZ estimulou a produção de calos na base dos explantes em 100% das plântulas, porém isso não interferiu no desenvolvimento das mesmas. A associação de TDZ com 0,1 mg/l de AIA demonstrou não ser eficiente para melhorar o desenvolvimento das brotações *in vitro* desta espécie.

O enraizamento foi obtido em todos os meios testados, sendo que o mais eficiente foi o meio WP/2 suplementado com 1,0 mg/l de ANA onde foi constatado 70% de plântulas enraizadas (Tab 6). A presença de calos na base

das plântulas enraizadas não foi prejudicial à aclimação, isso porque as raízes se formaram a partir do caule e não dos calos.

O substrato Plantimax apresentou os melhores resultados, com 73% de sobrevivência para plântulas enraizadas *in vitro* e 53 % para plântulas que foram aclimatadas sem o sistema radicular (Tab 7). Esse resultado mostra que é possível desenvolver o sistema radicular de *Z. montana* sob condições *ex vitro* e que a opção de sistema *in vitro* ou *ex vitro* para o enraizamento vai depender da análise dos custos e produção e do, fluxo de caixa.

Com esses resultados podemos propor que, para o desenvolvimento do protocolo de micropropagação de *Z. montana* a expansão alada das sementes deve ser retirada manual e parcialmente antes do processo de assepsia e, os segmentos nodais advindos das sementes cultivadas *in vitro* devem ser inoculados em meio WP suplementado com 0,1mg/l de TDZ. O enraizamento pode ser realizado tanto *in vitro* como *ex vitro*.

Tabela 1. Tratamentos de assepsia utilizados para a descontaminação de sementes de *Z. montana*.

Tratamentos	Com expansão alada	Sem expansão alada	Benomil (0,5%) 24 horas	Hipoclorito de cálcio (0,5%)		Cloranfenicol (5%)
				30 min	50 min	
1	X		X	X		
2	X		X		x	
3		x	X	X		x
4*	X		X	x		
5**	x		x	x		

*Antes do procedimento de assepsia a expansão alada foi retirada parcialmente.

**Após o procedimento de assepsia a expansão alada foi retirada integralmente dentro do fluxo laminar.

Tabela 2. Efeito da assepsia na descontaminação de sementes de *Z. montana*.

Tratamento	% de explantes contaminados (dias)	
	(30)	(60)
1	36,33 a	90,00 a
2	36,33 a	86,66 a
(CV%)	9,87	9,24
3	-	79,00 a
4	-	4,00 b
5	-	1,00 b
(CV%)		18,28

As médias foram comparadas entre linhas e aquelas seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (0,5%).

Tabela 3. Antibiógrama realizado com *Pseudomonas* isolada de *Z. montana*.

Antibiótico	Resposta
Amicacina	Resistente
Cefotaxima	Intermediário
Ceftazidina	Sensível
Ciprofloxacina	Sensível
Cloranfenicol	Sensível
Gentamicina	Resistente
Tobramicina	Resistente

Tabela 4. Efeito do tipo e concentração de citocininas nos segmentos nodais de *Z. montana* inoculados em meio WP.

concentração mg/L	BAP			
	Nºbrotos	Altura (cm)	% calos	% mortalidade
0	1,0a	1,3ab	-	40a
0,1	1,0a	1,0b	93a	53a
0,5	1,0a	1,0b	100a	26a
1,0	1,0a	1,0b	100a	43a
3,0	1,0a	1,4a	100a	26a
5,0	1,0a	1,1ab	100a	86a
Cv%	4,66	10,60	5,23	50,36
	CINETINA			
0,1	1,0b	1,2a	86a	46a
0,5	1,0b	1,3a	80a	66a
1,0	1,0b	1,1a	86a	73a
3,0	1,4a	1,2a	100a	45a
5,0	1,3ab	1,6a	100a	60a
Cv%	12,90	17,30	18,89	47,00
	2 IP			
0,1	1,0c	1,2a	100a	15a
0,5	1,0c	1,3a	100a	52a
1,0	1,1bc	1,1a	100a	40a
3,0	1,3ab	1,3a	100a	-
5,0	1,5a	1,5a	100a	-
Cv%	10,09	15,16		62,61

Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si na coluna pelo teste de Tukey (0,5%).

Tabela 5. Efeito do TDZ e da associação TDZ e AIA nos segmentos nodais de *Z. montana* inoculados em meio WP.

Concentração mg/l	TDZ					
	Nº brotos	Nº gemas	Altura (cm)	% calos	% mortalidade	% vitriificação o
0	1,0b	1,0b	1,3ab	-	40a	-
0,1	1,3ab	4,1a	2,0a	100a	-	-
1,0	1,6a	3,8a	1,6ab	100a	71a	46a
3,0	1,3ab	3,5a	1,7ab	100a	38a	57a
5,0	1,2ab	1,7b	1,1b	100a	81a	65a
Cv%	15,88	22,69	22,65		37,49	45,05
	TDZ + 0,1 mg/l AIA					
1,0	1,0a	2,0ab	1,3a	100a	38a	38a
3,0	1,2a	2,3a	1,3a	100a	65a	38a
5,0	1,0a	1,0b	1,0a	100a	57a	-
Cv%	8,25	28,48	10,34		38,39	36,60

Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si na coluna pelo teste de Tukey (0,5%).

Tabela 6. Efeito do tipo e concentração de auxinas no enraizamento de *Z. montana*.

Concentração mg/L	% raiz	Nº raiz	Altura (cm)	% calos	% mortalidade
WP	43a	1,1a	1,5a	0	29a
WP/2	29a	1,0a	1,2a	47a	13a
Cv%	54,12	11,66	11,80		40,02
WP+0,1 ANA	44a	1,6a	1,5b	55a	31a
WP+1,0 ANA	60a	1,1a	2,2a	60a	26a
Cv%	33,10	39,01	4,93	57,32	37,70
WP+0,1 IBA	53a	1,8a	1,6a	93a	14a
WP+1,0 IBA	33a	2,6a	1,5a	86a	62a
Cv%	42,13	48,86	23,06	12,83	56,40
WP/2+0,1 ANA	29a	0,6a	1,8a	35a	35a
WP/2+1,0 ANA	70a	1,0a	1,4a	66a	0
Cv%	48,87	48,04	16,39	91,28	
WP/2+0,1 IBA	53a	1,4a	1,2a	93a	14a
WP/2+1,0 IBA	50a	1,5a	1,7a	33b	-

Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si na coluna pelo teste de Tukey (0,5%).

Tabela 7. Efeito do substrato na aclimação de *Z. montana*.

Tipo de substrato	Plântula com raiz %sobrevivência	Plântula sem raiz %sobrevivência
Terra/areia 1:1	67a	33a
Areia	40a	33a
Plantimax	73a	53a
Cv%	41,57	28,87

Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si na coluna pelo teste de Tukey (0,5%).

3.4. Conclusões

Podemos concluir que os resultados apresentados na micropropagação são satisfatórios, entretanto sugerimos que a fase de multiplicação seja otimizada para que se possa obter brotações múltiplas, o que representará uma maior eficiência no protocolo. Esse foi o primeiro estudo realizado *in vitro* com essa espécie.

3.5. Referências

- Alizedehs, A; Mantell, S.H; Viana, A.M. In vitro shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* v.53, p. 107-112, 1998.
- Bonga, J. M. Tissue culture techniques. In: Bonga, J.M.; Durzan, D. J. Tissue culture in forestry. The Hague: Nijhoff, 1982. p.4-35.

- Cassells A.C. Production of healthy plants. In: Alderson PG& Dullforce WM (eds) Micropropagation in Horticulture. University of Nottingham, Trent Print Unit, Nottingham. 1986. p.53-71
- Cassells A.C.. Problems in tissue culture: culture contamination. In: Debergh P.C. & Zimmerman R.H (Eds) Micropropagation. Kluwer Dordrecht. 1990. p. 31-44.
- Cerdeira, R.M.M.; Burandt Jr, C.L.; Bastos,J.K.; Nanayakkara,N.P.D.; McChesney,J.D.. *In vitro* of *Podophyllum peltatum*, Planta Medica,v. 64. p.42-45. 1998.
- França, S.C. Duarte, I.B.; Moraes, R.M. Pereira A.M.S.. Micropropagação de *Stryphnodendron polyphythum* (barbatimão). Plant Cell Tissue and Organ Culture v.42. p. 291-293. 1995.
- Grattapaglia, D.;Machado, M.A. Micropropagação. In Torres, A.C.; Caldas,L.S.; Buso, J.A.; Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: EMBRAPA-CNPH,1998. p. 183-260.
- Hirata, K.; Miyamoto,K.; Miura, Y. *Catharanthus roseus* L. (periwinkle): Production of vindoline and catharanthine in multiple shoot cultures In: Biotechnology in Agriculture and Forest Medicinal and Aromatic Plant VI (ed. By Y.P.S. Bajaj) Springer-Verlag Berlin Heidelberg,, 1994. v. 26. p.46-54.
- Nodari, R.O.; Guerra, M.P. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. In: Farmacognosia da planta ao medicamento: Org.Simões et al. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC. 1999. p.29-30.

- Mercier, H.; Vieira C.C..J. ; Figueiredo-Ribeiro R.C.L. Tissue culture and plant propagation of *Gomphrena officinalis* a Brazilian medicinal plant. Plant Cell Tissue and Organ Culture 28: 249-254. 1992.
- Pereira A.M.S., Câmara F.L.A., França S.C. Vegetative propagation in *Mikania glomerata*: Micropropagation and Cuttings. Acta Horticulturae WOCMAP II Proceedings 502, p.347-352. 1999.
- Pereira Neto, A.B. In vitro propagation of *Hancornia speciosa*, a tropical fruit tree. In Vitro Cell. Dev. Biol. 32: 253-256. 1996.
- Pereira, A.M.S; Moro, J.R; Cerdeira, R.M.M; França, S.C..Effect of phytohormones and physiological characteristics of the explants on micropropagation of *Maytenus ilicifolia*. Plant, Cell, tissue & Organ Culture. 42: 295-297. 1995.
- Schumacher, H.M. Biotechnology in the production and conservation of medicinal plant. In: The conservation of Medicinal plant (Eds. Akerele,O.; Heywood.H.; Synge, H.). Cambridge University Press, 1991.p.179-198.
- Skirvin, R.M. Fruit crops. In: Conger, B.V. Cloning agricultural plant via *in vitro* techniques. Boca Raton: CRC Press. 1981.p.51-139.
- Smith, M.A.L.; McCown,B.H. A comparison of source tissue for protoplast isolation from three wood plant species. Plant Science Letters, 28(2). p. 149-56. 1983.

CAPÍTULO 4 - SISTEMA REPRODUTIVO

Determinação do Sistema Reprodutivo

RESUMO: A relação Polén/Óvulo de *Zeyheria Montana*, foi determinada visando conhecer o seu sistema reprodutivo. Bolsa de pastor, como é popularmente conhecida, é uma espécie endêmica do Cerrado utilizada como agente antitumoral e antiinflamatório. Nos experimentos foram utilizados 30 botões de uma população do município de Sacramento, MG. Cada teca foi esmagada sobre lâmina de microscopia e corada com carmim propiônico. Todos os grãos de pólen foram contados com o auxílio de microscópio, utilizando aumento de 100 x. O ovário foi aberto e todos os óvulos foram contados. Foram encontrados em média $45 \pm 6,7$ óvulos e $8.560 \pm 781,0$ polens por teca. A relação P/O indicou que esta espécie é alógama facultativa. Todavia, novos estudos específicos são necessários para elucidar outros aspectos da biologia reprodutiva de *Z montana*.

Palavras chave: alogamia, , flor, pólen,

CHAPTER 4 – Productive System

Determination of the reproductive System

ABSTRACT: *Zeyheria montana* or bolsa de pastor as it is popularly called in Brazil is an endemic species from the cerrado used in folk medicine as anti-tumor and anti-inflammatory agent. Attempting to understand the reproductive system of *Z. montana* a pollen/ovule (P/O) relationship was established. Buttons (30) from a population collected in Sacramento, MG were used. Each teca was squashed on microscopy sheet and colored with carmim propionic. Every pollen grain was counted with the aid of a microscope, zoom range 100

x. The ovary was opened and the ova counted. Approximately $45 \pm 6,7$ ova were counted and the average of pollen by teca ranged $8.560 \pm 781,0$. The P/O relationship indicated that this species is alogamous. Moreover, specific studies remain necessary to elucidate other aspects of the reproductive biology of *Z. montana*.

Keywords: flower, pollen, xenogamy

4.1. Introdução

A compreensão acerca do sistema reprodutivo é de fundamental importância para se tentar entender melhor como ocorre a dinâmica dos alelos nas populações vegetais. As plantas possuem uma notável flexibilidade sexual que parece ser evolutivamente conduzida por três importantes restrições na sua história de vida: o custo energético da reprodução, a necessidade de produzir progênie geneticamente variável e a falta de mobilidade das plantas (Bock & Linhart, 1989). Basicamente, o sistema reprodutivo pode ser sexuado e assexuado (apomítico), sendo que nas plantas que se reproduzem sexualmente podemos observar a exogamia e a autogamia, e nas que se reproduzem assexualmente a reprodução vegetativa e a agamospermia (Richards 1990). É freqüente a presença numa espécie dos dois tipos de reprodução uma vez que a apomixia sozinha significa, a longo prazo, um suicídio devido à falta de variabilidade genética e ao acúmulo de mutações.

O sistema reprodutivo é influenciado pelo sistema de cruzamento que por sua vez é determinado pela morfologia floral. Pode-se encontrar na natureza espécies de plantas hermafroditas, monóicas ou dióicas. Estas estruturas florais aliadas a outras estratégias adaptativas irão dirigir o modo de reprodução da espécie, determinando, assim, diferentes estruturas genéticas populacionais.

A Morfologia floral é um fator que está intimamente ligado ao sistema reprodutivo, como por exemplo a autogamia, que ocorre somente em plantas

hermafroditas ou monóicas. Espécies dióicas e com heterostilia devem ser de fecundação cruzada e, deste modo, as áreas dos grupos de vizinhança são grandes, ocorrendo uma diferenciação menos pronunciada nas populações (Loveless & Hamrick, 1984).

Os sistemas de cruzamento determinam o padrão de transmissão genética e influem na organização da variação genética numa população. A autogamia restringe a heterozigose, reduzindo a variação dentro de populações e aumentando a variação entre populações. Em contraste, a alogamia favorece o fluxo de genes e reduz a probabilidade de diferenciação microgeográfica e subestruturamento de populações. Mesmo em populações alógamas, alguma autofecundação combinada com cruzamentos entre indivíduos aparentados e dispersão de sementes restrita pode levar ao isolamento reprodutivo e à formação de subpopulações. O estudo dos padrões de transmissão de genes, em populações naturais, é importante para se entender a evolução e a manutenção da autofecundação, da dioicia e de sistemas de cruzamento que restringem o número de reprodutores disponíveis. Há cinco tipos básicos de sistemas de cruzamento: (a) predominantemente autógama; (b) predominantemente alógama; (c) sistema misto; (d) parcialmente apomítica; e (e) autogamia parcial de gametófitos (KEARNS & INOUE, 1993).

Sistemas de cruzamento são influenciados por fatores ambientais e, por serem regulados por genes, são afetados pela seleção. Conseqüentemente, o sistema de cruzamento pode variar entre populações. Mesmo dentro de populações, pode haver diferenças entre indivíduos na taxa de fecundação cruzada. Por exemplo, as plantas que florescem na extremidade fenológica da floração podem ser predominantemente autógamas, enquanto as do pico de floração, predominantemente alógamas. As plantas no centro de populações densas podem ser predominantemente alógamas, enquanto as das margens, predominantemente, autógamas. Populações onde os polinizadores são abundantes podem apresentar padrões distintos daquelas onde os polinizadores são raros. Num mesmo indivíduo, as flores localizadas nas partes mais baixas da copa podem ter maior taxa de autofecundação do que as das partes mais altas. O modo de polinização, a complexidade arquitetônica das

flores e das plantas, bem como o tamanho e a densidade das populações interagem com o controle genético do grau de auto-incompatibilidade para determinar a taxa de fecundação cruzada. (KEARNS & INOUE, 1993; BROWN et al, 1989).

4.2. Material e Métodos

O sistema reprodutivo da *Zeyheria montana* foi determinado pela relação pólen/óvulo (P/O), segundo metodologia desenvolvida por Cruden (1977). Para essa determinação foram coletados botões florais em estágio próximo à antese, com grãos de pólen completamente formados. Foram utilizadas 30 botões de uma população do município de Sacramento.

Os botões foram coletados no mês de novembro de 2002 e permaneceram em etanol 70%, em refrigerador, até a análise. Foi utilizado microscópio estereoscópico para a determinação do número de óvulos e, a seguir, foi retirada uma teca da antera e esmagada sobre lâmina de microscopia, sendo adicionado o corante carmim propiônico e água para finalizar a montagem da lâmina. Todos os grãos de pólen de cada antera foram contados com auxílio de microscópio Marca Nikon, utilizando aumento 100x. A relação P/O foi estabelecida utilizando-se a expressão:

$$P/O = \frac{(\text{número de grãos de pólen em uma antera}) \times (\text{número de anteras por flor})}{(\text{número total de óvulos})}$$

4.3. Resultados e Discussão

Nas determinações do número de grão de pólen por antera foram observados em média $45 \pm 6,7$ óvulos e $8.560 \pm 781,0$ pólenes por teca. O número de anteras foi sempre 4 contendo cada uma 2 tecas. A determinação da P/O foi de $1.506,40 \pm 183,20$ e o log de P/O de $3,17 \pm 0,5$ (Quadro 1) portanto, essa espécie se enquadra na faixa que compreende espécies com alogamia facultativa (P/O $796,6 \pm 87,7$ a $5859,2 \pm 936,5$ e o log P/O $2,81 \pm 0,5$ a $3,65 \pm 0,6$), de acordo com os resultados de Cruden (1977).

O conhecimento do sistema reprodutivo é de extrema relevância uma vez que interfere no nível de variabilidade genética de uma espécie, e determina as interações ecológicas que favorecem a dispersão de pólen ou semente.

O fato dessa espécie ser alógama facultativa pode explicar alguns dados obtidos na análise genética por RAPD, principalmente a questão da variabilidade encontrada dentro das populações estudadas.

O resultado obtido nesse estudo contribuem significativamente na elucidação da biologia reprodutiva da espécie, entretanto trabalhos mais específicos serão necessários para elucidar outros aspectos da biologia reprodutiva de *Z. Montana*

Tabela 1. Determinação do numero de pólen e óvulo por flor de *Z. montana*.

Flor	Nº óvulos por flor	Nºpólem por flor	Nºpólem/óvulos
1	48	58.864	1.226,33
2	40	35.728	893,20
3	70	47.512	678,74
4	56	23.760	424,28
5	41	81.912	1.997,85
6	50	59.736	1.194,72
7	60	98.544	1.642,40
8	38	77.264	2.033,26

9	66	91.280	1.383,03
10	57	92.992	1.631,43
11	55	22.512	409,30
12	28	48.848	1.744,57
13	48	90.032	1.875,66
14	49	32.840	670,20
15	37	89.776	2.426,37
16	44	68.112	1.458,00
17	42	100.872	2.401,71
18	52	57.440	1.104,61
17	36	51.840	1.162,22
20	40	80.352	2.008,80
21	37	71.432	1.930,59
22	39	42.376	1.086,56
23	47	72.960	1.552,34
24	25	51.600	2.064,00
25	40	96.528	2.413,20
26	40	91.672	2.291,80
27	54	104.960	1.943,70
28	34	55.744	1.639,52
29	52	122.568	2.357,07
30	28	44.208	1.578,85
Média P/O			1.506,40

4.4. Conclusões

Com esse trabalho podemos concluir que a espécie *Zeyheria montana* é uma planta que se reproduz por alogamia facultativa, entretanto mais estudos serão necessários.

4.5.Referências

Bock, J.H.; Linhart, Y.B.. The evolutionary ecology of plant. Boulder, Westview, 1989. 600p..

Brown, A. H. D.; Burdon, J. J.; Jarosz, A. M. Isozyme analysis of plant mating systems. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. (Ed.) Isozymes in plant biology. Portland: Dioscorides Press. 1989. p. 73-86.

Cruden, R.W.. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution, 31:32-46. 1977.

Kearns, C. A.; Inouye, D. W. Techniques for pollination biologists. Colorado: University Press of Colorado. 1993. p. 217-262.

Loveless, M.D.; Hamrick, J.L.. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Am.Ver.Ecol. Syst., 15:65-95. 1984.

Richard, A.J. Plant Breeding Systems. Cambridge, University Press. 1990. 529p.



Coletas e mapeamento de recursos genético de *Zeyheria Montana* do Estado de São Paulo

CAPÍTULO 5 - Coletas e mapeamento de recursos genéticos de *Zeyheria montana* por sistema de posicionamento global (GPS).

RESUMO: A localização e o mapeamento dos recursos biológicos do estado de São Paulo de modo sistematizado, era praticamente inexistente até o ano de 1999. Atualmente, com o desenvolvimento do programa BIOTA/FAPESP vem sendo criada uma base cartográfica digital de qualidade reunindo informações obtidas por pesquisadores ligados ao programa. O objetivo deste trabalho foi explorar o potencial do geoprocessamento através da técnica de coleta utilizando o GPS para monitoramento dos recursos genéticos de *Zeyheria montana* no estado de São Paulo, visando a bioprospecção e a conservação *in vitro* dessa espécie. Foram coletados 167 indivíduos dentro do estado de São Paulo e a partir dessas coletas foram calculadas as distâncias entre os acessos dentro e entre cada população. Com este trabalho foi possível verificar que a incidência desta espécie nas áreas de conservação é reduzida e que nas outras áreas a espécie tem um comportamento ruderal, o que representa grande risco de extinção para a espécie.

Palavras chave: conservação, geoprocessamento, recursos biológicos.

CHAPTER 5 – Collection and mapping of the biological resources of the *Zeyheria montana* in the State of São Paulo

ABSTRACT: Systematic location and mapping of the biological resources of the state of São Paulo were practically nonexistent until the year of 1999. Now, with the advent of the BIOTA/FAPESP program, it is being possible to structure a digital cartographic base of quality compiling information obtained by researchers joining the program. The objective of this work was to explore the potential of the geoprocessing using the GPS technique for monitoring genetic resources of *Zeyheria montana* in the state of São Paulo, aiming the bioprospection and the conservation of this species *in vitro*. Individuals (167)

were collected in different areas in the state of São Paulo and the distance among each access inter and intra population was calculated. With this work it was possible to verify that the incidence of this species inside conservation areas is reduced and that in the other areas this species has a ruderal behavior, what indicates a great extinction risk for the species.

Key words: biological resources, conservation, geoprocessing,

5.1. Introdução

O primeiro passo a ser dado quando se planeja uma expedição de coleta é definir, para a espécie em estudo, quais as áreas a serem visitadas. Um dos maiores problemas enfrentados ao se programar expedições de coleta é a falta de dados, quase generalizada, sobre distribuição geográfica. Grande número de plantas silvestres e não domesticadas estão depositadas em herbários mas as anotações sobre a localização são quase sempre imprecisas.

A localização e o mapeamento dos recursos biológicos do Estado de São Paulo de modo sistematizado, era praticamente inexistente até o ano de 1999, a partir dessa data uma nova realidade se estabeleceu com a implantação do Projeto Biota/FAPESP. Esse programa de pesquisa em caracterização, conservação e uso sustentável da biodiversidade do Estado de São Paulo, cujo objetivo é integrar informações geradas por pesquisadores vinculados ao Biota e relacioná-las a uma base cartográfica digital de qualidade, está promovendo mecanismo de difusão de informação sobre a biodiversidade paulista. Todo trabalho apresentado nessa tese é parte de um projeto temático denominado “ Monitoramento e ampliação do banco de germoplasma de plantas medicinais do Cerrado” que está integrado ao Biota.

O processo de constrangimento (globalização), particularmente aquele que vem ocorrendo na área científica e tecnológica, em parceria com a indústria biotecnológica multinacional (farmacêutica, alimentícia, cosmética

etc.), traduz-se por uma iniciativa voraz destes setores em direção à biodiversidade localizada, principalmente nos países tropicais ao sul do equador, objetivando, por meio da pesquisa, desenvolvimento de processos ou produtos, assegurar seus direitos de propriedade intelectual sobre os conhecimentos e descobertas oriundos desses processos de obtenção e uso de novas moléculas químicas e estruturas gênicas (DNA) encontradas nos países do Sul (Recio 2000).

O advento do Sistema de Posicionamento Global (GPS) tem causado uma grande revolução na navegação e na obtenção de dados geográficos. A utilização de receptores GPS e métodos apropriados de operação, permite coletar dados geográficos (georreferenciados) em tempo real com precisão variável de 10 metros a 1 centímetro. Os dados de GPS são registrados através de coordenadas e podem ser facilmente incorporados a mapas. Esse moderno sistema de coleta de dados possui inúmeras facilidades integradas de hardware e software para registro e armazenamento de pontos, linhas e polígono associações de atributos, transferência para computador e conversão de dados (Timbo, M.A. 2000).

Estudos de coleta, localização geográfica e mapeamento de plantas medicinais são imprescindíveis para o estabelecimento de estratégias de preservação da diversidade dessas espécies.

O objetivo desse trabalho foi explorar o potencial do geoprocessamento através da técnica de coleta utilizando o GPS no levantamento dos centros de diversidade de recurso genético de *Z. montana* no Estado de São Paulo, visando à bioprospecção e à conservação *in vitro* dessa espécie.

5.2. Material e Métodos

As primeiras coletas de *Z. montana*, durante o primeiro semestre de 2001, foram realizadas dentro e fora do Estado de São Paulo como mostra a Tabela 1.

No segundo semestre de 2001 foram realizadas expedições de coleta em áreas de unidades de conservação, Parque Estadual de Vassununga (Santa Rita do Passa Quatro), Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus (Pedregulho), Estação Ecológica de Assis (Assis), Reserva Biológica de Mogi Guaçu (Mogi Guaçu).

Depois foi feito um levantamento em herbários para localização de áreas que pudessem conter exemplares de *Zeyheria montana*. A partir desse levantamento foram realizadas expedições de coleta nos municípios de Orlândia, São Joaquim da Barra, Jaborandi, Morro Agudo, Sales de Oliveira, São Carlos, Itirapina, Paraguaçu Paulista, Penápolis, Avanhandava, Nipoã, Américo de Campo, Duplo Céu, São Manoel, Franca, Cristais Paulistas, Pedregulho e Rifaina (Fig. 1e 2).

Foram coletados dentro do Estado de São Paulo 167 acessos. A partir desses dados foram calculadas as distâncias entre os acessos dentro de cada população e entre as populações (Tab. 10 a 18).

O receptor portátil de sinais de satélites usado, em todas as coletas, foi o GPS (Garmin Modelo Legendado-79728002) com unidade de recepção e antena embutida, que sintoniza vários satélites simultaneamente com capacidade de medição instantânea em coordenadas geográficas Lat./Long. e UTM .

Os dados foram processados no software Trackmaker (versão 11.4 by Odilon Ferreira Jr.). As coordenadas dos pontos onde foram realizadas as coletas, durante o segundo semestre, são mostradas nas tabelas 2-9.

5.3. Resultados e Discussão

As coletas representaram a parte mais difícil deste trabalho. A primeira dificuldade foi a demora de 5 meses para a obtenção da licença para coletar o material nas cinco unidades de conservação (Estação Ecológica de Caetetus, Parque Estadual de Vassununga, Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus, Estação Ecológica de Assis e Reserva Biológica de Mogi Guaçu).

A segunda dificuldade surgiu quando, mesmo possuindo a autorização da COTEC para realização de coletas, fomos informados pelo responsável pela Estação Ecológica de Caetetus que as plantas arroladas no projeto não existiam naquela unidade.

O terceiro problema foi constatado ao visitarmos as outras quatro unidades, pois não encontramos *Zeyheria montana* no Parque Estadual de Vassununga. Na Reserva Biológica de Mogi Guaçu encontramos apenas 12 acessos, na Estação Ecológica de Assis apenas 3 indivíduos e no Parque Estadual de Furnas do Bom Jesus encontramos uma pequena população com aproximadamente 40 acessos sendo apenas 25 passíveis de coleta pois os acessos restantes não ofereciam material suficiente para a análise química e genética devido ao reduzido número de folhas. O motivo, para essa redução no número de folhas, é porque nas áreas de ocorrência de *Zeyheria* há criação de gado e essa espécie tem boa palatabilidade para o animal que acaba se alimentando da planta além, obviamente, da *Brachiaria*, que cresce em abundância.

Ao realizarmos o trabalho de coleta de *Zeyheria montana* verificamos que a escolha da espécie para o desenvolvimento desse trabalho foi muito acertada, pois o número de indivíduos nas áreas de conservação é reduzido e, isso se deve à própria ecologia da espécie que é adaptada a áreas de Cerrado raro. Na realidade as áreas de conservação são protegidas dos desbastes, podas, ou pastagens e com isso os acessos vão desaparecendo com o aumento da densidade de muitas outras plantas. Onde há gado, como foi verificado no Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus, há desbaste e o Cerrado assume aspecto ralo, e, os animais ao se alimentarem da referida espécie comprometem a perpetuação dos indivíduos que dificilmente chegam a florescer e produzir sementes. Nas outras áreas visitadas (Fig. 1) o número de acessos encontrados também foi muito reduzido pois a espécie é ruderal, ou seja, cresce preferencialmente à margem das estradas e rodovias o que representa grande risco de extermínio para os esparsos indivíduos, devido às constantes podas realizadas por roçadeiras das empresas que fazem a manutenção dessas áreas.

Os fatos relatados acima corroboram com a justificativa exposta no presente trabalho, demonstrando a importância e a urgência de estratégias de conservação da *Zeyheria montana*.

Tabela 1. Acessos de *Zeyheria montana* coletados dentro e fora do Estado de São Paulo.

Acesso	Localização (Município)
7	Araxá- MG Lat. 19° 43'04s, Long. 46°53'54 w, alt:949m.
9	Araxá- MG Lat. 19° 43'04s, Long. 46°53'54 w, alt:949m.
11	Araxá- MG Lat. 19° 43'04s, Long. 46°53'54 w, alt:949m.
12	Araxá- MG Lat. 19° 43'04s, Long. 46°53'54 w, alt:949m.
13	Araxá- MG Lat. 19° 43'04s, Long. 46°53'54 w, alt:949m.
17	Araporã –MG Lat. 18° 31'49s, Long. 48°57'47 w, alt:788m.
18	Tupaciguara –MG Lat. 18° 32'44s, Long. 48°52'19 w, alt:785m.
19	Uberlândia–MG Lat. 19° 09'01s, Long. 48°10'00 w, alt:835m.
24	Uberaba–MG Lat. 19° 32'06s, Long. 48°02'13 w, alt:854m.
26	Araxá- MG Lat. 19° 36'39s, Long. 47°11'46 w, alt:920m.
27	Rifaina- SP Lat. 20° 10'04s, Long. 47°28'09 w, alt:968m.
28	Rifaina- SP Lat. 20° 10'04s, Long. 47°28'09 w, alt:968m.
29	Pedregulho- SP Lat. 20° 17'06s, Long. 47°26'12 w, alt:968m.
32	Estreito- SP Lat. 20° 19'10s, Long. 47°25'14 w, alt:1064m.
34	Estreito- SP Lat. 20° 19'10s, Long. 47°25'14 w, alt:1064m.
35	Diorama- GO. Lat. 16° 22'50s, Long. 51°11'27 w, alt:622m

- 36 Rio Verde- GO. Lat. 18° 08' 39s, Long. 049°, 57'33w, alt:523m.
 - 37 Rio Verde- GO. Lat. 18° 08' 39s, Long. 049°, 57'33w, alt:523m.
 - 38 Rio Verde- GO. Lat. 18° 08' 39s, Long. 049°, 57'33w, alt:523m.
 - 39 Itumbiara- GO. Lat. 18° 08' 39s, Long. 049°, 57'33w, alt:523m
-

Tabela 2. Localização geográfica da população A de *Zeyheria Montana*.

□	Ponto	Longitude	Latitude	Altitude	Localização (Município)
1.	21	47 53 13,6	20 41 00,1	766	Orlândia
2.	22	47 53 14,8	20 41 05,6	765	
3.	23	47 53 15,8	20 41 08,5	767	
4.	24	47 53 17,0	20 41 13,2	761	
5.	25	47 53 17,4	20 41 14,9	761	
6.	26	47 53 10,5	20 41 14,5	758	
7.	27	47 53 19,1	20 41 21,9	760	
8.	28	47 53 21,8	20 41 32,4	750	
9.	30	47 54 03,7	20 41 33,5	755	Orlândia
10.	31	47 54 04,3	20 41 29,2	759	
11.	32	47 54 09,5	20 41 38,6	746	
12.	33	47 54 09,9	20 41 36,8	745	
13.	34	47 54 11,0	20 41 36,2	745	
14.	35	47 54 37,5	20 41 29,0	766	
15.	36	47 54 37,0	20 41 28,1	754	
16.	37	47 54 37,6	20 41 28,3	755	
17.	38	47 55 52,1	20 34 55,7	769	São Joaquim da Barra
18.	39	47 55 56,6	20 34 53,6	787	
19.	40	48 12 52,2	20 39 29,8	544	Jaborandi
20.	41	48 16 29,2	20 36 17,9	516	
21.	42	48 16 22,7	20 36 12,7	522	
22.	43	48 02 31,5	20 43 11,5	564	Morro Agudo

23.	44	48 06 54,9	20 43 45,6	568	Morro Agudo/Orlândia
24.	45	47 44 55,8	20 47 56,9	811	Sales de Oliveira
25.	46	47 44 03,5	20 48 24,6	851	
26.	47	47 43 08,1	20 48 55,4	852	
27.	48	47 40 54,6	20 50 30,7	840	



população A

Tabela 3. Localização geográfica a população B de *Zeyheria Montana*

□	Ponto	Longitude	Latitude	Altitude	Localização (Município)
1.	1	47 54 13,4	21 53 50,1	809	São Carlos
2.	2	47 54 23,6	21 53 55,8	815	
3.	3	47 54 23,8	21 53 55,2	804	
4.	4	47 54 14,4	21 54 02,1	837	
5.	7	47 47 41,1	22 13 59,5	803	Itirapira
6.	8	47 47 40,4	22 12 59,2	804	
7.	9	47 47 37,2	22 13 56,7	795	
8.	10	47 47 37,8	22 13 53,6	787	
9.	11	47 56 17,3	22 15 30,6	775	
10.	12	47 56 19,0	22 15 30,3	781	

 população B

Tabela 4. Localização geográfica a população C de *Zeyheria Montana*.

□	Ponto	Longitude	Latitude	Altitude	Localização (Município)
1.	13	50 34 34,6	22 22 30,2	458	Paraguaçu Paulista
2.	14	50 34 36,4	22 22 35,0	478	
3.	15	50 34 36,5	22 22 35,2	481	
4.	18	50 34 36,9	22 22 36,7	485	
5.	19	50 34 30,5	22 22 37,5	487	
6.	20	50 34 32,3	22 22 35,4	486	
7.	26	50 34 34,2	22 22 32,9	481	
8.	27	50 34 33,2	22 22 43,4	481	
9.	28	50 34 24,2	22 22 42,0	508	
10.	29	50 34 24,4	22 22 41,6	498	
11.	1	50 22 00,5	22 36 07,8	590	Estação Ecológica de Assis
12.	2	50 21 51,0	22 35 58,4	543	
13.	3	50 22 00,5	22 36 07,8	590	



população C

Tabela 5. Localização geográfica da população D de *Zeyheria montana*

□	Ponto	Longitude	Latitude	Altitude	Localização (Município)
1.	30	50 02 05,5	21 25 32,5	412	Penápolis
2.	31	50 02 06,8	21 25 34,5	415	
3.	32	50 01 58,9	21 25 38,0	414	
4.	33	50 01 59,1	21 25 38,2	414	
5.	34	50 02 06,9	21 25 32,3	407	
6.	21	49 57 22,7	21 23 23,1	400	Avanhandava
7.	22	49 57 23,3	21 23 23,0	399	
8.	23	49 57 23,5	21 23 22,8	399	
9.	24	49 57 24,0	21 23 23,2	399	
10.	25	49 57 24,1	21 23 23,6	397	
11.	6	49 57 23,8	21 23 23,5	397	
12.	35	49 57 25,7	21 23 24,1	397	
13.	36	49 57 25,9	21 23 23,9	398	
14.	37	49 57 26,8	21 23 24,7	398	
15.	38	49 57 27,7	21 23 25,0	397	
16.	39	49 57 26,8	21 23 24,3	396	
17.	40	49 57 27,0	21 23 23,7	399	
18.	41	49 57 27,7	21 23 23,4	400	
19.	42	49 57 28,6	21 23 22,7	403	
20.	43	49 57 28,7	21 23 22,9	402	
21.	44	49 57 23,4	21 23 21,4	406	
22.	45	49 57 41,6	21 23 20,5	420	
23.	46	49 57 42,9	21 23 20,8	416	
24.	47	49 57 43,2	21 23 20,5	418	
25.	48	49 57 43,7	21 23 19,4	420	
26.	49	49 57 43,3	21 23 19,4	419	
27.	50	49 57 41,0	21 23 29,2	421	

28.	51	49 56 12,2	21 20 02,0	409	
29.	53	49 56 11,0	21 19 58,1	407	
30.	54	49 56 16,0	21 19 57,1	392	
31.	55	49 56 15,7	21 19 55,9	392	
32.	56	49 56 14,1	21 19 57,6	399	

 população D

Tabela 6. Localização geográfica da população E de *Zeyheria montana*

□	Ponto	Longitude	Latitude	Altitude	Localização (Município)
1.	57	49 46 18,3	20 56 00,3	440	Nipoã
2.	58	49 46 16,9	20 56 02,0	432	
3.	59	49 46 17,7	20 56 01,8	431	
4.	60	49 46 17,5	20 56 01,4	427	
5.	62	49 46 27,7	20 55 38,0	442	
6.	63	49 42 55,9	20 21 04,4	460	Américo Campo
7.	64	49 42 55,8	20 21 04,6	460	
8.	65	49 42 56,1	20 21 02,8	456	
9.	68	49 42 48,4	20 20 22,7	449	
10.	69	49 42 48,8	20 20 22,3	448	
11.	70	49 42 49,1	20 20 21,7	448	
12.	71	49 42 49,5	20 20 21,4	448	
13.	73	49 42 55,6	20 17 54,2	451	
14.	74	49 41 35,5	20 17 58,5	428	
15.	75	49 32 53,1	20 17 00,4	498	Duplo Céu
16.	76	49 32 53,3	20 16 50,1	500	

 população E

Tabela 7. Localização geográfica da população F de *Zeyheria Montana*

□	Ponto	Longitude	Latitude	Altitude	Localização (Município)
1.	10	47 10 41,3	22 15 20,0	609	Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu
2.	11	47 10 16,4	22 15 19,1	634	
3.	12	47 09 17,5	22 16 03,4	620	
4.	13	47 09 18,1	22 16 12,7	608	
5.	14	47 09 11,0	22 15 42,1	627	
6.	15	47 09 01,6	22 15 22,3	646	
7.	16	47 08 46,4	22 15 29,4	658	
8.	17	47 10 12,6	22 15 28,5	634	
9.	19	47 09 38,8	22 16 00,7	635	
10.	20	47 09 40,1	22 16 28,1	604	
11.	21	47 09 40,0	22 16 15,9	610	
12.	22	47 09 39,4	22 16 15,0	635	

 população F

Tabela 8. Localização geográfica da população G de *Zeyheria Montana*

□	Ponto	Longitude	Latitude	Altitude	Localização (Município)
1	4	48 41 58,8	22 49 45,2	722	São Manuel
2	6	48 41 08,7	22 49 05,9	737	
3	7	48 41 07,0	22 49 07,0	733	
4	8	48 37 58,9	22 45 46,3	750	

 população G

Tabela 9. Localização geográfica da população H de *Zeyheria montana*

□	Ponto	Longitude	Latitude	Altitude	Localização (Município)
1.	72	47 24 39,4	20 28 32,2	1017	Franca
2.	31	47 25 15,8	20 25 56,1	1022	
3.	32	47 24 46,8	20 24 54,9	990	Cristais Paulista
4.	33	47 25 19,9	20 24 27,6	989	
5.	34	47 25 20,9	20 24 28,8	990	
6.	35	47 25 27,7	20 24 20,8	1005	
7.	36	47 25 30,6	20 24 14,4	995	
8.	37	47 25 30,9	20 24 13,1	992	
9.	38	47 25 34,4	20 24 06,8	989	
10.	39	47 25 47,2	20 23 49,1	990	
11.	40	47 25 47,2	20 23 49,7	992	
12.	41	47 25 58,5	20 23 31,1	995	
13.	42	47 26 00,2	20 23 30,5	992	
14.	43	47 26 03,5	20 23 22,7	994	
15.	44	47 26 03,5	20 23 21,5	997	
16.	46	47 26 06,6	20 23 08,4	993	
17.	47	47 26 42,9	20 22 32,9	1009	Pedregulho
18.	48	47 26 43,5	20 22 32,2	1006	
19.	50	47 28 23,7	20 13 36,2	1013	
20.	51	47 27 55,5	20 13 12,0	1023	
21.	52	47 27 54,5	20 13 12,9	1022	
22.	53	47 27 33,0	20 13 13,8	1019	
23.	54	47 27 32,8	20 13 13,0	1016	
24.	55	47 27 00,8	20 12 52,4	1004	
25.	56	47 27 01,6	20 12 53,12	1004	
26.	57	47 27 02,4	20 11 56,7	979	

27.	58	47 27 13,8	20 11 35,4	960	
28.	59	47 27 20,7	20 11 00,6	973	
29.	60	47 27 28,7	20 10 34,6	974	
30.	61	47 27 37,8	20 10 26,4	973	
31.	62	47 27 38,0	20 10 27 ,0	978	
32.	64	47 28 10,7	20 10 01,9	968	
33.	65	47 28 29,8	20 04 40,8	955	Município de Rifaina
34.	66	47 28 25,7	20 09 26,6	949	
35.	67	47 28 23,7	20 09 21,2	951	
36.	68	47 27 45,5	20 08 24,3	877	
37.	70	47 26 08,4	20 05 17,5	610	
38.	71	47 26 12,5	20 05 18,0	604	
39.	5	47 27 43,3	20 15 25,9	1028	Bom Jesus
40.	6	47 27 45,1	20 15 36,2	1033	
41.	8	47 27 48,6	20 15 40,4	1048	
42.	9	47 27 46,7	20 15 43,9	1056	
43.	10	47 27 49,5	20 15 39,6	1042	
44.	1	47 27 26,6	20 14 03,6	948	
45.	12	47 27 17,3	20 14 04,3	959	
46.	13	47 27 14,5	20 14 04,2	965	
47.	14	47 27 13,5	20 13 59,9	962	
48.	15	47 27 24,1	20 14 06,0	987	
49.	16	47 27 28,3	20 14 15,5	976	
50.	17	47 27 28,6	20 14 15,4	975	
51.	21	47 26 20,9	20 12 43,4	978	
52.	24	47 27 19,0	20 13 29,1	988	
53.	25	47 27 18,1	20 13 28,4	1001	



população H

Tabela 10. Distância em Km entre as plantas de *Zeyheria montana* dentro da população A (27 acessos)

□	2	22	23	24	25	26	27	28	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
1	1																										
2	K	0,	0,	0,	0,	0,	0,	1,	1,	1,	2,	2,	2,	2,	2,	2,	12,	12,	34,	41,	41,	16,	24,	19,	21,	22,	32,
1	m	17	27	42	47	45	70	04	78	73	02	00	00	58	56	57	16	29	22	32	18	65	30	31	02	84	28
2			0,	0,	0,	0,	0,	0,	1,	1,	1,	1,	1,	2,	2,	2,	12,	12,	34,	41,	41,	16,	24,	19,	20,	22,	32,
2			10	24	30	31	52	86	66	61	87	86	89	49	47	50	31	42	19	31	17	57	23	24	94	78	20
2				0,	0,	0,	0,	0,	1,	1,	1,	1,	1,	2,	2,	2,	12,	12,	34,	41,	41,	16,	24,	19,	20,	22,	32,
3				16	21	26	43	77	58	54	81	79	82	46	41	47	39	51	17	33	17	51	20	18	90	75	15
2					0,	0,	0,	0,	1,	1,	1,	1,	1,	2,	2,	2,	12,	12,	34,	41,	41,	16,	24,	19,	20,	22,	32,
4					05	20	28	62	49	45	71	69	72	38	36	38	50	62	15	32	15	45	12	13	84	68	06
2						0,	0,	0,	1,	1,	1,	1,	1,	2,	2,	2,	12,	12,	34,	41,	41,	16,	24,	19,	20,	22,	32,
5						20	22	56	46	43	68	66	69	36	34	36	56	66	14	32	16	43	10	09	80	65	04
2							0,	0,	1,	1,	1,	1,	1,	2,	2,	2,	12,	12,	34,	41,	41,	16,	24,	18,	20,	22,	31,
6							34	65	65	62	86	85	88	56	54	56	61	72	34	51	35	62	30	94	68	51	91
2								0,	1,	1,	1,	1,	1,	2,	2,	2,	12,	12,	34,	41,	41,	16,	24,	19,	20,	22,	31,
7								34	34	33	55	54	57	28	26	28	75	85	11	30	17	34	01	00	71	57	90
2									1,	1,	1,	1,	1,	2,	2,	2,	13,	13,	34,	41,	41,	16,	23,	18,	20,	22,	31,
8									21	24	39	40	43	19	18	19	03	11	06	31	17	19	87	85	57	42	73

3 0										0, 13	0, 23	0, 21	0, 23	0, 99	0, 98	0, 99	12, 70	12, 79	32, 87	40, 14	40, 00	15, 00	22, 68	19, 78	21, 51	23, 38	32, 53
3 1											0, 33	0, 29	0, 29	0, 96	0, 95	0, 96	12, 56	12, 65	32, 83	40, 09	39, 95	14, 99	22, 69	19, 88	21, 60	23, 47	32, 64
3 2												0, 05	0, 09	0, 86	0, 86	0, 87	12, 83	12, 90	32, 71	40, 01	39, 88	14, 79	22, 49	19, 84	21, 55	23, 41	32, 54
3 3													0, 04	0, 84	0, 83	0, 84	12, 76	12, 85	32, 71	39, 99	39, 84	14, 80	22, 49	19, 86	21, 58	23, 44	32, 58
3 4														0, 80	0, 80	08 1	12, 71	12, 81	32, 66	39, 95	39, 81	14, 78	22, 45	19, 92	21/ 65	23, 49	32, 62
3 5															0, 03	0, 02	12, 36	12, 44	31, 89	39, 16	39, 02	14, 07	21, 74	20, 66	22, 36	24, 23	33, 32
3 6																0, 02	12, 34	12, 40	31, 86	39, 14	39, 01	14, 05	21, 73	20, 68	22, 43	24, 29	33, 33
3 7																	12, 33	12, 41	31, 90	39, 17	39, 04	14, 11	21, 78	20, 66	22, 36	24, 22	33, 35
3 8																		0,1 6	30, 72	35, 90	35, 70	19, 19	25, 24	30, 72	32, 36	34, 09	43, 98
3 9																			30, 60	35, 79	35, 58	19, 17	25, 17	30, 85	32, 46	34, 22	44, 10

[illegible]

Tabela 11. Distância em Km entre as plantas de *Zeyheria montana* dentro da população B (10 acessos).

Tabela 12. Distância em Km entre as plantas de *Zeyheria montana* dentro da população C (13 acessos).

□	13	14	15	18	19	20	26	27	28	29	1	2	3
13	Km	0,16	0,17	0,21	0,26	0,18	0,08	0,41	0,47	0,46	33,22	33,18	33,22
14			0,01	0,06	0,19	0,12	0,09	0,28	0,41	0,40	33,14	33,10	33,14
15				0,05	0,19	0,12	0,10	0,27	0,41	0,40	33,13	33,10	33,13
18					0,19	0,14	0,14	0,24	0,40	0,39	33,11	33,06	33,11
19						0,08	0,17	0,20	0,23	0,22	32,97	32,92	32,97
20							0,09	0,25	0,31	0,30	33,05	33,01	33,05
26								0,32	0,40	0,39	33,15	33,10	33,15
27									0,26	0,26	32,88	32,84	32,88
28										0,01	32,75	32,70	32,75
29											32,76	32,72	32,76
1												0,40	0
2													0,40
3													

Obs: distância entre os acessos 1 e 3 é um metro.

Tabela 13. Distância em Km entre as plantas de *Zeyheria montana* dentro da população D (32 acessos).

□	30	31	32	33	34	21	22	23	24	25	6	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	53	54	55	56
30	K m	0, 07	0, 25	0, 26	0, 04	9, 07	9, 05	9, 05	9, 04	9, 11	9, 04	8, 98	8, 98	8, 94	8, 92	8, 95	8, 96	8, 94	8,9 3	8, 92	9, 08	8, 62	8, 59	8, 58	8, 59	8, 60	8, 52	14, 42	13, 37	14, 45	14, 48	14, 48
31			0, 25	0, 25	0, 07	9, 13	9, 11	9, 12	9, 10	9, 17	9, 10	9, 04	9, 04	9, 00	8, 98	9, 01	9, 02	9, 18	8,9 9	8, 98	9, 14	8, 69	8, 65	8, 65	8, 66	8, 58	8, 49	14, 45	13, 45	14, 52	14, 55	14, 55
32				0, 01	0, 29	8, 98	8, 96	8, 96	8, 94	9, 01	8, 94	8, 89	8, 89	8, 85	8, 82	8, 86	8, 86	8, 85	8,8 3	8, 83	8, 99	8, 54	8, 51	8, 50	8, 51	8, 52	8, 43	14, 41	14, 52	14, 44	14, 48	14, 47
33					0, 29	8, 99	8, 97	8, 97	8, 95	9, 02	8, 95	8, 90	8, 89	8, 86	8, 83	8, 86	8, 87	8, 86	8,8 4	8, 84	8, 99	8, 55	8, 51	8, 51	8, 51	8, 52	8, 43	14, 42	14, 53	14, 45	14, 48	14, 48
34						9, 11	9, 09	9, 09	9, 07	9, 14	9, 07	9, 01	9, 01	8, 98	8, 95	8, 98	8, 99	8, 97	8,9 6	8, 95	9, 11	8, 66	8, 62	8, 62	8, 62	8, 63	8, 55	14, 44	14, 55	14, 47	14, 51	14, 50
21							0, 02	0, 02	0, 04	0, 05	0, 03	0, 09	0, 10	0, 13	0, 16	0, 12	0, 13	0, 14	0,1 7	0, 17	0, 06	0, 55	0, 59	0, 60	0, 62	0, 60	0, 56	6,5 4	6,6 7	6,6 5	6,6 9	6,6 6
22								0, 02	0, 02	0, 06	0, 02	0, 07	0, 08	0, 11	0, 14	0, 11	0, 11	0, 12	0,1 5	0, 16	0, 06	0, 53	0, 57	0, 58	0, 60	0, 59	0, 54	6,5 5	6,6 8	6,6 6	6,7 0	6,6 6

23									0,02	0,07	0,02	0,07	0,08	0,11	0,14	0,10	0,10	0,12	0,15	0,04	0,53	0,56	0,57	0,59	0,58	0,54	6,54	6,67	6,65	6,69	6,65	
24										0,08	0,01	0,06	0,06	0,09	0,12	0,09	0,09	0,11	0,13	0,14	0,06	0,51	0,55	0,56	0,58	0,57	0,52	6,56	6,68	6,67	6,71	6,67
25											0,08	0,13	0,14	0,17	0,19	0,17	0,17	0,19	0,22	0,09	0,60	0,63	0,64	0,66	0,65	0,60	6,54	6,67	6,66	6,69	6,66	
6												0,06	0,06	0,09	0,12	0,09	0,09	0,11	0,14	0,14	0,07	0,52	0,56	0,57	0,59	0,58	0,53	6,56	6,69	6,68	6,71	6,68
35													0,01	0,04	0,06	0,03	0,04	0,06	0,09	0,11	0,47	0,51	0,52	0,54	0,53	0,47	6,60	6,72	6,71	6,75	6,71	
36														0,04	0,06	0,03	0,04	0,06	0,09	0,11	0,46	0,50	0,51	0,53	0,52	0,46	6,59	6,72	6,70	6,74	6,71	
37															0,03	0,01	0,04	0,05	0,08	0,14	0,45	0,48	0,49	0,51	0,50	0,43	6,63	6,75	6,74	6,77	6,74	
38																0,03	0,05	0,05	0,07	0,17	0,42	0,45	0,47	0,49	0,48	0,40	6,64	6,77	6,75	6,79	6,76	
39																	0,03	0,04	0,07	0,13	0,44	0,47	0,49	0,51	0,50	0,44	6,61	6,74	6,72	6,76	6,72	
40																		0,02	0,05	0,05	0,12	0,43	0,46	0,48	0,50	0,49	0,44	6,59	6,71	6,70	6,74	6,70
41																			0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,66	6,77	6,77	6,77	6,77	

																		3	03	14	41	44	46	48	47	42	0	2	0	4	1
42																			0,	1,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	6,5	6,7	6,6	6,7	6,7
																			01	15	38	42	43	45	44	41	8	1	9	3	0
43																				0,	0,	0,	0,	0,	0,	0,	6,5	6,7	6,7	6,7	6,7
																				16	38	41	43	45	43	40	9	2	0	4	0
44																					0,	0,	0,	0,	0,	0,	6,5	6,6	6,6	6,6	6,6
																					53	56	57	59	58	56	0	2	1	5	1
45																						0,	0,	0,	0,	0,	6,6	6,7	6,7	6,7	6,7
																						04	01	05	04	27	6	8	6	9	6
46																							0,	0,	0,	0,	6,6	6,8	6,7	6,8	6,7
																							01	05	04	27	8	1	8	1	8
47																								0,	0,	0,	6,6	6,8	6,7	6,8	6,7
																								04	03	28	7	0	7	1	8
48																									0,	0,	6,6	6,7	6,7	6,7	6,7
																									01	31	5	7	5	8	5
49																										0,	6,6	6,7	6,7	6,7	6,7
																										31	4	7	4	8	5
50																											6,9	7,0	7,0	7,0	7,0
																											0	2	0	4	1
51																												0,1	0,1	0,2	0,1
																												3	9	1	5
53																													0,1	0,0	0,0

[illegible]

Tabela 14. Distância em Km entre as plantas de *Zeyheria montana* dentro da população E (16 acessos)

□	57	58	59	60	62	63	64	65	68	69	70	71	73	74	75	76
57	km	0,07	0,05	0,04	0,74	65,0 7	65,0 7	65,1 2	66,3 8	66,3 9	66,4 1	66,4 2	70,9 3	71,0 3	76,0 2	76,3 2
58			0,02	0,03	0,80	65,1 2	65,1 2	65,1 7	66,4 3	66,4 4	66,4 6	66,4 7	70,9 8	71,0 8	76,0 5	76,3 4
59				0,01	0,79	65,1 2	65,1 1	65,1 7	66,4 2	66,4 3	66,4 5	66,4 5	70,9 8	71,0 6	76,0 5	76,3 8
60					0,78	65,1 1	65,1 0	65,1 5	66,4 1	66,4 2	66,4 4	66,4 5	70,9 7	71,0 6	76,0 4	76,3 3
62						64,4 2	64,4 0	64,4 6	65,7 1	65,7 3	65,7 5	65,7 5	70,2 7	70,3 8	75,4 5	75,7 5
63							0,01	0,05	1,30	1,31	1,33	1,34	5,88	6,20	19,0 4	19,1 6
64								0,06	1,31	1,32	1,34	1,35	5,89	6,21	19,0 4	19,1 6
65									1,26	1,27	1,29	1,29	5,83	6,16	19,0 2	19,1 5
68										0,02	0,04	0,05	4,60	4,93	18,3	18,7

[illegible]

Tabela 16. Distância em Km entre as plantas de *Zeyheria montana* dentro da população G (4 acessos).

□	4	6	7	8
4	km	1,88	1,89	10,06
6			0,06	8,22
7				8,23
8				

Tabela 17. Distância em Km entre as plantas de *Zeyheria montana* dentro da população H (53 acessos).

□	72	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	46	47	48	50	51	52	53	54	55	56	57	58
72	km	4,94	6,72	7,64	7,62	7,90	8,11	8,16	8,35	8,99	8,95	9,58	9,61	9,87	9,91	10,33	11,67	1,71	28,46	29,01	28,99	28,84	28,87	29,34	29,32	31,06	31,75
31			2,07	2,74	2,70	2,96	3,17	3,22	3,42	4,04	4,01	4,65	4,68	4,94	4,97	4,39	6,77	6,80	23,52	24,08	24,05	23,90	23,93	24,43	24,40	26,14	26,83
32				1,28	1,27	1,59	1,79	1,82	2,03	2,69	2,67	3,32	3,37	3,61	3,65	4,02	5,53	5,56	21,91	22,41	22,38	22,21	22,23	22,67	22,66	24,38	25,09
33					0,05	0,31	0,52	0,55	0,77	1,44	1,41	2,07	2,11	2,38	2,41	2,80	4,29	4,32	20,84	21,37	21,34	21,19	21,22	21,70	21,67	23,41	24,11
34						0,31	0,52	0,56	0,78	1,44	1,42	2,09	2,13	2,38	2,42	2,81	4,29	4,32	20,86	21,39	21,37	21,20	21,23	21,72	21,70	23,44	24,12
35							0,21	0,25	0,48	1,15	1,12	1,78	1,82	2,08	2,10	2,51	3,99	4,02	20,57	21,12	21,09	20,94	20,98	21,45	21,44	23,18	23,87
36								0,05	0,26	0,93	0,90	1,58	1,62	1,86	1,90	2,29	3,77	3,82	20,36	20,92	20,88	20,73	20,78	21,26	21,23	22,98	23,67
37									0,22	0,88	0,87	1,53	1,57	1,82	1,86	2,26	3,74	3,76	20,33	20,87	20,83	20,69	20,72	21,22	21,19	22,93	23,62
38										0,68	0,64	1,31	1,35	1,60	1,64	2,03	3,51	3,55	20,11	20,65	20,63	20,49	20,52	21,25	20,98	22,72	23,41
39											0,	0,	0,	0,	0,	1,3	2,8	2,8	19,	20,	20,	19,	19,	20,	20,	22,	22,

										01	65	69	94	98	8	6	9	49	05	01	87	91	42	40	13	82
40											0,65	0,69	0,95	0,99	1,39	2,87	2,90	19,50	20,07	20,03	19,90	19,92	20,43	20,40	2,15	2,83
41												0,05	0,29	0,33	0,73	2,21	2,24	18,86	19,44	19,40	19,28	19,31	19,83	19,80	21,54	22,23
42													0,26	0,29	0,70	2,17	2,21	18,85	19,42	19,38	19,26	19,29	19,81	19,79	21,53	22,22
43														0,04	0,45	1,92	1,94	18,58	19,16	19,13	19,01	19,03	19,56	19,54	21,29	21,97
44															0,41	1,89	1,92	18,55	19,12	19,09	18,97	19,00	19,53	19,50	21,24	21,93
46																1,52	1,55	18,13	18,72	18,68	18,56	18,58	19,13	19,09	28,03	21,53
47																	0,03	16,85	17,48	17,45	17,36	17,38	17,96	17,94	19,68	20,35
48																		16,82	17,45	17,41	17,33	17,36	17,94	17,91	19,66	20,33
50																			1,12	1,12	1,63	1,65	2,76	2,73	3,88	4,26
51																				0,04	0,66	0,66	1,70	1,67	2,79	3,23
52																					0,6	0,6	1,6	1,6	2,8	3,2

[illegible]

[illegible]

40	23, 93	24, 76	25, 02	25, 02	25, 93	35, 84	27, 08	27, 25	28, 82	34, 39	34, 39	15, 94	15, 63	15, 54	15, 42	15, 56	18, 35	18, 28	18, 28	18, 41	18, 26	17, 99	18, 02	20, 63	19, 37	19, 41
41	23, 32	24, 15	24, 41	24, 1	25, 31	35, 22	26, 45	26, 61	28, 21	33, 82	33, 80	15, 31	15, 01	14, 90	14, 78	14, 93	17, 73	17, 67	17, 66	17, 80	17, 64	17, 37	17, 38	20, 04	18, 75	18, 77
42	23, 31	24, 12	24, 39	24, 39	25, 29	35, 21	26, 43	26, 60	28, 20	33, 80	33, 79	15, 28	14, 98	14, 88	14, 76	14, 89	17, 70	17, 65	17, 64	17, 77	17, 63	17, 34	17, 36	20, 02	18, 74	18, 76
43	23, 06	23, 87	24, 14	24, 14	25, 03	34, 95	26, 18	26, 34	27, 95	33, 55	33, 54	15, 02	14, 72	14, 62	14, 50	14, 64	17, 45	17, 40	17, 39	17, 52	17, 37	17, 08	17, 11	19, 78	18, 48	18, 51
44	23, 02	23, 84	24, 11	24, 11	25, 00	34, 92	26, 14	26, 30	27, 90	33, 53	33, 50	14, 98	14, 68	14, 58	14, 56	14, 61	17, 41	17, 36	17, 36	17, 49	17, 34	17, 06	17, 07	19, 74	18, 45	18, 47
46	22, 60	23, 44	23, 69	23, 69	24, 59	34, 50	25, 74	25, 90	27, 50	33, 12	33, 10	14, 58	14, 27	14, 17	14, 06	14, 19	17, 02	16, 96	16, 94	17, 08	16, 93	16, 65	16, 67	19, 34	18, 04	18, 05
47	21, 45	22, 26	22, 50	22, 50	23, 37	33, 29	24, 50	24, 66	26, 30	32, 03	32, 01	13, 33	13, 02	12, 91	12, 79	12, 93	15, 81	15, 76	15, 76	15, 89	15, 72	15, 43	15, 46	18, 25	16, 85	16, 87
48	21, 41	22, 23	22, 48	22, 48	23, 34	33, 28	24, 47	24, 63	26, 29	32, 01	31, 99	13, 30	12, 99	12, 87	12, 76	12, 90	15, 78	15, 74	15, 73	15, 86	15, 69	15, 41	15, 42	18, 22	16, 82	16, 84
50	5,1 6	5,8 4	6,0 1	6,0 1	6,6 4	16, 57	7,7 2	7,8 9	9,7 1	15, 91	15, 87	3,5 9	3,8 7	3,9 6	4,0 9	3,9 3	1,8 6	2,1 1	2,1 9	2,1 6	1,9 6	2,0 2	2,0 0	3,9 2	1,9 0	1,9 3
51	4,1 8	4,9 2	5,1 3	5,1 3	5,9 0	15, 83	7,0 2	7,1 7	8,9 0	15, 38	14, 96	4,1 7	4,4 7	4,6 0	4,7 2	4,5 7	1,7 9	1,9 7	2,0 2	1,9 2	1,9 0	2,1 3	2,1 1	2,8 9	1,1 7	1,2 0
52	4,2 0	4,9 5	5,1 5	5,1 5	5,9 2	15, 86	7,0 6	7,2 0	8,9 3	15, 02	14, 98	4,1 2	4,4 4	4,5 7	4,6 7	4,5 4	1,7 7	1,9 2	1,9 7	1,8 8	1,8 7	2,0 9	2,0 7	2,8 7	1,1 5	1,1 7

53	4,1 4	4,9 2	5,1 6	5,1 6	6,0 4	15, 94	7,1 9	7,3 4	8,9 6	14, 93	14, 89	4,1 0	4,4 2	4,5 5	4,6 6	4,5 2	1,5 5	1,6 3	1,6 4	1,5 3	1,6 3	1,9 1	1,9 1	2,2 9	0,6 3	0,6 3
54	4,1 1	4,9 0	5,1 3	5,1 3	6,0 1	15, 93	7,1 7	7,3 2	8,9 4	14, 91	14, 87	4,1 2	4,4 5	4,5 7	4,6 8	4,5 5	1,5 7	1,6 6	1,6 6	1,5 5	1,6 5	1,9 4	1,9 3	2,2 8	0,6 4	0,6 4
55	3,5 1	4,3 4	4,6 2	4,6 2	5,6 5	15, 42	6,8 3	6,9 7	8,3 9	14, 15	14, 12	4,9 0	5,2 1	5,3 7	5,4 6	5,3 4	2,3 2	2,2 6	2,2 5	2,1 1	2,3 7	2,6 9	2,6 8	1,1 9	1,2 5	1,2 2
56	3,5 2	4,3 6	4,6 4	4,6 4	5,6 6	15, 44	6,8 4	6,9 7	8,4 1	14, 18	14, 15	4,8 8	5,2 0	5,3 4	5,4 4	5,3 3	2,3 0	2,2 5	2,2 2	2,0 9	2,3 5	2,6 6	2,6 5	1,2 2	1,2 3	1,1 9
57	1,8 2	2,6 5	2,9 6	2,9 6	4,0 8	13, 72	5,2 4	5,3 6	6,6 9	12, 45	12, 42	6,5 8	6,9 0	7,0 3	7,1 4	7,0 2	3,9 8	3,9 6	3,9 5	3,8 1	4,0 4	4,3 6	4,3 5	1,8 7	2,8 9	2,8 6
58	1,0 9	1,9 2	2,2 2	2,2 2	3,3 3	13, 00	4,4 8	4,6 1	5,9 7	11, 82	11, 80	7,2 0	7,5 1	7,6 5	7,7 4	7,6 3	4,6 1	4,6 0	4,6 1	4,4 7	4,6 8	4,9 8	4,9 7	2,6 2	3,5 3	3,5 0
59		0,8 4	1,1 6	1,1 6	2,3 1	11, 91	3,4 7	3,5 8	4,8 8	10, 81	10, 77	8,2 4	8,5 5	8,7 0	8,7 9	8,6 7	5,6 7	5,6 8	5,6 8	5,5 3	5,7 3	6,0 3	6,0 2	3,6 2	4,5 8	4,5 7
60			0,3 5	0,3 5	1,5 8	11, 08	2,6 8	2,7 8	4,0 5	10, 07	10, 04	9,0 3	9,3 4	9,4 8	9,5 8	9,4 5	6,4 6	6,4 9	6,4 9	6,3 6	6,5 4	6,8 3	6,8 2	4,4 4	5,4 1	5,3 8
61				0 3	1,2 81	10, 81	2,3 2	2,4 3	3,7 9	9,9 2	9,8 6	9,2 5	9,5 7	9,7 0	9,8 0	9,6 8	6,7 0	6,7 5	6,7 5	6,6 3	6,7 9	7,0 7	7,0 7	4,7 7	5,6 6	5,6 4
62					1,2 3	10, 81	2,3 2	2,4 3	3,7 9	9,9 2	9,8 6	9,2 5	9,5 7	9,7 0	9,8 0	9,6 8	6,7 0	6,7 5	6,7 5	6,6 3	6,7 9	7,0 7	7,0 7	4,7 7	5,6 6	5,6 4
64						9,9 4	1,1 8	1,3 1	3,1 1	9,4 8	9,4 3	10, 05	10, 36	10, 49	10, 60	10, 46	7,5 8	7,6 4	7,6 6	7,5 4	7,6 5	7,9 4	7,9 2	5,9 2	6,5 8	6,5 5

65							8,8 4	8,6 7	7,0 4	4,2 6	4,1 5	19, 99	20, 30	20, 43	20, 54	20, 40	17, 49	17, 54	17, 55	17, 43	17, 58	17, 86	17, 85	15, 38	16, 46	16, 45
66								0,1 7	2,2 5	8,6 8	8,6 1	11, 18	11, 49	11, 60	11, 72	11, 58	8,7 4	8,8 1	8,8 3	8,7 1	8,8 2	9,0 8	9,0 8	7,0 8	7,7 4	7,7 3
67									2,0 8	8,5 0	8,4 3	11, 34	11, 65	11, 76	11, 88	11, 74	8,8 9	8,9 7	8,9 8	8,8 7	8,9 7	9,2 4	9,2 3	7,1 9	7,8 9	7,8 6
68										6,4 3	6,3 6	13, 05	13, 36	13, 49	13, 59	13, 46	10, 51	10, 55	10, 55	10, 41	10, 59	10, 88	10, 86	8,3 9	9,4 6	9,4 4
70											0,1 2	19, 01	19, 33	19, 47	19, 58	19, 45	16, 43	16, 41	16, 40	16, 26	16, 50	16, 80	16, 79	13, 78	15, 34	15, 32
71												18, 98	19, 29	19, 44	19, 54	19, 42	16, 39	16, 38	16, 37	16, 24	16, 46	16, 76	16, 75	13, 77	15, 31	15, 28
5													0,3 2	0,4 7	0,5 5	0,4 6	2,6 0	2,6 5	2,6 7	2,8 0	2,5 5	2,2 1	2,2 3	5,5 7	3,6 8	3,7 2
6														0,1 7	0,2 4	0,1 7	2,9 3	2,9 5	2,9 8	3,1 2	2,8 5	2,5 4	2,5 5	5,8 8	4,0 0	4,0 2
8															0,1 2	0,0 3	3,0 7	3,1 1	3,1 4	3,2 8	3,0 1	2,6 9	2,6 9	6,0 3	4,1 6	4,1 9
9																0,1 5	3,1 6	3,2 0	3,2 2	3,3 6	3,1 1	2,7 8	2,7 9	6,1 1	4,2 5	4,2 5
10																	3,0 5	3,0 9	3,1 2	3,2 5	2,9 9	2,6 7	2,6 8	6,0 3	4,1 4	4,1 6

[illegible]

Tabela 18. Distância média entre as diferentes populações de *Z. montana*

Pop.	A	B	C	D	E	F	G	H
A	Km	156	334	227	190	193	246	68,69
B			270	230	256	76,52	113	213
C				134	219	343	186	4,02
D					96,54	307	204	294
E						322	267	243
F							165	228
G								312
H								

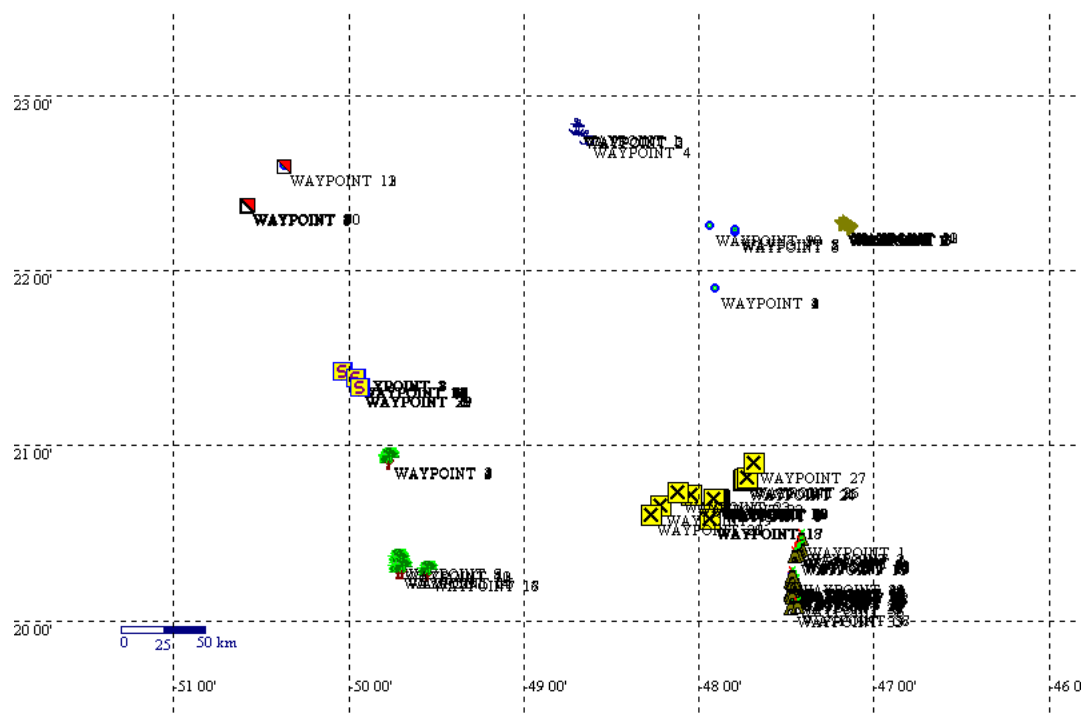


Figura 1. Localização das áreas de coleta e suas coordenadas (latitude decrescente)

Legenda

-  população A
-  população B
-  população C
-  população D
-  população E
-  população F
-  população G
-  população H



Figura 2. Localização das áreas de coleta de *Zeyheria montana* no Estado de São Paulo

5.4. Conclusões

Podemos concluir com este trabalho que a *Zeyheria Montana* é uma espécie que ocorre em cerrado aberto, com tendência a se tornar ruderal, portanto não pode ser encontrada no Bioma Cerrado como um todo e sim em áreas com vegetação rala.

5.5. Referências

Recio, R.A. Geoprocessamento aplicado ao levantamento dos recursos genéticos do estado de Minas Gerais. In: Monografia apresentada ao curso de Especialização em geoprocessamento da Universidade de Minas Gerais para a obtenção do título de especialista em geoprocessamento. 2000. p,10.

Timbó, M.A. Levantamento através do Sistema GPS. Dep. de Cartografia UFMG, Belo Horizonte: 2000. p.35.



Avaliação da Variabilidade Genética e Química de Recursos Genéticos

CAPÍTULO 6 - Avaliação da variabilidade genética por RAPD de recursos genéticos de *Zeyheria montana* localizados no Estado de São Paulo

RESUMO: Para a conservação de recursos genéticos de plantas não domesticadas, é necessário uma avaliação pormenorizada da diversidade genética da espécie para que não haja duplicação desnecessária de acessos ou exclusão de indivíduos importantes nos bancos de germoplasmas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de recursos genéticos de *Zeyheria montana*, no estado de São Paulo, utilizando marcador molecular RAPD e o sistema de Posicionamento Global (GPS) com vistas a preservar *in vitro* indivíduos que representem a diversidade genética encontrada no estado. As extrações de DNA foram feitas a partir de 100 mg de folhas, utilizando o método de extração CTAB. Nove primers foram utilizados para a realização do RAPD. A partir da matriz binária de dissimilaridade, o programa NTSYS gerou o dendograma pelo índice de Jaccard utilizando o agrupamento UPGMA. A comparação das distâncias geográficas foi realizada pelo teste de Mantel, enquanto que possíveis diferenças entre as populações locais foram checadas através da análise de variância molecular e o índice de diversidade dentro e entre as populações foi calculado pelo índice de Shannon. Verificou-se um número relativamente pequeno de indivíduos no mesmo local (máximo de 30 e mínimo de 2). Os nove primers geraram 105 bandas sendo 65 polimórficas e 40 monomórficas. Os resultados indicam uma grande variabilidade dentro das populações e não foi encontrado um padrão espacial, mostrando um modelo de ilhas isoladas, evoluindo, de forma independente no espaço genético.

Palavras chave: conservação, germoplasma

CHAPTER 6 -Evaluation through RAPD of the diversity of genetic resources of *Zeyheria montana*, in the State of São Paulo

ABSTRACT: For the conservation of genetic resources of non domesticated plants, it is necessary a detailed evaluation of the genetic diversity of the species to avoid unnecessary duplication of accesses or exclusion of important individuals in the germoplasm bank. The objective of this work was to evaluate the diversity of genetic resources of *Zeyheria montana*, in the state of São Paulo, using RAPD molecular marker and the Global Positioning System (GPS) with the objective to preserve *in vitro* individuals that represent the genetic diversity found in the State. The CTAB extraction method was adopted to extract the DNA of *Z. montana* leaves (100 mg). Nine primers were necessary to accomplish RAPD. Starting from the binary matrix of dissimilarity was created a UPGMA tree of individuals based on Jaccards similarity index. The comparison of the geographical distances was accomplished using the test of Mantel. Analysis of molecular variance was conducted to check possible differences among local populations and the diversity rate inside and among populations was estimated using the Shannon index. A relatively small number of individuals was found in the same place (maximum of 30 and minimum of 2). A total of 105 bands were generated, of which 65 were identified as polymorphic bands and 40 monomorphic bands. Results indicate a great diversity inside *Z. montana* populations and it was not defined a standard space, what indicated a model of isolated islands, evolving independently in the genetic space.

Keywords:conservation, germoplasm

6.1. Introdução

A variação genética em populações naturais é a base da resistência perante as pressões ambientais, o que também é a matéria prima da seleção natural (Brown, 1988). A variação genética, numa população, está diretamente ligada à manutenção da viabilidade evolutiva de um táxon, a longo prazo, diante de mudanças no ambiente. A curto prazo, o estudo da variação genética pode permitir o manejo e a conservação de espécies raras ou ameaçadas (Huenneke, 1991). A variação genética é um pré-requisito às futuras mudanças adaptativas ou evolucionárias.

O marcador molecular tipo RAPD é uma ferramenta útil para caracterizar germoplasma, mapear caracteres, determinar os melhores cruzamentos em diferentes plantas tropicais perenes (Virk et al, 1995; Ferreira & Grattapaglia, 1996; Williams et al 1990), investigar sistema reprodutivo em plantas (Arnholdt-Schmitt, 2000) e recentemente, também tem sido utilizado no controle de qualidade de fitoterápicos (Cheng et al, 1998). É um método confiável para se estudar a diversidade genética, uma vez que possui a vantagem de não sofrer influências ambientais, permitindo a geração de grande quantidade de informações sobre as relações filogenéticas em germoplasma. De modo prático, esse marcador pode apoiar a seleção fenotípica, principalmente para aqueles caracteres morfológicos que são altamente influenciados pelo ambiente (Stuber, 1992).

Sangwan et al (1999) utilizaram esse tipo de marcador em *Artemisia annua* e caracterizaram quimiotipos altamente produtivos em artemisinina. Também foi utilizado como ferramenta útil para analisar populações naturais de *Acanthopanax brachypus*, uma importante espécie medicinal chinesa (Yan et al, 1997).

A conservação de recursos genéticos de plantas não domesticadas, requer avaliação pormenorizada da diversidade genética para que não haja duplicação desnecessária de acessos, ou exclusão de indivíduos com alto grau de diversidade em bancos de germoplasma. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade de recursos genéticos de *Zeyheria Montana*, no Estado de

São Paulo, utilizando marcador molecular RAPD e o Sistema de Posicionamento Global (GPS) com vistas a preservar *in vitro* indivíduos que representem a diversidade genética encontrada no Estado.

6.2. Material e Métodos

Material vegetal

Foram analisadas amostras de 167 plantas de *Zeyheria montana* coletadas nas regiões do Parque Estadual das Furnas do Bom Jesus (Pedregulho), Estação Ecológica de Assis (Assis), Reserva Biológica de Mogi Guaçu (Mogi Guaçu), e nos municípios de Orlândia, São Joaquim da Barra, Jaborandi, Morro Agudo, Sales de Oliveira, São Carlos, Itirapina, Paraguaçu Paulista, Penápolis, Avanhadava, Nipoã, Américo de Campo, Duplo Céu, São Manoel, Franca, Cristais Paulistas, Pedregulho e Rifaina. Posteriormente foram conduzidos ao Departamento de Biotecnologia Vegetal da UNAERP.

Extração e purificação do DNA

Tecidos de folhas jovens foram usados para isolar o DNA pelo método do CTAB (Ferreira & Grattapaglia, 1996), 1000µL de tampão de extração (CTAB) foram adicionados sob 100 mg de folhas previamente congeladas e maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizado a 4°C e, em seguida, foi incubado em banho-maria a 65°C por 30 min. Posteriormente, a amostra foi resfriada à temperatura ambiente e, adicionou-se a ela 200µL de clorofol (cloroformio + álcool isoamílico 24:1). Após agitação, o material foi centrifugado a 12000 rpm/2min. Removeu-se então a fase aquosa, à qual foram adicionados 600µL de isopropanol, misturando-se bem. Após centrifugação a 12000 rpm /5min, recuperou-se o sedimento ao qual foi adicionado 1 mL de tampão de lavagem (etanol 70% v/v e acetato de amônio 10mM), deixando-se

à temperatura ambiente por 20 min. A centrifugação foi repetida a 12000 rpm /5min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento (DNA) foi submetido à purificação devido a presença de substâncias fenólicas.

O “pellet” foi ressuspenso em 500µL de solução 1M de NaCl, permanecendo em seguida, em banho-maria a 65°C por 5 min. Posteriormente foi incubado a 4°C por 30 min e centrifugado a 12000 rpm por 5 min. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro tubo, ao qual foram adicionados 350µL de isopropanol. Após 10 min de repouso houve precipitação e o material foi centrifugado a 12000 rpm por 5 min. Em seguida foi descartado o sobrenadante e o “pellet” lavado duas vezes em etanol 70%, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 5 min e, posteriormente, foi feita uma última lavagem em etanol absoluto. Após uma hora de secagem, à temperatura ambiente, o “pellet” foi ressuspenso em 100µL de água MilleQ. A quantidade e qualidade do DNA foi analisada por meio de eletroforese.

Amplificação do DNA

Foram usados nove primers (Tabela 1) e o ensaio RAPD foi realizado com a enzima Taq polimerase, de acordo com Williams et al (1990). Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose (1,5%) em tampão TBE, corados com brometo de etídio e, posteriormente fotografados. A partir da ausência ou presença de bandas amplificadas confeccionou-se uma matriz binária. A Figura 1 mostra a análise de produtos de PCR com o primer nº8, incluindo-se alguns dos acessos das populações estudadas.

A partir da matriz binária foi gerada uma matriz de dissimilaridade entre as plantas com o programa NTSYS-Pc (Rohf, 1990). As relações genéticas entre as plantas foram explicitadas no dendograma, obtido pelo uso do programa NTSYS-pc (Rohlf, 1990; Ferreira& Grattapaglia, 1996)

Na obtenção da medida da dissimilaridade genética foi calculado o complemento aritmético do Índice de Jaccard:

$$\text{Complemento aritmético do Índice de Jaccard} = 1 - \frac{a}{a+b+c}$$

onde “a” representa o número de concordâncias positiva do tipo 1-1, “b” é o número de discordância 1-0 e, “c” é o número de discordância do tipo 0-1. O programa GENES versão Windows (Cruz, 2000) foi utilizado nessa etapa. Em seguida, o índice de Jaccard e o método hierárquico UPGMA foram utilizados para promover o agrupamento, sendo utilizado, nesta etapa, o programa NTSYS

Foi realizada análise de variância molecular (AMOVA) na detecção, de possíveis diferenças entre as populações locais.

A matriz de distâncias genéticas, obtida pelo complemento aritmético do Índice de Jaccard, foi comparada com a matriz de distâncias geográficas (entre os locais de coleta dos acessos), utilizando o teste de Mantel (Manly, 1991).

As análises de divergência genética multivariada (escalonamento multidimensional não-métrico) e os testes de Mantel simples foram realizados utilizando-se o pacote NTSYS 1.5 (numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Sytstem) (Rohlf, 1990).

O índice de diversidade dentro das populações A, B, C, D, E, F, G e H, foi calculado pelo Índice de Shannon (Ashburner et al., 1997).

Tabela 1. Primers utilizados

Primers	Sequências
1	GAG TTC GTG ATC CTT GAT CTG
2	AGC GAC CAG GT T TAT TTC ACT
3	ATC ACC GTA CTC TCC TGC
4	ATG TTG ATT GGT TGT CTG G
5	GGA CTG GAG T
6	TCG CCC AGT G
7	GGC AGC AGG T
8	ACA ACG CCT C
9	TGC CGA GCT C

6.3. Resultados e Discussão

Um número relativamente pequeno, de indivíduos crescendo juntos, foi observado numa mesma área (máximo de 30 e mínimo de 2), o que está relacionado ao tipo de hábitat onde a planta ocorre, ou seja o Cerrado ralo e, a alteração no ambiente com substituição de áreas naturais por cultivo de cana, citrus e outras culturas ou pastagem. Tal fato representa um problema, uma vez que as amostragens visando à conservação dos recursos genéticos *ex situ* ou não, devem fundamentar-se no conceito do tamanho efetivo populacional (N_e), levando em consideração a representatividade genética das amostras (Robison, 1998).

Quando um pequeno número de indivíduos representa alguma população, o tamanho reduzido do N_e não permite reter alelos raros. Nesse caso, a reunião de diferentes populações em uma população composta é desejável em termos de tamanho efetivo pois, havendo cruzamentos entre indivíduos dessas diferentes populações, resultará em aumento da base genética final. A amostra composta terá seu tamanho efetivo maximizado

quando as amostras individuais tiverem tamanhos efetivos iguais ou, pelo menos, semelhantes (Vencovsky & Barriga, 1992).

Para a determinação da distância genética entre as populações estudadas foram usados nove “primers” que geraram 105 bandas. Destas, 65 mostraram-se polimórficas e 40 monomórficas. Este conjunto de bandas foi utilizado para gerar a matriz binária de dissimilaridade e o dendograma.

A análise do dendograma permitiu verificar que a diversidade genética de *Z. montana* está localizada dentro das populações (Fig.2). Isso foi confirmado pelo Índice de Shannon ao efetuarmos o estudo da diversidade intrapopulacional (Quadro 1).

A diversidade média dentro das populações (H_{pop}) foi de 0,122 e a diversidade calculada entre as populações estudadas (H_{tot}) foi de 0,135. Assim, a proporção da diversidade dentro das populações foi obtida pela relação H_{pop}/H_{tot} , totalizando 0,905, enquanto a diversidade entre populações [$1 - (H_{pop}/H_{tot})$] foi menor na ordem de 0,095.

Quadro 1. Diversidade genética de populações de *Z. montana* calculada pelo índice de Shannon.

Diversidade dentro de populações								
A	B	C	D	E	F	G	H	H_{pop}
0,0958	0,1326	0,149	0,131	0,134	0,121	0,104	0,108	0,122
$H_{tot}=0,135$								

¹ $-H = -\sum^K p_i \ln p_i$, onde H= diversidade de marcas RAPD na população; K= número de marcar RAPD na população; e, p_i = frequência da i-ésima marca RAPD na população. A média de H é a diversidade de marca RAPD dentro da população (H_o). H_{pop} é a média de H_o . H_{pop} é a diversidade considerando todas as marcas das populações da área em estudo.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) revelou que o valor do PHIST (análogo ao F_{st} de Wrigth) foi igual a 0,156, relativamente alto, indicando uma estrutura de população significativa, com cerca de 15% de variabilidade entre as populações. Esse valor é significativo ao nível de 0,1% ($P = 0.00099$), de acordo com o teste de aleatorização.

Desde Darwin os estudos da variabilidade genética em populações naturais são importantes para se compreender melhor os processos evolucionários. Dentro deste contexto, a presença de variabilidade genética dentro da espécie possibilita sua adaptação às mudanças ambientais, e as populações de distintos ambientes sofrem adaptações diferentes e por esta razão, espera-se que as populações de uma mesma espécie vegetal sofram um arranjo diferente nas combinações de genes adaptativos.

Uma vez que foi detectada diferenças significativas entre as populações, realizou-se uma análise de agrupamento tipo UPGMA com base nas distância entre populações calculadas na AMOVA, a fim de se avaliarem os padrões de divergência (Fig.3). Essa análise se apresentou um pouco distorcida, como é comum em estudos de populações, com uma correlação cofenética igual a 0,745 (o ideal seria acima de 0.8). Também foi realizado um escalonamento multidimensional não-métrico, a fim de melhor ser avaliada a relação entre as populações, colocando-as em um espaço 3-D que melhor representa sua posição relativa no espaço das distâncias genéticas (Fig 4). O stress (distorção) foi relativamente alto, igual a 0.23, mesmo em 3-D (o ideal seria mais próximo de zero). É possível observar as duas figuras e tentando-se encontrar uma "lógica" para as posições relativas. Não há, a princípio, padrão espacial, já que a correlação entre as distâncias genéticas e geográficas não foi significativa de acordo com o teste de Mantel ($r = -0,20345$; $P = 0.118$ com 1000 permutações)

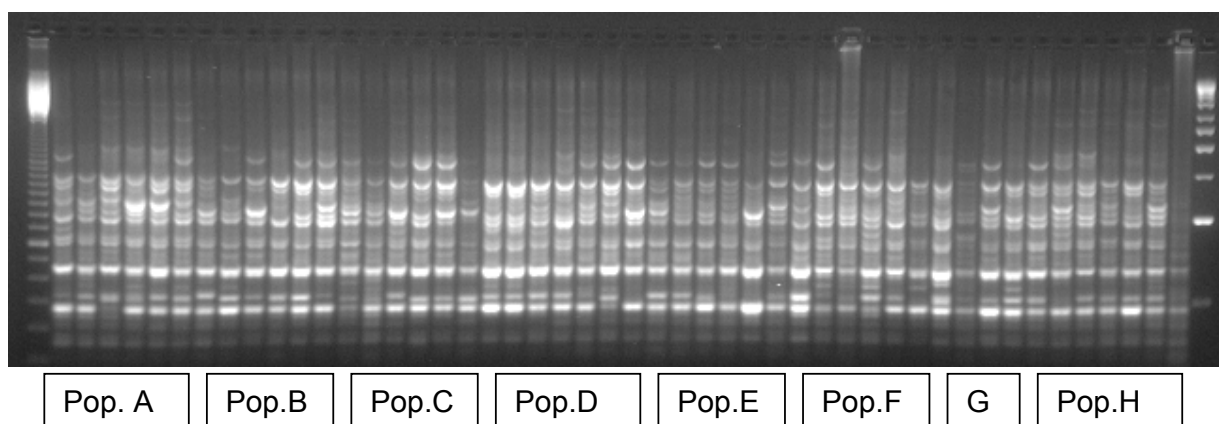


Figura 1. Análise eletroforética dos produtos de amplificação do DNA de alguns indivíduos de *Zeyheria montana* com o primer 8(ACA ACG CCT C)

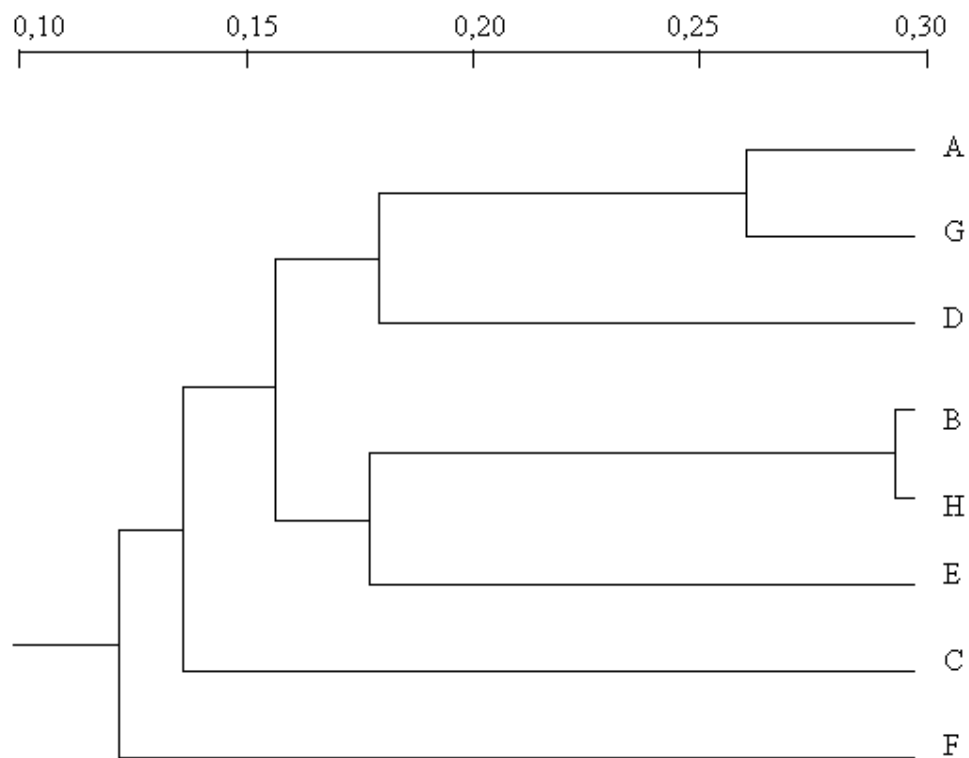


Figura 3. Dendrograma baseado nas distâncias euclidianas médias inter-populacionais, derivadas da AMOVA (Dados do RAPD).

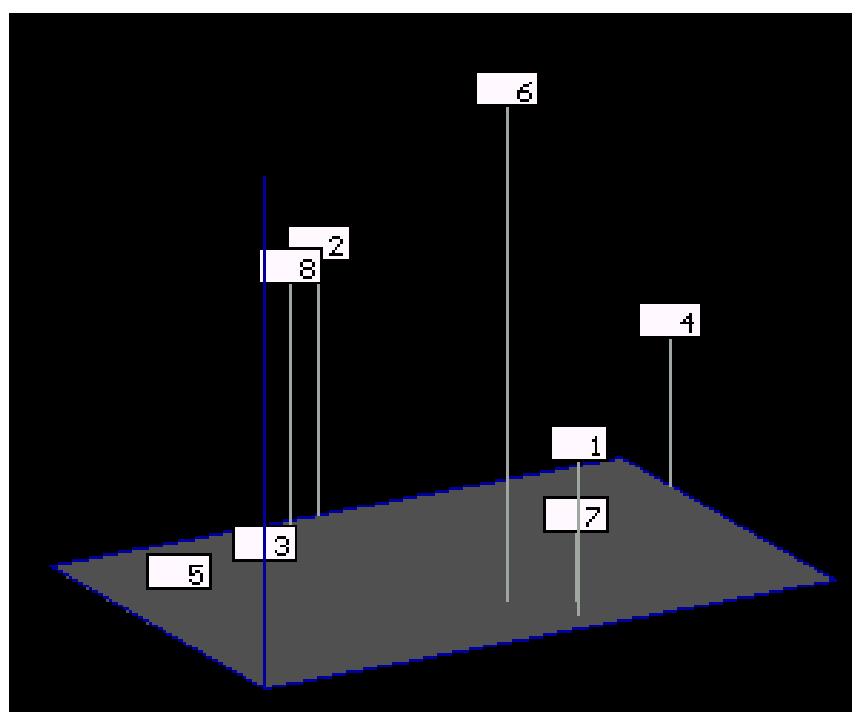


Figura 4. Escalonamento multidirecional não métrico (Dados de GPS).

6.4. Conclusões

Como há divergência, mas não há padrão, podemos concluir que os resultados suportam um modelo de ilhas, parcialmente isoladas, evoluindo, de forma independente, no espaço genético. Não há, por exemplo, um padrão de isolamento-por-distância, no qual as populações mais próximas no espaço seriam mais similares.

6.5. Referências

- Arnholdt-Schmitt, B.. RAPD analysis: a method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hypericum perforatum* L. *Theor. Appl Genet*, 100: 906-911. 2000.
- Arnold, M.L. Emms, S.K. Molecular markers, gene flow and natural selection. In: Soltis, D.; Soltis, P.; Doyle, J. (Eds.). *Molecular systematics of plants II: DNA Sequencing*. New York: Kluwer Academic, 1998. p. 442- 458.
- Ashburner, G.R. Thompson, W.K. Halloran, G.M. RAPD analysis of South Pacific coconut palm populations. *Crop Science*, 37: 992-997. 1997.
- Brown, K.S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. *Acta Amazonica*, 18(1) p.291-303. 1988.

- Cheng KT, Tsay HS, Chen CF, Chou TW. .Determination of the components in a Chinese prescription, yu-ping-feng san, by RAPD analysis. *Planta Med.* 64(6). p.563-5. 1998.
- Clegg, M.T. Molecular evaluation of plant genetic resources. In: Gustafson,P.; Appels, R.; Raven,P. (Eds.). *Gene conservation and exploitation*. New York; 1991. p. 67-86.
- Ferreira, M. E.; Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa Cenargen, Brasília, D. 1996. p39-42.
- Huenneke, L.F. Ecological implications of genetic variation in plant populations In: Falk, D.A., Holsinger, K.E. (eds.) *Genetics and conservation or rare plants*. New York: Oxford Univ. Press. 1991. p.31-44.
- Manly.B.F.J. *Randomization and Monte Carlo Methods in Biology*. Chapman & Hall, London. 1991. xii + 281p.
- Robinson, I. P.. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. (ed.). *Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins*. Viçosa. UFV. 1998. p. 329 – 380.
- Rolf,F.J. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Ver.1.6. Exeter Software, Setauket,NY. 1990.
- Sangwan R.S, Sangwan,N.S, Jain D.C. Kumar, S. Ranede, S.A. RAPD profile based genetic characterization of chemotypic variants of *Artemisia annua* L.*Biochem Mol Biol Int.* 47(6):935-44. 1999.
- Stuber, C. W. Biochemical and molecular markers in plant breeding. In: Dudley, J.W., Hallauer, A.R. and Ryder, M. (Eds.). *Plant breeding reviews*. John Wiley, New York. 1992. p.104-120.

Vencovski, R.; Barriga, P. Genética biométrica no fitomelhoramento. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1992. 496 p.

Virk,P.S.; Ford-Lloyd, B.V.; Jackson, M.T. Newbury,H.J. Use of RAPD for the estudy of diversity within plant germoplasm collections. Heredity 74, 170-179. 1995.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. Nucleic Acid Res. V.18, p6531-6535. 1990.

Yan HJ, Dai SL, Wu NH. RAPD analysis of natural populations of *Acanthopanax brachypus*. Cell Res, 7(1). p.99-106. 1997.

CAPÍTULO 7 - Monitoramento químico de recursos genéticos de *Zeyheria montana* no Cerrado do Estado de São Paulo.

RESUMO: *Zeyheria montana* é uma espécie medicinal do Cerrado, pertence à família Bignoniaceae. O objetivo deste trabalho foi fazer o monitoramento químico de partes aéreas desse vegetal, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), correlacionando a variabilidade química com a variabilidade genética. Folhas de *Z. montana* foram extraídas em clorofórmio para a análise de flavonóides e em metanol para a análise de triterpenos. Foi utilizado um cromatógrafo líquido da Shimadzu. Os resultados químicos foram submetidos à análise multivariada de componentes principais e os grupos formados foram submetidos à análise genética construindo-se um dendograma para cada grupo pelo usando índice de Jacard e agupamento UPGMA no programa NTSYS. Essa associação permitiu selecionar os indivíduos que serão conservados em banco de germoplasma e propor um modelo de conservação de *Zeyheria montana*.

Palavras chave: cromatografia líquida, flavonóides, germoplasma, recursos genéticos, triterpenos

CHAPTER 7 – Chemical moning of genetic resources of *Zeyheria montana* native to Cerrado regions in the State of São Paulo

ABSTRACT: : *Zeyheria montana* a medicinal species from the Cerrado belongs to the Bignoniaceae family. The objective of this work was to carry out a chemical monitoring of the aerial parts of the plant using high efficiency liquid chromatography (CLAE) to correlate chemical variability and genetic diversity. *Z. montana* leaves were extracted with chloroform for the analysis of flavonols and with methanol for the analysis of the triterpenes. Analysis were performed using a Shimadzu chromatograph. The chemical results were submitted to multivariate analysis of main components, groups were submitted to genetic

analysis and a UPGMA tree of individuals based on Jaccards similarity index was created. This association allowed to select the individuals that will be conserved in the germoplasm bank and to propose a model for the conservation of *Zeyheria montana*.

Keywords:flavonols, germoplasm, genetic resources, liquid chromatography, triterpenes

7.1.Introdução

Espécies da família Bignoniaceae são reputadas por seu grande valor medicinal e com comprovada ação antinociceptiva (Miranda et al., 2001), antiofídica (Otero, et al 2000), antimicrobiana (Binutu & Lajubutu, 1994), antidiabético (Hammouda & Khalafallah, 1971) e anticâncer (Ogura et al, 1977). Apesar do grande valor terapêutico atribuído às espécies dessa família, apenas alguns estudos químicos foram realizados descrevendo a presença de flavonas, naftoquinonas, triterpenos, iridóides e esteróides (Tillequin et al., 1977; Chulasiri et al., 1992; Colman de Saizarbitoria, 1997; Duarte et al., 2000; Poser et al, 2000). Isso revela o imenso potencial químico e farmacológico ainda inexplorado na quase totalidade das 800 espécies distribuídas nos 100 gêneros que a família Bignoniaceae abriga (Piazzano, 1998).

As naftoquinonas têm sido descritas como potentes substâncias anti-câncer (Claudi et al, 1969 Boido et al, 1989; Itoigawa et al, 2001) e, por serem fontes de naftoquinonas (Jácome et al., 1999), plantas de *Z. montana* têm sido coletadas de forma extrativista por indústrias e laboratórios que comercializam plantas medicinais. Popularmente são indicadas como agentes anti-tumorais e para as afecções cutâneas (Corrêa, 1931).

Estudos preliminares realizados no laboratório de fitoquímica da UNAERP, pelo Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira demonstraram a presença de três triterpenos (ácido ursólico, oleanólico, betulínico) e um flavonóide (6-Hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona) em extrato clorofórmico de folhas de *Zeyheria*

montana, esta flavona tem semelhança com a 5,6,7-trimetoxiflavona isolada em *Zeyheria tuberculosa*, apresentando uma potente atividade antiviral (Hayashi et al, 1997). Trabalhos desenvolvidos em vários países do mundo têm mostrado diversas atividades com esses triterpenos mencionados. O ácido úrsólico tem atividade antiinflamatória, anti protease HIV-1, anticâncer, anti malária (Manez et al 1997; Min et al 1999; Subbaramaiah et al 2000; Traore-Keita et al 2000;), o ácido oleanólico tem atividade antiinflamatória, anti tumoral, anti HIV –1, anticarcinoma de colon (Liu 1995; Mengoni et al 2000; Li et al 2002;) e o ácido betulínico tem atividade antimalária e contra células de carcinoma cerebral. (Steele et al, 1999; Fulda et al, 1999).

O objetivo desse trabalho foi fazer o monitoramento químico, extraíndo e quantificando os triterpenos ácido ursólico, oleanólico, betulínico e o flavonóide 6-Hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona, em partes aéreas de *Z. montana* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

7.2. Material e Métodos

Amostras de folhas retiradas de todos os 167 indivíduos de populações de *Z. montana* foram secas em estufa com ar circulante a 50°C, por 48 h, sendo moídas em moinho de facas até a pulverização total do material vegetal.

Para a extração do flavonóide foi preparado extrato clorofórmico com 5 g de folha moída e, posteriormente, foi fracionado em coluna cromatográfica utilizando-se sílica gel como fase estacionária e gradiente crescente de polaridade com hexano, AcOEt e MeOH como fase móvel. Frações foram purificadas em Sephadex LH-20, fase móvel: metanol e clorofórmio. Na purificação final utilizou-se sílica gel H sob pressão, e hexano:AcOEt (7:3) como fase móvel.

Análises por CLAE, utilizando cromatógrafo líquido (Shimadzu, modelo SPD-M10Avp) com detector de arranjo de diodo, coluna Supelcosil™ LC18:

(4,6 x 250mm, Supelco), foram realizadas para verificar o perfil químico, além de identificar e verificar a pureza das substâncias isoladas

Para a extração dos triterpenos 200 mg de folhas secas e moídas foram extraídas com 5 ml de metanol, e ultrason por 30 min e, posteriormente, o extrato foi injetado em CLAE, acoplado a um detector de arranjo de diodo. A coluna utilizada foi supelcosil™ RP-18 (250 x 4,6 mm, 5µm) com fase móvel MEOH:H₂O/CH₃COOH 0,1% (85:15) a 1 ml/min. O tempo de análise foi de 25 min e a absorbância monitorada à 210 nm. Foram utilizados os padrões de ácido betulínico (t_R = 18,6 min), ácido aleanólico (t_R = 21,3 min) e ácido ursólico (t_R = 22,1 min) com as seguintes concentrações: 1,0; 0,50; 0,25; 0,1 e 0,05 mg/ml. As análises foram realizadas em triplicatas.

Os dados químicos foram associados aos dados genéticos para a escolha dos indivíduos a serem preservados. A análise multivariada (componentes principais) foi realizada com os dados químicos, esta forneceu um gráfico onde os 167 acessos foram plotados e de modo empírico foram selecionado nove grupos. Com os dados de RAPD foi gerado um dendograma de cada população pelo programa NTSYS 1.5 utilizando o método hierárquico de Jaccard e o agrupamento UPGMA. A seleção dos indivíduos a serem conservados foi efetuada escolhendo acessos que se individualizavam no dendograma ou apenas um acesso entre os indivíduos que formaram um clóster.

7.3.Resultados e Discussão

O conhecimento do perfil de flavonóides de uma espécie é muito importante porque pode auxiliar no entendimento dos cruzamentos que ocorrem entre populações. De acordo com Lim et al. (1999) a química de flavonóides tem sido usada extensivamente para documentar hibridização em muitas espécies de plantas e reportam ainda que, em geral, o perfil de flavonóides apresentado nas plantas híbridas é um resumo do perfil químico dos parentais.

A flavona 6-hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona isolada das folhas de *Z. montana* tem semelhança estrutural com a 5,6,7-trimetoxiflavona, isolada de várias espécies inclusive de *Z. tuberculosa*, cuja atividade biológica foi confirmada como potente anti viral contra herpes tipo 1 (HSV-1) (Hayashi et al, 1997).

A análise quantitativa por CLAE da substância 6-hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona dos indivíduos revelou que há diferença significativa no teor dessa substância entre as plantas situadas numa mesma localidade (Tab. 1) e, portanto pode-se sugerir que há quimiotipos quantitativos entre os acessos analisados de *Z. montana*. Segundo D'Andrea et al. (1995), variações qualitativas e quantitativas em metabólitos secundários originam-se principalmente de variações genéticas e/ou influências ambientais e, a interação desses fatores geram diversidade biológica que podem constituir os chamados quimiotipos.

Trabalhos realizados com plantas medicinais, como por exemplo *Ocimum gratissimum*, *Chamomilla recutita* e *Gratiola officinalis*, têm mostrado que os flavonóides são substâncias que oscilam muito tanto quantitativa como qualitativamente e, portanto, vários quimiotipos têm sido registrados a partir dos estudos químicos desses fenólicos (Grayerbarkmeijer & Tomasbarberan, 1993; Repcak et al, 1999; Vieira et al., 2001).

Os resultados mostrados na Tabela 1 revelam que a altitude não pode ser considerada como um fator de influência no acúmulo de 6-hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona, uma vez que plantas localizadas na mesma altitude revelaram teores de princípio ativo muito discrepantes entre si.

O teor de 6-hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona entre plantas que crescem próximas difere significativamente entre si. Dois acessos (25 e 26) da população A coletados no município de Orlândia, com distância de 50 metros entre si, revelaram ser quimiotipos uma vez que o acesso 25 apresentou 4 vezes mais o metabólito analisado que o acesso 26, isso ocorreu com outros acessos e, entre eles, podemos citar: acessos 11 e 12 de Itirapina, amostrados na população B, também com distância de 50 m entre eles mostraram teor de 2,74 mg/gps e 1,21 mg/gps, respectivamente. Dentro da população D os

acessos 40 e 37 de Avanhavada, com distância de 40 m entre eles revelaram teor de 3.22 mg/gps e 0.16 mg/gps respectivamente; na população E os acessos 60 e 62 de Nipoã, com distância de 10 m entre eles, apresentaram teor de 4,39 e 1,02 respectivamente; além desses exemplos muitos outros foram observados entre os acessos numa mesma localidade.

Ao se analisar o perfil químico de plantas que crescem numa faixa de distância de 10 m entre si ou até mesmo de 50 m, verificou-se grandes discrepâncias no teor de 6-hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona, isso poderia ser explicado por possíveis diferenças encontradas no solo, ou seja, uma das plantas estaria crescendo em manchas de solo que poderiam conter elementos químicos (macro e micronutrientes) ou biológicos (microorganismos) diferenciados em relação ao solo da outra planta e, portanto, promover respostas quantitativas também diferentes no metabolismo secundário da espécie em estudo.

Entretanto, o mesmo raciocínio não pode ser aplicado ao exemplo dos acessos 1 e 3 de Assis, com distância de 1 metro entre si, e também apresentaram diferenças significativas nos teores da flavona analisada com 3.85 mg/gps e 1.88 mg/gps, respectivamente. Estes dados corroboram com a hipótese de a *Z. montana* ser uma espécie alógama ou de alto índice de polinização cruzada, uma vez que plântulas crescendo próximas umas das outras apresentaram teores distintos de 6-hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona.

Além disso, o resultado das amostras de solos (resultados não mostrados) revelaram que não há diferenças significativas no teor de macro e microelementos dos solos que foram retirados das plantas com alto e baixo teor de 6-hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona. Todavia, a hipótese da microbiota do solo estar influenciando de alguma maneira na produção do princípio ativo ainda deve ser investigada.

Ao analisar o teor de 6-hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona dentro de cada população (Tab. 2) foi verificado que, com exceção da população D, não houve diferença significativa, o mesmo ocorrendo entre as populações (Tabela 3).

Com a apresentação destes dados pode-se afirmar que há diversidade entre os acessos avaliados. A análise representada no dendograma (Figura 11)

diz respeito a 11 acessos que apresentaram alto teor (acima de 3.0 mg/gps) de 6-Hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona e 9 acessos com baixo teor (inferior a 0,6 mg/gps) desse composto. A análise da distância genética, entre esses acessos, mostrou uma similaridade genética máxima de 75%, média de 85% e mínima de 90% entre 20 acessos de quinze localidades diferentes. Ao se cruzarem os dados das análises químicas com as informações das análises genéticas, realizadas com marcador do tipo RAPD, foi constatado que acessos com alto e baixo teor de 6-Hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona se agruparam geneticamente e que acessos apenas com baixos teores se agruparam assim como acessos apenas com elevado teor também se agruparam. Portanto, esses resultados ainda não nos permitem afirmar se a diversidade em teor de 6-idroxi-5,7,8-trimetoxiflavona está relacionada com o efeito ambiental ou com a similaridade genética. Muitas análises ainda serão necessárias para esclarecer essa questão.

O dendograma (Fig.11) mostra que os acessos SC de São Carlos e PP20 de Paraguaçu Paulista se separam dos outros grupos e que o agrupamento entre outros grupos com pequenas distâncias genéticas revela que há uma estreita base genética entre esses acessos estudados. Saikia et al (2000) estudaram uma população de *Taxus* na região do Himalaya e também encontraram uma estreita base genética entre os acessos avaliados, com um dendograma muito semelhante ao obtido com *Zeyheria montana*.

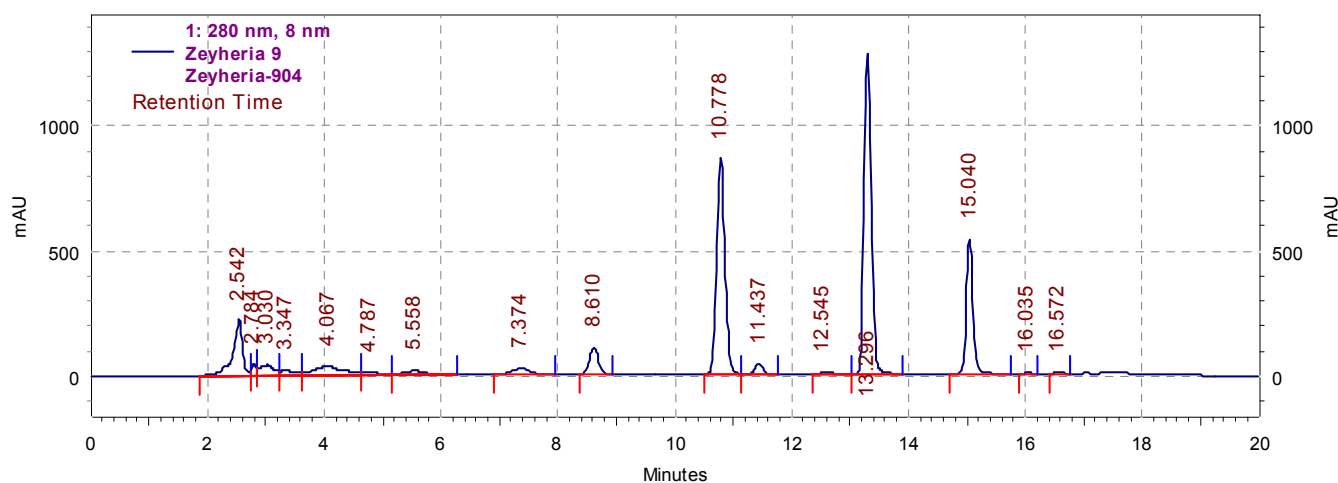
Além dos estudos realizados com o flavonóide 6-idroxi-5,7,8-trimetoxiflavona também foram avaliados três triterpenos denominados ácido oleanólico, betulínico e ursólico.

Os triterpenos constituem talvez o grupo mais importante dos terpenóides. São de especial importância o colesterol, vitaminas A, D e E, hormônios sexuais (estradiol e testosterona). Biossinteticamente estes metabolitos derivam da união *cauda-cauda* de duas unidades de farnesil pirofosfato (FPP), a qual é diferente do modo comum como cresce a maioria das cadeias isoprenóides. Neste grupo incluem-se os esteróides que possuem esqueleto C₂₇ - C₂₉, não sendo, portanto, verdadeiros triterpenos. No entanto todos derivam do mesmo precursor - o esqualeno - que possui 30 átomos de

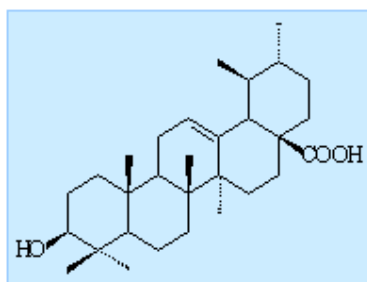
carbono, pelo que se prefere manter esta classificação. O esqualeno pode adotar várias conformações (*pseudo* cadeira ou barco) das quais resultam diferentes estruturas cíclicas e daí a diversidade de metabólitos conhecidos (Torssel,1997; Gershenzon & Kreis1999).

O perfil químico do extrato metanólico de partes aéreas de *Z. montana* realizado em CLAE (Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência) mostrou que, entre o flavonóide e os triterpenos analisados, o ácido ursólico é o metabólito secundário majoritário nessa espécie (Figura 1). De acordo com Oliveira (1999), que estudou 4 espécies do cerrado (*Aristolochia esperanzae*, *Didymopanax vinosum*, *Strychnos pseudoquina* e *Tocoyena formosa*), os triterpenos, e entre esses o ácido ursólico, são muito frequentes em espécies do Cerrado. Embora não haja estudos que correlacionem essa classe de composto com as diferentes características bióticas e abióticas do Cerrado, é possível que os triterpenos tenham um papel ecológico importante nas plantas desse habitat.

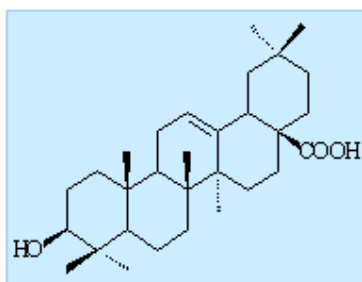
De modo geral com exceções da população D o teor de ácido betulínico não diferiu significativamente dentro das populações e, a B apresentou menor teor desse metabólito. Quanto à presença de ácido oleanólico e ursólico pode-se afirmar que, com exceções da população H, não houve diferença significativa no teor desses metabólitos dentro das populações estudadas (tab. 2). Também não foi constatada diferença significativa entre as populações quanto ao teor dos metabólitos estudados, com exceção da população G para os ácidos oleanólico e betulínico (tab.3).



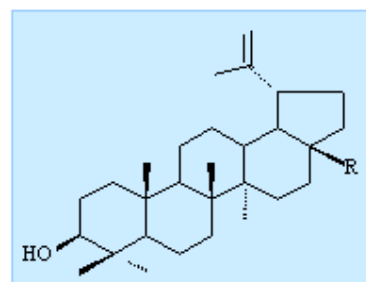
Cromatograma em HPLC de extrato metanólico de folhas de *Z. montana*



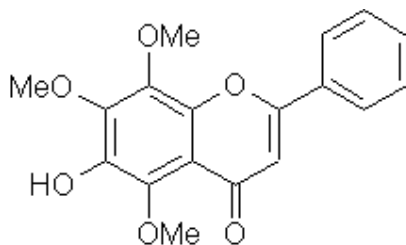
Ácido ursólico



Ácido oleanólico



R= COOH ácido betulínico



6-Hidroxi-5,7,8-trim etoxiflavona

Figura 1. Cromatograma em HPLC de extrato metanólico de folhas e estruturas do flavonóide e triterpenos isolados de *Z. montana*

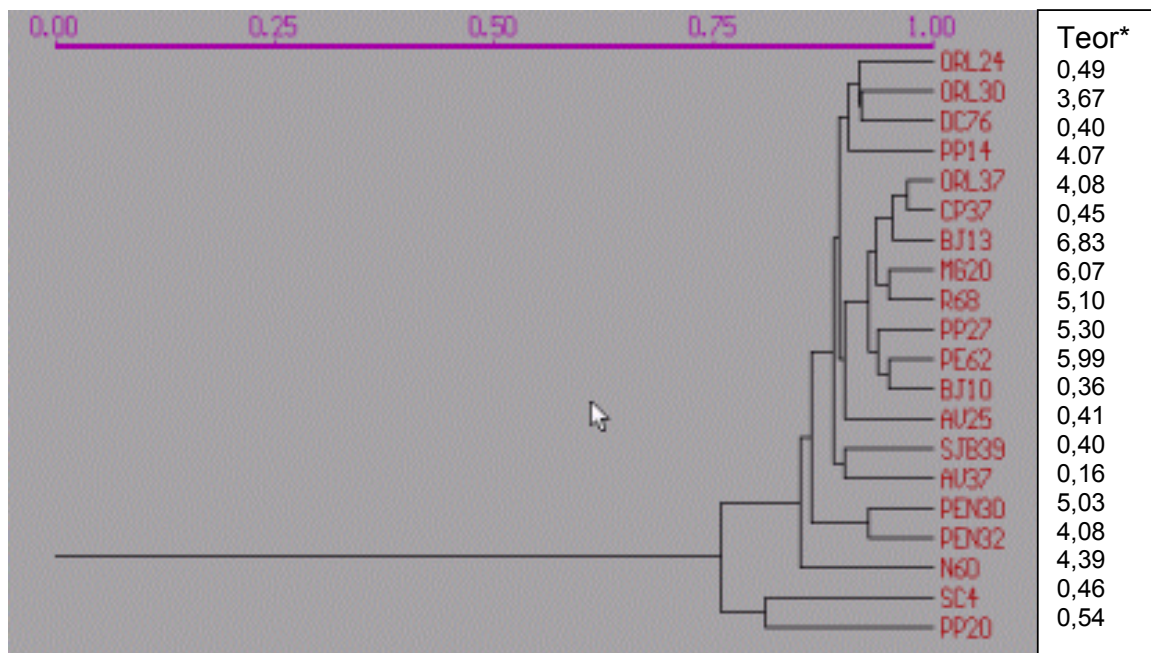


Figura 2. Dendrograma obtido com base nas distâncias genéticas entre 20 indivíduos de *Zeyheria montana* com alto e baixo teor* de 6-hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona.

Legenda
ORL=Orlandia
DC= Duplo Céu
PP=Paraguaçu Paulista
CP= Cristais Paulistas
BJ=Bom Jesus
MG= Moji Guaçu
R=Rifaina
PE=Penápolis
AV=Avanhandava
SJB=São Joaquim da Barra
N=Nipoã
SC= São Carlos

Tabela 1 . Teor de 6-hidroxi-5,7,8-Trimetoxiflavona em acessos de *Zeyheria montana* coletadas em diferentes localidades.

População	Localidade (número do acesso)	Altitude (m)	Teor TMF mg/gps
A	Orlândia (37)	755	4.08a
	Orlândia (30)	755	3.67ab
	Orlândia (33)	745	3.32bc
	Orlândia (36)	754	3.03cd
	Orlândia (25)	761	2.62de
	Orlândia (35)	766	2.13e
	Orlândia (34)	745	2.11e
	Orlândia (26)	758	1.55f
	Orlândia (32)	746	1.53f
	Orlândia (27)	760	1.29fg
	Orlândia (28)	750	1.04fgh
	Orlândia (31)	759	0.92ghi
	Orlândia (23)	767	0.81ghi
	Orlândia (22)	765	0.68hi
	Orlândia (21)	766	0.59hi
	Orlândia (24)	761	0.49i
			(cv%) 9.51
	São J. da Barra (38)	769	1.39a
	São J. da Barra (39)	787	0.40b
			(CV%) 14.98
	Jaborandi (40)	544	1.28a
	Jaborandi (42)	522	0.93ab
	Jaborandi (41)	516	0.61b
			(CV%) 15.73
	Morro Agudo (43)	564	1.11a
	Morro Agudo (44)	568	0.85a
			(CV%) 14.36
	Sales Oliveira (48)	840	3.19a
	Sales Oliveira (46)	851	2.52b
	Sales Oliveira (45)	811	2.34b
	Sales Oliveira (47)	852	1.71c
			(CV%) 7.53
B	São Carlos(2)	815	1.66a

	São Carlos (1)	809	1.36ab
	São Carlos (3)	804	0.88bc
	São Carlos (4)	837	0.46c
			(CV%) 25.50
	Itirapina (12)	781	2.74a
	Itirapina (9)	795	2.56a
	Itirapina (8)	804	2.27a
	Itirapina (7)	803	1.76ab
	Itirapina (11)	775	1.21b
	Itirapina (10)	787	1.09b
			(CV%) 19.71
C	Assis (1)	590	3.85a
	Assis (3)	590	1.88b
	Assis (2)	543	1.12c
			(CV%) 10.42
	Paraguaçu Paulista (27)	481	5.30a
	Paraguaçu Paulista (14)	478	4.07b
	Paraguaçu Paulista (18)	485	2.99c
	Paraguaçu Paulista (19)	487	2.85c
	Paraguaçu Paulista (26)	481	1.81d
	Paraguaçu Paulista (13)	458	1.68d
	Paraguaçu Paulista (28)	508	1.01e
	Paraguaçu Paulista (29)	498	0.97e
	Paraguaçu Paulista (15)	481	0.61e
	Paraguaçu Paulista (20)	486	0.54e
			(CV%) 8.91
D	Penápolis (30)	412	5.03a
	Penápolis (32)	414	4.08ab
	Penápolis (33)	414	3.42b
	Penápolis (34)	407	3.16b
	Penápolis (31)	415	0.93c
			(CV%) 13.75
	Avanhandava (51)	409	3.75a
	Avanhandava (40)	399	3.02ab
	Avanhandava (38)	397	2.60bc
	Avanhandava (46)	416	2.45bc
	Avanhandava (53)	407	2.37bc
	Avanhandava (41)	400	2.32bcd
	Avanhandava (54)	392	2.23cde
	Avanhandava (21)	400	2.22cde
	Avanhandava (35)	397	2.18cde

	Avanhandava (42)	403	1.89cdef
	Avanhandava (43)	402	1.89cdef
	Avanhandava (36)	398	1.78cdefg
	Avanhandava (23)	399	1.77cdefg
	Avanhandava (22)	399	1.45defgh
	Avanhandava (48)	420	1.36efghi
	Avanhandava (47)	418	1.33efghi
	Avanhandava (44)	406	1.25fghij
	Avanhandava (56)	399	1.22fghij
	Avanhandava (49)	419	1.14fghij
	Avanhandava (39)	396	1.05fghijk
	Avanhandava (6)	397	0.94ghijk
	Avanhandava (50)	421	0.94ghijk
	Avanhandava (55)	392	0.78hijk
	Avanhandava (45)	420	0.78hijk
	Avanhandava (24)	399	0.53ijk
	Avanhandava (25)	397	0.41jk
	Avanhandava (37)	398	0.16k
			(CV%) 17.37
E	Nipoã (60)	427	4.39a
	Nipoã (57)	440	3.62a
	Nipoã (58)	432	1.45b
	Nipoã (59)	431	1.02b
	Nipoã (62)	442	0.69b
			(CV%) 19.31
	Américo de Campo (70)	448	2.93a
	Américo de Campo (68)	449	2.69ab
	Américo de Campo (69)	448	2.63abc
	Américo de Campo (71)	448	2.42abc
	Américo de Campo (63)	460	1.80bcd
	Américo de Campo (64)	460	1.61cd
	Américo de Campo (74)	428	1.28d
	Américo de Campo (65)	456	1.07
	Américo de Campo (73)	451	
			(CV%) 18.89
	Duplo Céu (75)	498	2.11a
	Duplo Céu (76)	500	0.40b
			(CV%) 5.56
F	Mogi Guaçu (11)	634	6.49a
	Mogi Guaçu (20)	604	6.07a
	Mogi Guaçu (13)	608	6.00a
	Mogi Guaçu (17)	634	3.45b

	Mogi Guaçu (21)	610	2.84b
	Mogi Guaçu (15)	646	2.54b
	Mogi Guaçu (10)	609	2.50b
	Mogi Guaçu (16)	658	1.23c
	Mogi Guaçu (22)	635	1.20c
	Mogi Guaçu (12)	620	1.16c
	Mogi Guaçu (19)	635	1.12c
	Mogi Guaçu (14)	627	1.03c
			(CV%) 12.07
G	São Manoel (6)	737	2.53a
	São Manoel (8)	750	1.92ab
	São Manoel (4)	722	1.69bc
	São Manoel (7)	733	1.28c
			(CV%) 12.89
H	Franca (72)	1017	2.43a
	Franca (31)	1022	0.94b
			(CV%) 25.40
	Pedregulho (62)	978	5.99a
	Pedregulho (56)	1004	3.11b
	Pedregulho (60)	974	2.90bc
	Pedregulho (48)	1006	2.79bc
	Pedregulho (58)	960	2.67bc
	Pedregulho (50)	1013	2.64bc
	Pedregulho (51)	1023	2.40bcd
	Pedregulho (47)	1009	2.33cd
	Pedregulho (64)	968	2.17cde
	Pedregulho (61)	973	1.86def
	Pedregulho (57)	979	1.52efg
	Pedregulho (52)	1022	1.51efg
	Pedregulho (53)	1019	1.47efg
	Pedregulho (55)	1004	1.33fgh
	Pedregulho (59)	973	1.03gh
	Pedregulho (54)	1016	0.66h
			(CV%) 11.01
	Rifaina (68)	877	5.10a
	Rifaina (71)	604	4.12ab
	Rifaina (66)	949	3.65b
	Rifaina (70)	610	2.15c
	Rifaina (65)	949	1.61c
	Rifaina (67)	951	1.41c
			(CV%) 12.16

	Bom Jesus (13)	965	6.83a
	Bom Jesus (16)	976	3.52b
	Bom Jesus (12)	959	3.50b
	Bom Jesus (8)	1048	2.75c
	Bom Jesus (21)	978	1.89d
	Bom Jesus (9)	1056	1.74d
	Bom Jesus (17)	975	1.66de
	Bom Jesus (15)	987	1.54def
	Bom Jesus (14)	962	1.41def
	Bom Jesus (24)	988	1.38defg
	Bom Jesus (5)	1028	1.03efgh
	Bom Jesus (25)	1001	0.96fgh
	Bom Jesus (6)	1033	0.94fgh
	Bom Jesus (1)	948	0.72gh
	Bom Jesus (10)	1042	0.36h
			(CV%) 11.01
	Cristais Paulista (39)	990	4.75a
	Cristais Paulista (41)	995	4.38a
	Cristais Paulista (46)	993	4.12ab
	Cristais Paulista (40)	992	3.69abc
	Cristais Paulista (44)	997	3.67abc
	Cristais Paulista (36)	995	3.18abcd
	Cristais Paulista (43)	994	2.59bcd
	Cristais Paulista (42)	992	2.57bcd
	Cristais Paulista (32)	990	2.02cde
	Cristais Paulista (33)	989	1.73de
	Cristais Paulista (38)	989	1.58de
	Cristais Paulista (35)	1005	1.46de
	Cristais Paulista (34)	990	0.73e
	Cristais Paulista (37)	992	0.45e
			(CV%) 21.78

Média seguida das mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (0,5%).

Tabela 2. Média dos teores de 6-hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona (TMF) e triperpenos (mg/gps) em *Zeyheria montana* calculada dentro das subpopulações.

Localidade / População	Média do teor de TMF	Média do teor de ác. betulínico	Média do teor de ácido oleanólico mg/gps	Média do teor de ácido ursólico mg/gps
Orlândia/A	1.86a	4.91a	4.10a	10.08a
São Joaquim da Barra/A	0.89a	6.06a	4.08a	10.32a
Jaborandi/A	0.94a	4.42a	4.29a	9.94a
Morro Agudo/A	0.98a	4.47a	4.34a	11.46a
Sales Oliveira/A	2.22a	3.91a	5.00a	13.06a
(CV%)	58.91	34.94	22.79	25.42
São Carlos/B	1.09a	1.98a	4.13a	9.38a
Itirapina/B	1.93a	1.29a	4.71a	12.41a
(CV%)	39.92	42.28	19.29	24.33a
Assis/C	2.28a	3.92a	3.63a	10.21a
Paraguaçu Paulista/C	2.18a	4.05a	4.34a	12.07a
(CV%)	70.69	34.12	20.08	24.30
Penápolis/D	3.32a	4.16a	4.86a	11.97a
Avanhandava/D	1.63b	6.38b	5.05a	13.72a
(CV%)	51.50	30.42	24.97	31.34
Nipoã/E	2.23a	6.53a	4.65a	12.88a
Américo de Campo/E	1.93a	6.66a	4.81a	13.29a
Duplo Céu/E	1.25a	6.58a	4.94a	13.40a
(CV%)	58.94	27.27	27.75	34.36
Mogi Guaçu/F	2.97	4.81	3.27	8.92
São Manuel/G	1.85	3.87	2.96	7.43
Franca/H	1.68a	3.38a	4.40a	12.34a
Pedregulho/H	2.27a	4.62a	4.83a	13.65a
Rifaina/H	3.00a	5.47a	4.77a	13.58a
Bom Jesus/H	2.01a	5.52a	3.44b	9.00b
Cristais Paulista/H	2.63a	5.48a	4.71a	12.81a
(CV%)	60.06	41.62	17.72	20.26

Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (0,5%).

Tabela 3 . Média dos teores de 6-hidroxi-5,7,8-trimetoxiflavona (TMF) e triperpenos (mg/gps) em *Zeyheria montana* calculada entre as populações.

População	Média do teor de TMF	Média do teor de ácido betulínico	Média do teor de ácido oleanólico	Média do teor de ácido ursólico
A	1.42a	4.75a	4.16a	10.97a
B	1.51a	1.63a	4.42a	10.89a
C	2.23a	3.98a	3.99a	11.14a
D	2.47a	5.27a	4.95a	12.85a
E	1.80a	6.59a	4.80a	13.19a
F	2.97a	4.81a	3.27ab	8.92a
G	1.85a	3.87a	2.96b	7.43b
H	2.36	4.99a	4.43a	12.27a
(cv%)	33.54	38.24	16.98	19.81

Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey (0,5%).

Tabela 4 . Teor de ácido oleanólico em acessos de *Zeyheria montana* coletadas em diferentes localidades.

População	Localidade (número do acesso)	Altitude (m)	Teor ácido oleanólico mg/gps
A	Orlândia (30)	755	5.83a
	Orlândia (35)	766	5.46ab
	Orlândia (32)	746	5.06abc
	Orlândia (33)	745	4.89abc
	Orlândia (36)	754	4.85abc
	Orlândia (21)	766	4.77bc
	Orlândia (34)	745	4.71bc
	Orlândia (31)	759	4.20c
	Orlândia (37)	755	4.11cd
	Orlândia (26)	758	4.02cde
	Orlândia (22)	765	3.08def
	Orlândia (27)	760	3.05def
	Orlândia (25)	761	3.03ef
	Orlândia (28)	750	2.95f
	Orlândia (23)	767	2.84f
	Orlândia (24)	761	2.80f
			(cv%) 8.49
	São J. da Barra (39)	787	4.39a
	São J. da Barra (38)	769	3.78a

			(CV%) 9.35
	Jaborandi (42)	522	5.84a
	Jaborandi (40)	544	4.14b
	Jaborandi (41)	516	2.89c
			(CV%) 11.41
	Morro Agudo (44)	598	4.46a
	Morro Agudo (43)	594	4.21a
			(CV%) 12.07
	Sales Oliveira (47)	852	5.41a
	Sales Oliveira (45)	811	5.33a
	Sales Oliveira (46)	851	4.82a
	Sales Oliveira (48)	840	4.46a
			(CV%) 8.35
B	São Carlos(3)	804	5.05a
	São Carlos (1)	809	4.40ab
	São Carlos (2)	815	3.86ab
	São Carlos (4)	837	3.20b
			(CV%) 12.72
	Itirapina (9)	795	6.27a
	Itirapina (12)	781	5.18ab
	Itirapina (11)	775	4.75bc
	Itirapina (10)	787	4.13bc
	Itirapina (7)	803	4.01c
	Itirapina (8)	804	3.91c
			(CV%) 8.92
C	Assis (1)	590	4.59a
	Assis (3)	590	3.29b
	Assis (2)	543	3.00b
			(CV%) 11.63
	Paraguaçu Paulista (15)	481	5.64a
	Paraguaçu Paulista (19)	487	5.24ab
	Paraguaçu Paulista (18)	485	5.17ab
	Paraguaçu Paulista (13)	458	4.81abc
	Paraguaçu Paulista (27)	481	4.29abc
	Paraguaçu Paulista (20)	486	4.14abc
	Paraguaçu Paulista (28)	508	3.91bc
	Paraguaçu Paulista (26)	481	3.64bc
	Paraguaçu Paulista (29)	498	3.36c
	Paraguaçu Paulista (14)	478	3.23c

			(CV%) 12.78
D	Penápolis (33)	414	5.66a
	Penápolis (32)	414	5.58a
	Penápolis (31)	415	4.80ab
	Penápolis (30)	412	4.35b
	Penápolis (34)	407	3.91b
			(CV%) 6.98
	Avanhandava (56)	399	7.27a
	Avanhandava (35)	397	6.82ab
	Avanhandava (23)	399	6.73ab
	Avanhandava (38)	397	6.55ab
	Avanhandava (36)	398	6.27abc
	Avanhandava (44)	406	6.10abcd
	Avanhandava (40)	399	6.01abcd
	Avanhandava (51)	409	5.92abcde
	Avanhandava (22)	399	5.84abcdef
	Avanhandava (50)	421	5.81abcdef
	Avanhandava (41)	400	5.53abcdefg
	Avanhandava (42)	403	5.45abcdefg
	Avanhandava (53)	407	5.41bcdefg
	Avanhandava (54)	392	5.39bcdefg
	Avanhandava (43)	402	5.26bcdefgh
	Avanhandava (47)	418	5.08bcdefgh
	Avanhandava (45)	420	4.61cdefghi
	Avanhandava (55)	392	4.40defghij
	Avanhandava (6)	397	4.31defghij
	Avanhandava (39)	396	4.11efghij
	Avanhandava (24)	399	4.03fghij
	Avanhandava (49)	419	3.94ghij
	Avanhandava (48)	420	3.83ghijk
	Avanhandava (21)	400	3.57hijk
	Avanhandava (37)	398	3.26ijk
	Avanhandava (25)	397	2.70jk
	Avanhandava (46)	416	2.07k
			(CV%) 11.33
E	Nipoã (57)	440	6.08a
	Nipoã (60)	427	6.01a
	Nipoã (58)	432	4.71ab
	Nipoã (62)	442	3.33ab
	Nipoã (59)	431	3.12b
			(CV%) 22.55
	Américo de Campo (68)	449	7.55a

	Américo de Campo (73)	451	5.98ab
	Américo de Campo (71)	448	5.21ab
	Américo de Campo (74)	428	4.55bc
	Américo de Campo (70)	448	4.54bc
	Américo de Campo (64)	460	4.38bc
	Américo de Campo (63)	460	4.31bc
	Américo de Campo (69)	448	4.26bc
	Américo de Campo (65)	456	2.56c
			(CV%) 18.27
	Duplo Céu (75)	498	4.94a
	Duplo Céu (76)	500	4.94a
			(CV%) 5.15
F	Mogi Guaçu (11)	634	4.85a
	Mogi Guaçu (10)	609	4.39ab
	Mogi Guaçu (15)	646	3.91abc
	Mogi Guaçu (13)	608	3.69abcd
	Mogi Guaçu (16)	658	3.50abcd
	Mogi Guaçu (21)	610	3.20bcde
	Mogi Guaçu (20)	604	3.07bcde
	Mogi Guaçu (22)	635	2.95bcde
	Mogi Guaçu (14)	627	2.85cde
	Mogi Guaçu (17)	634	2.53cde
	Mogi Guaçu (12)	620	2.35de
	Mogi Guaçu (19)	635	1.91e
			(CV%) 15.32
G	São Manoel (6)	737	3.65a
	São Manoel (7)	733	3.60a
	São Manoel (8)	750	2.29b
	São Manoel (4)	722	2.29b
			(CV%) 12.12
H	Franca (72)	1017	5.42a
	Franca (31)	1022	3.38b
			(CV%) 12.95
	Pedregulho (53)	1019	5.97a
	Pedregulho (50)	1013	5.45ab
	Pedregulho (64)	968	5.34abc
	Pedregulho (57)	979	5.19abc
	Pedregulho (47)	1009	5.18abc
	Pedregulho (59)	973	5.15abc
	Pedregulho (55)	1004	5.07abc
	Pedregulho (60)	974	4.77abc

	Pedregulho (62)	978	4.69abc
	Pedregulho (51)	1023	4.68abc
	Pedregulho (54)	1016	4.61abc
	Pedregulho (52)	1022	4.55abc
	Pedregulho (61)	973	4.43abc
	Pedregulho (58)	960	4.43abc
	Pedregulho (56)	1004	4.06bc
	Pedregulho (48)	1006	3.66c
			(CV%) 11.47
	Rifaina (65)	949	5.84a
	Rifaina (71)	604	5.08ab
	Rifaina (68)	877	4.67b
	Rifaina (66)	949	4.59b
	Rifaina (70)	610	4.25b
	Rifaina (67)	951	4.19b
			(CV%) 8.08
	Bom Jesus (24)	988	4.95a
	Bom Jesus (8)	1048	4.20ab
	Bom Jesus (9)	1056	4.03abc
	Bom Jesus (15)	987	3.96abc
	Bom Jesus (17)	975	3.72abc
	Bom Jesus (25)	1001	3.68abc
	Bom Jesus (14)	962	3.66abc
	Bom Jesus (6)	1033	3.58abc
	Bom Jesus (12)	959	3.49abc
	Bom Jesus (16)	976	3.25abc
	Bom Jesus (10)	1042	3.08abc
	Bom Jesus (13)	965	3.04bc
	Bom Jesus (5)	1028	2.37bc
	Bom Jesus (1)	948	2.34bc
	Bom Jesus (21)	978	2.27c
			(CV%) 18.33
	Cristais Paulista (33)	989	6.64a
	Cristais Paulista (42)	992	5.73ab
	Cristais Paulista (36)	995	5.64abc
	Cristais Paulista (39)	990	5.34abcd
	Cristais Paulista (43)	994	5.18abcd
	Cristais Paulista (44)	997	5.06abcd
	Cristais Paulista (40)	992	4.63abcd
	Cristais Paulista (38)	989	4.57abcd
	Cristais Paulista (46)	993	4.49abcd
	Cristais Paulista (35)	1005	4.31abcd
	Cristais Paulista (41)	995	4.27abcd

	Cristais Paulista (37)	992	3.65bcd
	Cristais Paulista (34)	990	3.30cd
	Cristais Paulista (32)	990	3.10d
			(CV%) 17.03

Média seguida das mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (0,5%).

Tabela 5 . Teor de ácido ursólico em acessos de *Zeyheria montana* coletadas em diferentes localidades.

População	Localidade (número do acesso)	Altitude (m)	Teor ácido ursólico mg/gps
A	Orlândia (30)	755	15.61a
	Orlândia (34)	745	13.95ab
	Orlândia (35)	766	13.35abc
	Orlândia (32)	746	12.80abc
	Orlândia (33)	745	11.90abcd
	Orlândia (36)	754	11.80abcd
	Orlândia (21)	766	11.27abcde
	Orlândia (37)	755	11.25abcde
	Orlândia (26)	758	9.19bcdef
	Orlândia (31)	759	8.85cdef
	Orlândia (23)	767	7.61def
	Orlândia (25)	761	7.26def
	Orlândia (22)	765	7.05def
	Orlândia (27)	760	6.98def
	Orlândia (28)	750	6.74ef
	Orlândia (24)	761	5.77f
			(cv%) 16.14
	São J. da Barra (39)	787	11.29a
	São J. da Barra (38)	769	9.35b
			(CV%) 6.36
	Jaborandi (42)	522	12.27a
	Jaborandi (40)	544	11.14a
	Jaborandi (41)	516	6.40b
			(CV%) 10.41
	Morro Agudo (43)	564	11.75a
	Morro Agudo (44)	568	11.18a
			(CV%) 9.37
	Sales Oliveira (45)	811	13.86a
	Sales Oliveira (47)	852	13.66a
	Sales Oliveira (48)	840	12.69a

	Sales Oliveira (46)	851	12.69a
			12.04a
			(CV%) 7.76
B	São Carlos(3)	804	12.61a
	São Carlos (1)	809	10.82a
	São Carlos (4)	837	7.70a
	São Carlos (2)	815	6.3a
			(CV%) 25.85
	Itirapina (9)	795	16.24a
	Itirapina (12)	781	14.54ab
	Itirapina (11)	775	12.45bc
	Itirapina (8)	804	11.99bc
	Itirapina (7)	803	9.97c
	Itirapina (10)	787	9.26c
			(CV%) 9.96
C	Assis (1)	590	14.39a
	Assis (2)	543	8.21b
	Assis (3)	590	8.04b
			(CV%) 13.25
	Paraguaçu Paulista (19)	487	15.97a
	Paraguaçu Paulista (15)	481	15.07ab
	Paraguaçu Paulista (18)	508	14.02abc
	Paraguaçu Paulista (13)	458	13.94abc
	Paraguaçu Paulista (27)	481	12.59abcd
	Paraguaçu Paulista (20)	486	11.25abcd
	Paraguaçu Paulista (26)	481	10.38bcd
	Paraguaçu Paulista (14)	478	9.79cd
	Paraguaçu Paulista (28)	508	9.25cd
	Paraguaçu Paulista (29)	498	8.38d
			(CV%) 14.10
D	Penápolis (33)	414	15.38a
	Penápolis (32)	414	15.32a
	Penápolis (31)	415	11.52ab
	Penápolis (34)	407	9.38b
	Penápolis (30)	412	8.26b
			(CV%) 18.38
	Avanhandava (56)	399	21.71a
	Avanhandava (23)	399	19.19ab
	Avanhandava (35)	397	18.67ab
	Avanhandava (38)	397	18.07ab

	Avanhandava (36)	398	17.39ab
	Avanhandava (40)	399	17.26ab
	Avanhandava (51)	409	17.14ab
	Avanhandava (44)	406	16.76abc
	Avanhandava (42)	403	16.45bc
	Avanhandava (41)	400	16.37bc
	Avanhandava (50)	421	15.81bcd
	Avanhandava (54)	392	15.24bcde
	Avanhandava (53)	407	15.22bcde
	Avanhandava (47)	418	15.16bcde
	Avanhandava (43)	402	14.88bcde
	Avanhandava (22)	399	14.68bcdef
	Avanhandava (55)	392	11.83cdefg
	Avanhandava (49)	419	10.90defg
	Avanhandava (24)	399	10.64efgh
	Avanhandava (6)	397	10.23efg
	Avanhandava (48)	420	10.19efgh
	Avanhandava (39)	396	9.76fghi
	Avanhandava (45)	420	9.69fghi
	Avanhandava (37)	398	8.63ghi
	Avanhandava (21)	400	7.95ghi
	Avanhandava (25)	397	5.65hi
	Avanhandava (46)	416	4.99i
			(CV%) 11.70
E	Nipoã (60)	427	19.02a
	Nipoã (57)	440	17.08a
	Nipoã (58)	432	13.71ab
	Nipoã (59)	431	7.53b
	Nipoã (62)	442	7.06b
			(CV%) 26.14
	Américo de Campo (68)	449	21.93a
	Américo de Campo (73)	451	16.83ab
	Américo de Campo (74)	428	14.32abc
	Américo de Campo (71)	448	13.84abc
	Américo de Campo (69)	448	11.76bc
	Américo de Campo (64)	460	11.68bc
	Américo de Campo (70)	448	11.55bc
	Américo de Campo (63)	460	11.23bc
	Américo de Campo (65)	456	6.51c
			(CV%) 21.75
	Duplo Céu (76)	500	14.31a
	Duplo Céu (75)	498	12.49a
			(CV%) 9.85

F	Mogi Guaçu (10)	604	13.53a
	Mogi Guaçu (11)	634	13.53a
	Mogi Guaçu (13)	608	10.46ab
	Mogi Guaçu (16)	658	10.01b
	Mogi Guaçu (15)	646	9.64b
	Mogi Guaçu (20)	604	8.08bc
	Mogi Guaçu (14)	627	8.08bc
	Mogi Guaçu (22)	635	7.44bc
	Mogi Guaçu (21)	610	7.43bc
	Mogi Guaçu (17)	634	7.43bc
	Mogi Guaçu (19)	635	5.71c
	Mogi Guaçu (12)	620	5.70c
			(CV%)12.02
G	São Manoel (7)	733	9.24a
	São Manoel (6)	737	8.58ab
	São Manoel (8)	750	6.10bc
	São Manoel (4)	722	5.81c
			(CV%)13.12
H	Franca (31)	1022	15.71a
	Franca (72)	1017	8.98b
			(CV%)15.17
	Pedregulho (53)	1019	16.87a
	Pedregulho (59)	973	15.32ab
	Pedregulho (64)	968	15.16ab
	Pedregulho (50)	1013	14.93ab
	Pedregulho (57)	979	14.89ab
	Pedregulho (51)	1023	13.90ab
	Pedregulho (48)	1006	13.73ab
	Pedregulho (55)	1004	13.62ab
	Pedregulho (62)	978	13.30ab
	Pedregulho (47)	1009	13.06ab
	Pedregulho (60)	974	12.88ab
	Pedregulho (54)	1016	12.36ab
	Pedregulho (56)	1004	12.36ab
	Pedregulho (52)	1022	12.28ab
	Pedregulho (58)	960	12.27ab
	Pedregulho (61)	973	11.43b
			(CV%)12.63
	Rifaina (65)	949	17.50a
	Rifaina (66)	949	13.81b
	Rifaina (71)	604	13.63b

	Rifaina (68)	877	13.48b
	Rifaina (70)	610	11.99b
	Rifaina (67)	951	11.07b
			(CV%)8.08
	Bom Jesus (24)	988	12.74a
	Bom Jesus (8)	1048	11.65ab
	Bom Jesus (9)	1056	11.02ab
	Bom Jesus (15)	987	10.89ab
	Bom Jesus (6)	1033	10.15abc
	Bom Jesus (25)	1001	9.84abc
	Bom Jesus (12)	959	9.74abcd
	Bom Jesus (14)	962	9.44abcd
	Bom Jesus (13)	965	8.90bcde
	Bom Jesus (17)	975	8.57bcde
	Bom Jesus (16)	976	8.23bcde
	Bom Jesus (10)	1042	6.61cde
	Bom Jesus (5)	1028	6.04de
	Bom Jesus (21)	978	5.98de
	Bom Jesus (1)	948	5.20e
			(CV%)13.93
	Cristais Paulista (33)	989	18.40a
	Cristais Paulista (44)	997	16.17ab
	Cristais Paulista (42)	992	15.81ab
	Cristais Paulista (36)	995	15.32ab
	Cristais Paulista (39)	990	14.75ab
	Cristais Paulista (43)	994	14.60abc
	Cristais Paulista (41)	995	12.94abcd
	Cristais Paulista (38)	989	12.68abcd
	Cristais Paulista (46)	993	12.44abcd
	Cristais Paulista (35)	1005	11.26bcd
	Cristais Paulista (37)	992	10.25bcd
	Cristais Paulista (40)	992	8.56cd
	Cristais Paulista (34)	990	8.54cd
	Cristais Paulista (32)	990	7.58d
			(CV%)16.05

Média seguida das mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (0,5%).

Tabela 6 . Teor de ácido betulínico em acessos de *Zeyheria montana* coletadas em diferentes localidades.

População	Localidade (número do acesso)	Altitude (m)	Teor ácido betulínico mg/gps
A	Orlândia (32)	746	8.28a
	Orlândia (24)	761	7.27ab
	Orlândia (30)	755	7.21ab
	Orlândia (36)	754	6.45bc
	Orlândia (31)	759	6.05bcd
	Orlândia (35)	766	5.51cde
	Orlândia (33)	745	5.08cde
	Orlândia (34)	745	4.98cde
	Orlândia (26)	758	4.86de
	Orlândia (25)	761	4.35ef
	Orlândia (21)	766	4.17ef
	Orlândia (28)	750	3.23fg
	Orlândia (37)	755	3.07fg
	Orlândia (27)	760	2.85fg
	Orlândia (22)	765	2.65g
	Orlândia (23)	767	2.54g
			(cv%) 10.20
	São J. da Barra (38)	769	7.35a
	São J. da Barra (39)	787	4.77b
			(CV%) 8.48
	Jaborandi (41)	516	5.75a
	Jaborandi (42)	522	5.25a
	Jaborandi (40)	544	2.24b
			(CV%) 12.37
	Morro Agudo (43)	564	5.29a
	Morro Agudo (44)	568	3.64b
			(CV%) 10.22
	Sales Oliveira (47)	852	4.55a
	Sales Oliveira (45)	811	3.97a
	Sales Oliveira (48)	840	3.79a
	Sales Oliveira (46)	851	3.32a
			(CV%) 13.29
B	São Carlos(3)	804	3.16a
	São Carlos (1)	809	2.04b
	São Carlos (2)	815	1.98b

	São Carlos (4)	837	0.73c
			(CV%) 13.62
	Itirapina (9)	795	1.79a
	Itirapina (12)	781	1.48ab
	Itirapina (11)	775	1.37ab
	Itirapina (8)	804	1.24ab
	Itirapina (7)	803	1.01b
	Itirapina (10)	787	0.86b
			(CV%) 18.47
C	Assis (3)	590	4.88a
	Assis (1)	590	4.09a
	Assis (2)	543	2.80a
			(CV%) 54.66
	Paraguaçu Paulista (15)	481	6.14a
	Paraguaçu Paulista (18)	485	6.12a
	Paraguaçu Paulista (29)	498	4.83ab
	Paraguaçu Paulista (20)	486	4.45abc
	Paraguaçu Paulista (26)	481	4.35abc
	Paraguaçu Paulista (13)	458	4.04abcd
	Paraguaçu Paulista (14)	478	3.13bcd
	Paraguaçu Paulista (28)	508	2.97bcd
	Paraguaçu Paulista (19)	487	2.52cd
	Paraguaçu Paulista (28)	508	1.90d
			(CV%) 19.26
D	Penápolis (30)	412	5.45a
	Penápolis (34)	407	5.27a
	Penápolis (32)	414	4.25b
	Penápolis (33)	414	4.09b
	Penápolis (31)	415	1.75c
			(CV%) 6.96
	Avanhandava (35)	397	10.91a
	Avanhandava (22)	399	9.99ab
	Avanhandava (39)	396	9.22abc
	Avanhandava (40)	399	8.44abcd
	Avanhandava (6)	397	8.14abcde
	Avanhandava (47)	418	8.05abcde
	Avanhandava (54)	392	7.46bcdef
	Avanhandava (51)	409	6.76cdefg
	Avanhandava (42)	403	6.71cdefgh
	Avanhandava (50)	421	6.55cdefghi
	Avanhandava (45)	420	6.53cdefghi

	Avanhandava (23)	399	6.52cdefghi
	Avanhandava (56)	399	6.47cdefghi
	Avanhandava (36)	398	6.33defghi
	Avanhandava (43)	402	6.21defghi
	Avanhandava (41)	400	6.15defghi
	Avanhandava (46)	416	6.13defghi
	Avanhandava (25)	397	5.96defghi
	Avanhandava (49)	419	5.78defghi
	Avanhandava (24)	399	5.32efghi
	Avanhandava (37)	398	5.00fghi
	Avanhandava (38)	397	4.45ghi
	Avanhandava (21)	400	4.14ghi
	Avanhandava (48)	420	3.85hi
	Avanhandava (44)	406	3.84hi
	Avanhandava (55)	392	3.74i
	Avanhandava (53)	407	3.70i
			(CV%) 14.12
E	Nipoã (62)	442	7.86a
	Nipoã (58)	432	7.66a
	Nipoã (60)	427	7.13a
	Nipoã (59)	431	5.39a
	Nipoã (57)	440	4.63a
			(CV%) 27.18
	Américo de Campo (68)	449	10.33a
	Américo de Campo (65)	456	7.83ab
	Américo de Campo (73)	451	7.55ab
	Américo de Campo (74)	428	6.34b
	Américo de Campo (64)	460	5.91b
	Américo de Campo (63)	460	5.74b
	Américo de Campo (71)	448	5.71b
	Américo de Campo (69)	448	5.61b
	Américo de Campo (70)	448	4.93b
			(CV%) 18.77
	Duplo Céu (5)	498	9.02a
	Duplo Céu (6)	500	4.14b
			(CV%) 30.54
F	Mogi-Guaçu (21)	610	10.51a
	Mogi-Guaçu (17)	634	9.74a
	Mogi-Guaçu (15)	646	5.13b
	Mogi-Guaçu (14)	627	4.77bc
	Mogi-Guaçu (12)	620	4.57bc
	Mogi-Guaçu (10)	609	4.39bc

	Mogi-Guaçu (13)	608	3.94bcd
	Mogi-Guaçu (16)	658	3.65cde
	Mogi-Guaçu (20)	604	3.08de
	Mogi-Guaçu (11)	634	2.71de
	Mogi-Guaçu (22)	635	2.6e
	Mogi-Guaçu (19)	635	2.54e
			(CV%) 8.87
G	São Manoel (6)	737	5.08a
	São Manoel (7)	733	3.85b
	São Manoel (8)	750	3.57b
	São Manoel (4)	722	2.98b
			(CV%) 10.70
H	Franca (72)	1017	3.51a
	Franca (31)	1022	3.25a
			(CV%) 7.93
	Pedregulho (61)	973	7.03a
	Pedregulho (47)	1009	6.86a
	Pedregulho (48)	1006	5.84ab
	Pedregulho (53)	1019	5.75ab
	Pedregulho (62)	978	5.44abc
	Pedregulho (50)	1013	5.01abcd
	Pedregulho (56)	1004	4.99abcd
	Pedregulho (60)	974	4.92abcd
	Pedregulho (52)	1022	4.42bcd
	Pedregulho (59)	973	4.15bcde
	Pedregulho (51)	1023	3.82bcde
	Pedregulho (64)	968	3.81bcde
	Pedregulho (58)	960	3.59bcde
	Pedregulho (55)	1004	3.25cde
	Pedregulho (57)	979	3.04de
	Pedregulho (54)	1016	2.04e
			(CV%) 16.60
	Rifaina (70)	610	7.34a
	Rifaina (67)	951	7.14a
	Rifaina (71)	604	6.88a
	Rifaina (66)	949	5.81b
	Rifaina (65)	949	2.82c
	Rifaina (68)	877	2.81c
			(CV%) 6.80
	Bom Jesus (13)	965	12.73a
	Bom Jesus (25)	1001	8.48b

	Bom Jesus (8)	1048	8.44b
	Bom Jesus (6)	1033	7.32bc
	Bom Jesus (1)	948	6.26cd
	Bom Jesus (9)	1056	5.99cd
	Bom Jesus (24)	988	5.91cd
	Bom Jesus (17)	975	5.56d
	Bom Jesus (14)	962	5.31de
	Bom Jesus (16)	976	3.82ef
	Bom Jesus (10)	1042	3.48fg
	Bom Jesus (12)	959	2.58fg
	Bom Jesus (15)	987	2.45fg
	Bom Jesus (21)	978	2.42fg
	Bom Jesus (5)	1028	2.03g
			(CV%) 10.36
	Cristais Paulista (42)	992	8.74a
	Cristais Paulista (46)	993	8.33ab
	Cristais Paulista (43)	994	7.90ab
	Cristais Paulista (38)	989	7.14abc
	Cristais Paulista (40)	992	6.22abc
	Cristais Paulista (33)	989	5.42bcd
	Cristais Paulista (36)	995	5.40bcd
	Cristais Paulista (39)	990	5.18bcd
	Cristais Paulista (44)	997	4.67cd
	Cristais Paulista (35)	1005	4.29cd
	Cristais Paulista (34)	990	3.95cd
	Cristais Paulista (41)	995	3.95cd
	Cristais Paulista (37)	992	2.81d
	Cristais Paulista (32)	990	2.66d
			(CV%) 19.50

Média seguida das mesmas letras não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (0,5%).

Os acessos de *Zeyheria montana* coletados tanto, em ambiente de Cerrado ralo (Furnas de Bom Jesus e Reserva Biológica de Mogi Guaçu) como em situação ruderal, apresentaram resultados similares em termos de teor flavonóide e triterpenos. Essa informação é importante porque algumas plantas, quando são transferidas de seu ambiente natural, de forma antrópica ou não, podem apresentar alterações significativas no metabolismo secundário. Segundo Brown (1988), *Dalbergia* sp., que cresce sob condição ruderal,

apresenta menor atividade terapêutica do que as plantas que crescem em ambiente natural dessa espécie.

A análise das características químicas foi associada à técnica de componentes principais, com objetivo de se verificar quanto cada composto químico avaliado contribui para a avaliação da diversidade da *Z. montana*. A tabela 7 mostra que a variação nos dois primeiros componentes principais foi superior a 75%. Com base nos dados, pela técnica de componentes principais, foi possível observar que o ácido ursólico e o oleanólico se comportaram de maneira semelhante quanto à variabilidade e, portanto, optou-se por excluir os dados do triterpeno ácido oleanólico por não acrescentar informações adicionais. A partir desse dado nova análise foi realizada usando-se apenas os três metabólitos secundários, ou seja, flavonóide, ácidos ursólico e betulínico (tabela 8) e, os escores em relação aos componentes principais para os 167 acessos de *Zeyheria Montana*, foram listados na tabela 9.

Os métodos de agrupamentos têm por finalidade separar um grupo original de observações em vários subgrupos, de tal forma a existir homogeneidade entre os subgrupos (Cruz, 1990). Essa técnica depende fundamentalmente de medidas de distâncias ou similaridades estimadas previamente. Entre os métodos aglomerativos os mais utilizados são os de otimização e os hierárquicos. Os de otimização dividem os genótipos em subgrupos não vazios e mutuamente exclusivos e, um dos mais empregados é o proposto por Tocher (Rao, 1952), o qual estabelece que as médias das medidas de distâncias dentro de cada grupo, devem ser menores que as distâncias médias entre quaisquer outros grupos. Nos métodos hierárquicos, os genótipos são agrupados por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido um dendograma ou diagrama de árvore (Cruz & Regazzi, 1994).

O método de Tocher foi empregado com os dados obtidos pela análise química do flavonóide, ácido ursólico e betulínico (tabela 10).

Para a finalização desse trabalho foram associados os dados químicos mostrados no gráfico de componentes principais e a diversidade genética apresentada nos dendogramas. Essa associação permitiu, então, selecionar os

indivíduos que serão conservados em banco de germoplasma. Essas informações encerram esse trabalho e estão comentadas nos próximos parágrafos.

Analizando o gráfico de componentes principais (Figura 10), que foi obtido a partir da análise multivariada, pode-se afirmar que a população A apresentou um perfil químico rico em ácido betulínico, pobre em flavonóide e ácido ursólico. (Fig 3). Os indivíduos dessa população se encontram distribuídos em áreas cuja altitude varia entre 745 e 811m acima do nível do mar. Comparando-se os dados dos componentes principais com os dendogramas, das figuras 4 a 11, foram selecionadas 11 acessos de um total de 27 indivíduos que serão conservados em banco de germoplasma e estão listados na tabela 11.

A população B agrupou indivíduos de São Carlos e Itirapina, foi a população que apresentou menor teor dos metabólitos analisados. Do ponto de vista de conservação sugerimos que dos 10 indivíduos dessa população 3 sejam conservados. A altitude nessa população foi registrada entre 775 a 837 m.

O perfil químico na População C apresentou resultado oposto ao apresentado pela população A, ou seja, rico em flavonóide e ácido ursólico e pobre em ácido betulínico. Os indivíduos foram localizados em altitude de 458 a 590 m e foram selecionados para a conservação, 6 de 13 indivíduos avaliados.

A população D que compreende indivíduos de Penápolis e Avanhandava geograficamente estão em regiões de altitude mais baixa (396-420m) quando comparadas com as outras populações. De um modo geral a maioria dos indivíduos esta localizada no gráfico de componentes principais em áreas que representam elevado teor de metabólito secundário apenas 1/3 dos indivíduos estão concentrados na região que apresenta médio teor. Dos 32 indivíduos, indicamos 8 para a conservação, uma vez que estes estão distribuídos em clusthers isolados em diversos dendogramas (figuras 4 a11).

A população E mostrou um comportamento semelhante ao da população D, em termos de teores de metabólito secundário e as plantas foram

encontradas em altitudes que variaram entre 427-500m. Para efeito de conservação foram selecionados apenas os indivíduos que apresentaram alto teor de metabólitos secundários e que foram encontrados em closther distantes dos closther da população D. Apenas 4 indivíduos de um total de 16 foram selecionados para conservação.

Os acessos da população F apresentaram alto, médio e baixos teores de metabólitos secundários. As altitudes foram registradas entre 604-658m. Foram selecionados para conservação 3 indivíduos de um total de 12.

A população G (São Manoel) apresentou baixo teor de metabólitos secundários e 3 dos 4 indivíduos da população foram agrupados no dendograma da figura 7 e, portanto, selecionados 2 indivíduos para o banco de germoplasma. Os acessos foram encontrados em altitude de 722 a 750m.

A população H foi a única que teve representantes em todas as áreas do gráfico de componentes principais, portanto, os acessos apresentaram todos os níveis de teor de metabólito secundário. Nessa população também foi registrada a maior variação em termos de altitude (610-1056 m). foram selecionados para conservação 18 indivíduos de um total 53 acessos e estes estão listados na tabela 11 onde pode ser vista a localização exata de onde se encontram no Estado de São Paulo.

Tabela 7. Estimativas das variâncias (autovalores –AVA), associadas aos componentes principais (CP) e respectivos coeficientes de ponderação (autovetores- AVE) das características teores de flavonoide (Flav), ácido ursólico (Urs), betulínico (Bet) e oleanico (Ole).

CP	Variância		Coeficiente de ponderação associados às características - AVE			
	AVA	%	Flav.	Urs.	Bet.	Ole
1	2.12	53,09	0,26	0,65	0,27	0,65
2	0.91	22,98	0,87	-0,21	0,33	-0,27
3	0.90	22,69	-0,40	-0,12	0,90	-0,08
4	0.04	1,23	0,50	-0,71	-0,01	0,70

Tabela 8. Estimativas das variâncias (autovalores –AVA), associadas aos componentes principais (CP) e respectivos coeficientes de ponderação (autovetores- AVE) das características teores de flavonoide (Flav), ácido ursólico (Urs) e betulínico (Bet).

CP	Variância		Coeficiente de ponderação associados às características - AVE		
	AVA	%	Flav	Urs	Bet
1	1,36	45,59	0,55	0.65	0,51
2	0,90	30,28	-0,64	-0,04	0,76
3	0,72	24,11	-0,52	0,75	-0,39

Tabela 9. Escores relativos aos 167 acessos de *Zeyheria montana*, obtidos em relação aos componentes principais (CP) correspondentes às variáveis teor de flavonóide, ácido úrsólico e betulínico.

Acesso	TMF	Ac. ursólico	Ác. betulínico
1	3.3206	1.0287	1.4014
2	2.236	0.5115	0.742
3	2.3229	0.3859	0.845
4	2.9948	2.2418	-0.2887
5	3.468	0.1862	-0.2734

6	3.517	0.8195	0.4341
7	2.5158	0.2927	0.4478
8	2.4055	0.5474	0.4481
9	6.116	0.5226	0.545
10	3.451	1.589	0.4291
11	4.938	2.0123	0.6217
12	4.7731	0.0297	0.3002
13	4.6709	0.5436	1.2803
14	4.6411	0.7303	1.0198
15	4.9584	0.668	0.1437
16	4.527	-1.0516	0.2196
17	4.0582	1.7916	0.1024
18	3.378	1.3362	1.3716
19	3.1063	-0.0098	1.4452
20	2.7943	1.6583	0.071
21	3.8891	1.256	1.296
22	3.8807	1.1661	1.1109
23	3.2866	0.6741	1.3705
24	4.4641	0.0998	1.3189
25	4.0332	-0.2167	0.9634
26	4.3172	0.6036	1.4045
27	4.5728	-0.3895	0.7452
28	3.0459	-0.1243	1.3783
29	2.361	-0.2087	0.3256
30	3.4504	0.5143	1.7403
31	1.7923	-0.1024	1.3108
32	2.8308	-0.658	1.2318
33	3.4555	-0.8574	1.4229
34	4.4959	-0.8498	2.0876
35	2.3853	-0.3447	1.3775
36	3.1342	-0.2617	1.9269
37	4.154	-0.9801	1.7415
38	5.2495	-0.6464	0.7755
39	2.6296	0.3378	0.7996
40	3.4216	0.6909	0.0609
41	4.2314	0.3888	1.5769
42	4.2507	-1.0309	-0.0989
43	4.4675	1.6435	1.864
44	5.2695	0.4971	0.6833
45	4.7493	-0.7464	1.7998
46	3.3493	1.1824	1.365
47	3.7042	0.5306	0.7005
48	4.9865	-2.0718	0.2395
49	2.8374	0.4412	1.0364
50	3.095	1.0858	0.5191
51	4.9575	-0.6513	-1.247

52	2.9185	0.0378	1.7605
53	5.5461	-0.6854	0.8515
54	5.224	-0.4182	1.1852
55	4.3177	0.1829	-0.2274
56	4.1609	2.2684	0.3427
57	3.359	0.2647	0.0875
58	5.6879	2.5832	0.7171
59	5.8191	1.1466	2.1885
60	3.4085	1.4731	1.0929
61	2.6287	1.835	-0.0349
62	6.9294	2.5052	1.1271
63	5.4405	1.1012	1.8425
64	2.844	1.5405	0.841
65	5.481	0.0722	2.0017
66	4.4297	2.5634	-0.0205
67	6.5021	1.1625	0.8883
68	5.4421	0.8379	1.451
69	5.4107	1.2057	1.5395
70	4.9984	1.0522	1.2904
71	4.5562	0.5086	2.3474
72	3.6506	1.7617	0.566
73	3.4024	0.8634	-1.0304
74	5.2494	2.0058	1.2465
75	3.3823	0.5513	0.9065
76	3.8326	1.3541	0.8292
77	4.8396	1.6643	1.8036
78	6.3401	0.313	0.899
79	4.6749	-0.0719	1.6098
80	5.485	1.3594	1.0001
81	3.3788	0.7494	1.5193
82	6.0285	1.4025	2.9561
83	5.7389	-0.3629	1.3766
83	4.9208	1.8376	0.961
85	3.0703	1.309	0.2193
86	7.0118	0.1017	1.0113
87	3.34591	2.3377	-0.2004
88	4.1573	0.9761	0.6348
89	4.2128	1.1362	0.7837
90	3.4925	2.1173	-0.4675
91	7.5871	2.0083	1.718
92	4.5792	0.5455	0.4646
93	4.5033	0.1572	0.4306
94	4.8874	0.6498	0.9501
95	5.3009	1.9533	1.7952
96	4.6602	1.386	1.3816
97	5.2986	1.9719	0.1944

98	3.766	1.0489	2.1355
99	4.5682	0.149	1.0825
100	5.8428	-2.384	-0.1879
101	2.6343	0.9561	-0.0969
102	5.3632	-1.6792	-0.845
103	3.0397	1.09	0.4554
104	4.0145	0.4487	0.1276
105	3.2147	0.5806	0.9792
106	5.1099	1.6106	-1.5678
107	2.0985	0.2669	0.3231
108	4.7748	-1.9754	-1.2491
109	5.005	2.2304	-1.4365
110	2.5005	0.2653	0.6084
111	2.4857	0.1508	0.017
112	3.8303	0.4625	-0.0847
113	3.1562	0.6135	0.7337
114	2.7658	0.2606	-0.107
115	2.8108	0.5991	0.9578
116	4.7199	-0.1491	1.7522
117	4.9989	1.1293	0.6235
118	5.06	0.4927	0.7529
119	5.0091	0.292	1.2316
120	4.4589	-0.0189	1.3157
121	3.9286	0.6495	1.2224
122	5.1052	1.0777	1.9454
123	3.0476	0.1924	1.9942
124	3.8256	0.342	1.7767
125	4.7579	0.0845	0.5035
126	4.0782	0.1219	2.0281
127	4.2796	-0.215	0.9363
128	4.1778	0.7096	2.1292
129	4.7428	0.1393	0.7067
130	4.5418	1.3815	0.4022
131	6.2318	-1.191	-0.5223
132	4.6147	0.06	1.6706
133	4.7194	-0.2262	2.4191
134	5.4551	0.0557	0.419
135	4.3008	1.6628	0.5177
136	5.2803	-1.6713	0.3465
137	4.8485	1.3334	0.3569
138	5.8445	0.2512	0.0193
139	2.7328	1.802	-0.3138
140	1.9943	0.1356	0.5169
141	3.9727	1.9874	0.4877
142	5.2613	1.4819	-0.1035
143	4.1492	1.132	0.5774

144	2.2483	0.8961	0.5698
145	3.8635	-0.9147	0.2073
146	7.4733	1.0463	-3.0952
147	3.5642	1.054	0.483
148	3.2238	0.0016	1.2694
149	3.8694	-0.4726	-0.3287
150	3.613	1.0253	0.1403
151	2.4651	-0.1595	0.0893
152	4.3132	1.2192	1.0749
153	4.2232	2.366	0.1458
154	2.8723	-0.1246	0.3352
155	5.3712	0.8197	2.2574
156	2.7996	0.9487	0.8037
157	3.7209	0.6282	1.0281
158	5.4281	0.1365	1.0073
159	2.7652	0.5992	1.4823
160	4.6792	1.5439	0.7785
161	5.9587	-0.7012	0.306
162	4.5914	0.268	-0.7576
163	5.159	-0.9028	0.2778
164	6.0452	1.579	0.7522
165	5.636	1.3146	0.6424
166	5.6385	-0.3637	1.1279
167	5.9527	0.7595	-0.4892

Tabela 10. Agrupamento de acessos de *Zeyheria montana* pelo método de Tocher realizado a partir dos dados de análise química do flavonóide, ácido ursólico e betulínico.

Formação de grupos	
Grupos	Indivíduos
1	50 103 85 147 6 150 40 113 10 156 75 105 47 157 115 49 23 1 46 60 76 22 18 81 24 36 11 16 21 26 31 41 46 61 66 71 96 101 111 116 121 126 141 141 161 166 2 7 12 17 27 32 37 42 52 57 67 72 77 87 92 97 107 112 117 122 127 132 137 142 152 162 167 3 8 13 28 33 38 43 53 58 63 68 73 78 83 88 93 98 118 123 128 133 138 143 148 153 158 163 4 9 14 19 29 34 39 44 54 59 64 69 74 79 84 89 94 99 104 114 119 124 129 134 139 144 149 154 159 164 5 15 20 25 30 35 45 55 65 70 80 90 95 110 120 125 130 135 140 145 155 160 165.
2	48 136 100 102 131 108 51
3	106 109
4	62 91 82 86
5	146

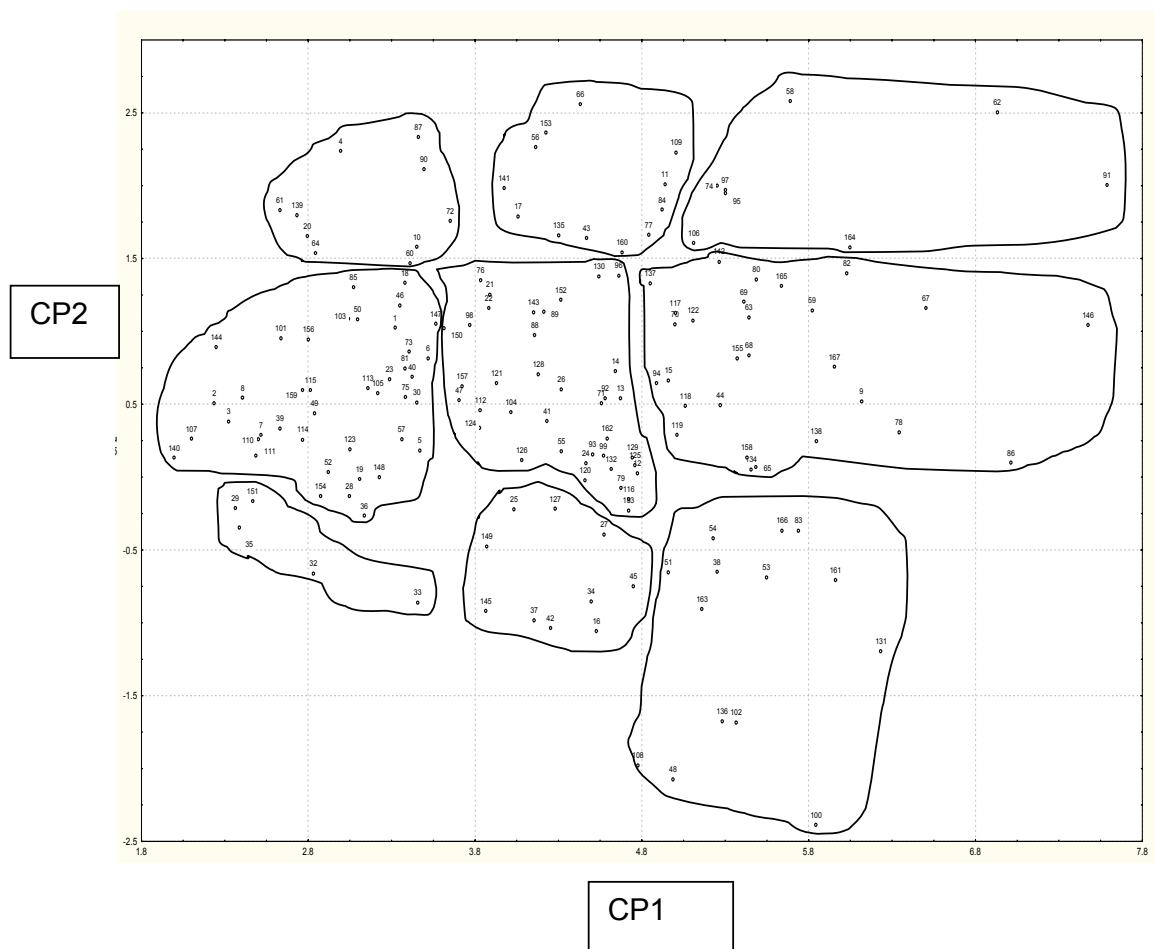


Figura 3 – Dispersão dos acessos de *Zeyheria montana* em relação aos dois primeiros componentes principais CP1 (flavonóide e ácido ursólico) e CP2 (ácido betulínico) obtidos na análise de quantificação química. Grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9 em sequência da esquerda para a direita.

Tabela 11. Relação dos indivíduos que foram selecionados para a conservação em banco de germoplasma e suas localizações.

Aceso	População	localidade	GPS	
			longitude	latitude
1	A	Orlândia	47 53 14,8	20 41 05,6
2	A	Orlândia	47 53 17,0	20 41 13,2
3	A	Orlândia	47 53 17,4	20 41 14,9
4	A	Orlândia	47 54 03,7	20 41 33,5
5	A	Orlândia	47 54 09,5	20 41 38,6
6	A	Orlândia	47 54 09,9	20 41 36,8
7	A	Orlândia	47 54 37,6	20 41 28,3
8	A	SJB	47 55 52,1	20 34 55,7
9	A	SJB	47 55 56,6	20 34 53,6
10	A	JAB	48 16 22,7	20 36 12,7
11	A	SO	47 44 03,5	20 48 24,6
12	B	São Carlos	47 54 23,6	21 53 55,8
13	B	São Carlos	47 54 23,8	21 53 55,2
14	B	Itirapina	47 47 37,2	22 13 56,7
15	C	Assis	50 22 00,5	22 36 07,8
16	C	Assis	50 21 51,0	22 35 58,4
17	C	Paraguaçu Paulista	50 34 34,6	22 22 30,2
18	C	Paraguaçu Paulista	50 34 36,9	22 22 36,7
19	C	Paraguaçu Paulista	50 34 30,5	22 22 37,5
20	C	Paraguaçu Paulista	50 34 32,3	22 22 35,4
21	D	Penápolis	50 01 59,1	21 25 38,2
22	D	Avanhandava	49 57 23,5	21 23 22,8
23	D	Avanhandava	49 57 25,7	21 23 24,1
24	D	Avanhandava	49 57 26,8	21 23 24,3
25	D	Avanhandava	49 57 41,6	21 23 20,5
26	D	Avanhandava	49 57 42,9	21 23 20,8
27	D	Avanhandava	49 57 43,3	21 23 19,4
28	D	Avanhandava	49 56 14,1	21 19 57,6
29	E	Nipoã	49 46 18,3	20 56 00,3
30	E	Nipoã	49 46 17,7	20 56 01,8
31	E	Nipoã	49 46 27,7	20 55 38,0
32	E	Américo de Campo	49 41 35,5	20 17 58,5
33	F	Mogi Guaçu	47 10 16,4	22 15 19,1
34	F	Mogi Guaçu	47 09 11,0	22 15 42,1
35	F	Mogi Guaçu	47 10 12,6	22 15 28,5
36	G	São Manuel	48 41 58,8	22 49 45,2
37	G	São Manuel	48 41 08,7	22 49 05,9
38	H	Franca	47 25 15,8	20 25 56,1
39	H	Pedregulho	47 27 55,5	20 13 12,0
40	H	Pedregulho	47 27 00,8	20 12 53,12
41	H	Pedregulho	47 27 37,8	20 10 26,4
41	H	Rifaina	47 28 25,7	20 09 26,6

43	H	Bom Jesus	47 27 26,6	20 14 03,3
44	H	Bom Jesus	47 27 48,6	20 15 40,4
45	H	Bom Jesus	47 27 49,5	20 15 39,6
46	H	Bom Jesus	47 27 14,5	20 14 04,2
47	H	Bom Jesus	47 27 13,5	20 13 59,9
48	H	Bom Jesus	47 27 28,3	20 14 15,5
49	H	Bom Jesus	47 26 20,9	20 12 43,4
50	H	Bom Jesus	47 27 18,1	20 13 28,4
51	H	Cristais Paulista	47 25 30,6	20 24 14,4
52	H	Cristais Paulista	47 25 34,4	20 24 06,8
53	H	Cristais Paulista	47 25 47,2	20 23 49,1
54	H	Cristais Paulista	47 26 00,2	20 23 30,5
55	H	Cristais Paulista	47 26 06,6	20 23 08,4

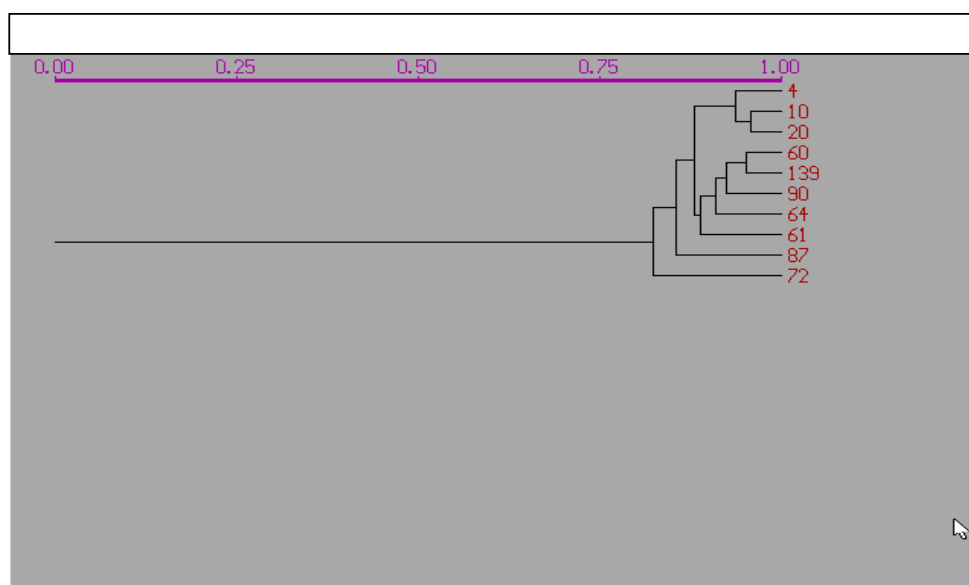


Figura 4 Dendrograma dos acessos do grupo 1 mostrado no gráfico de componentes principais.

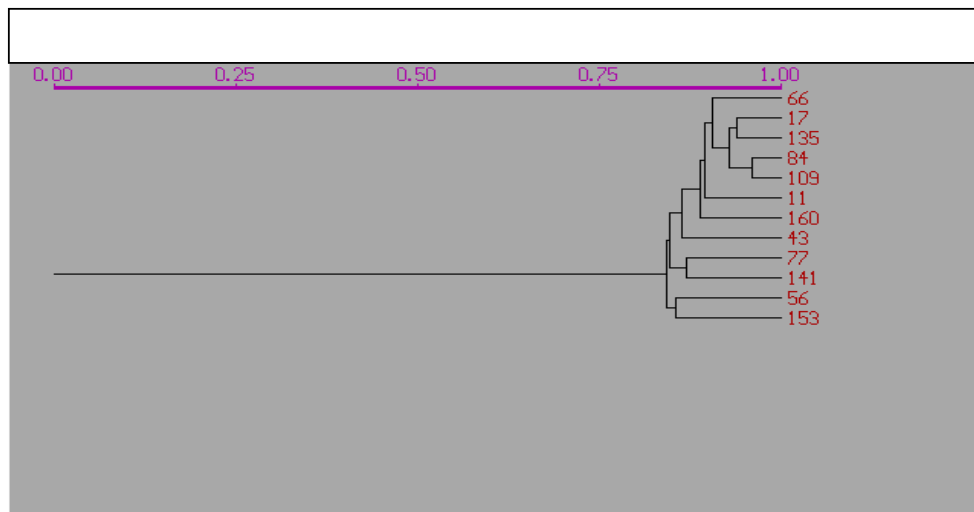


Figura 5 Dendrograma dos acessos do grupo 2 mostrado no gráfico de componentes principais.

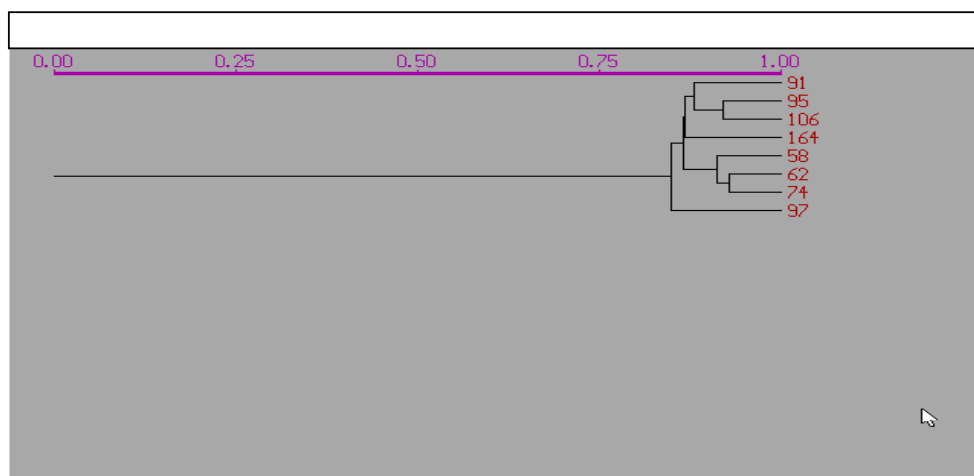
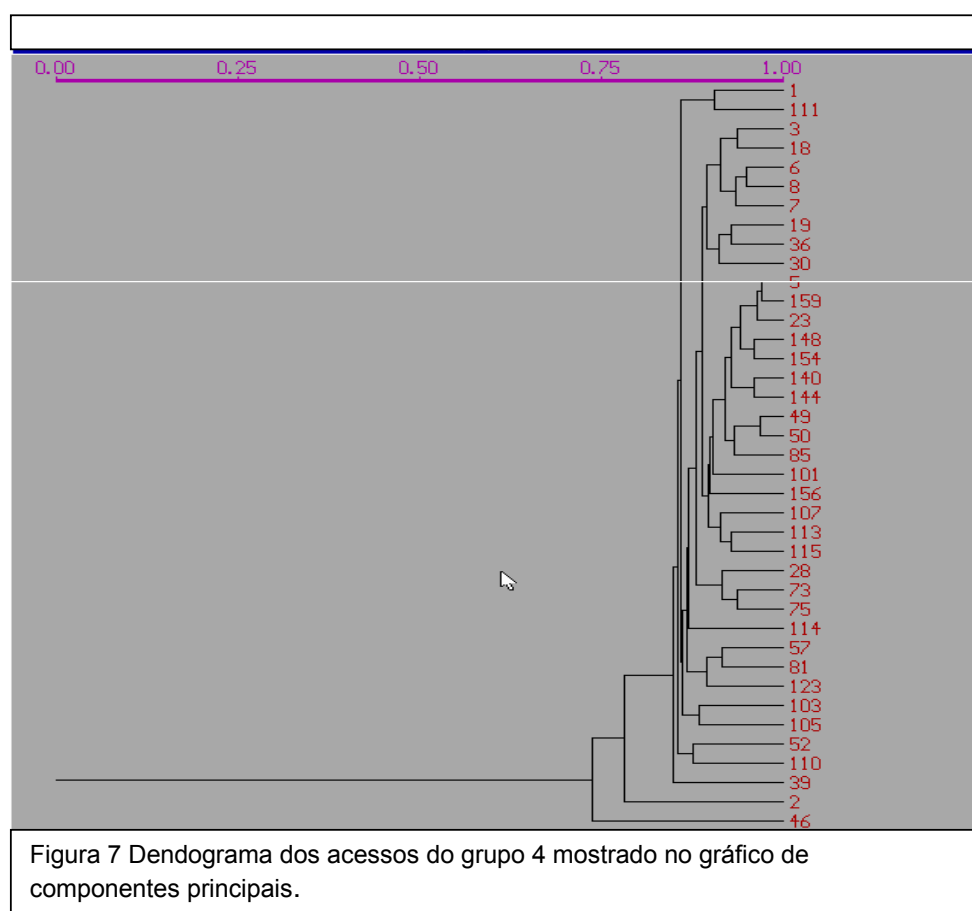
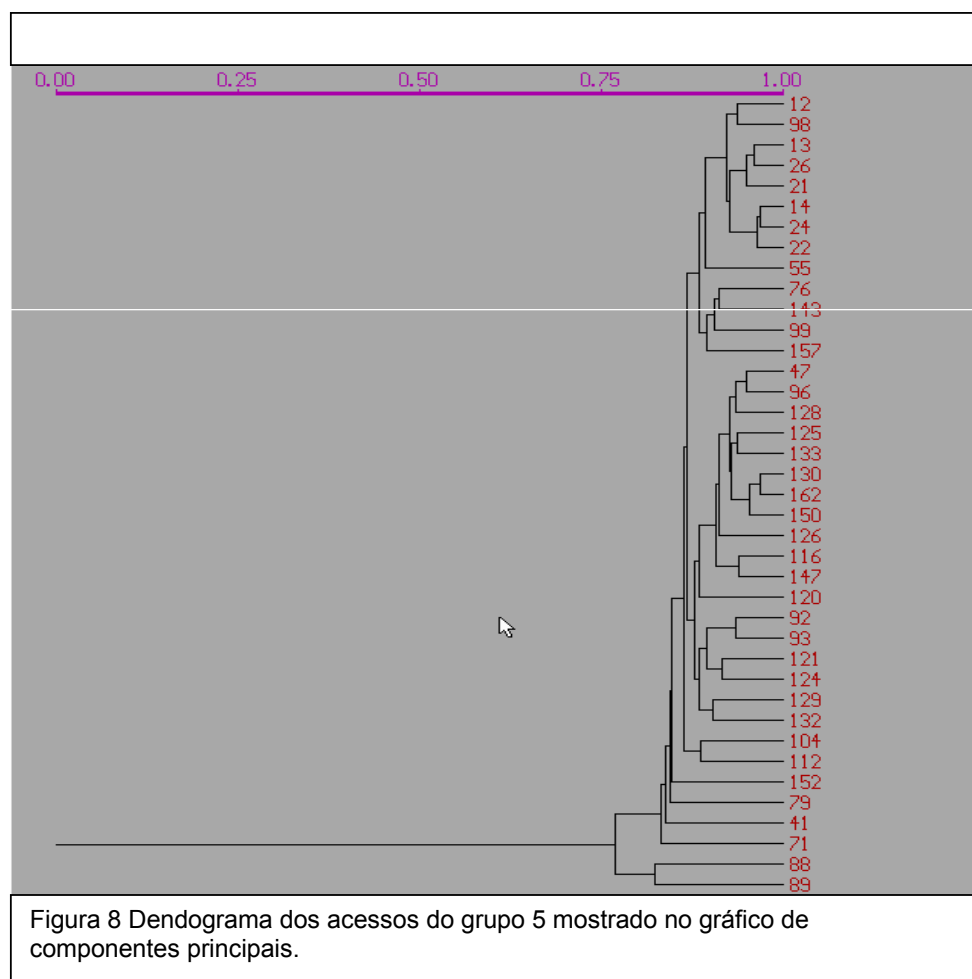
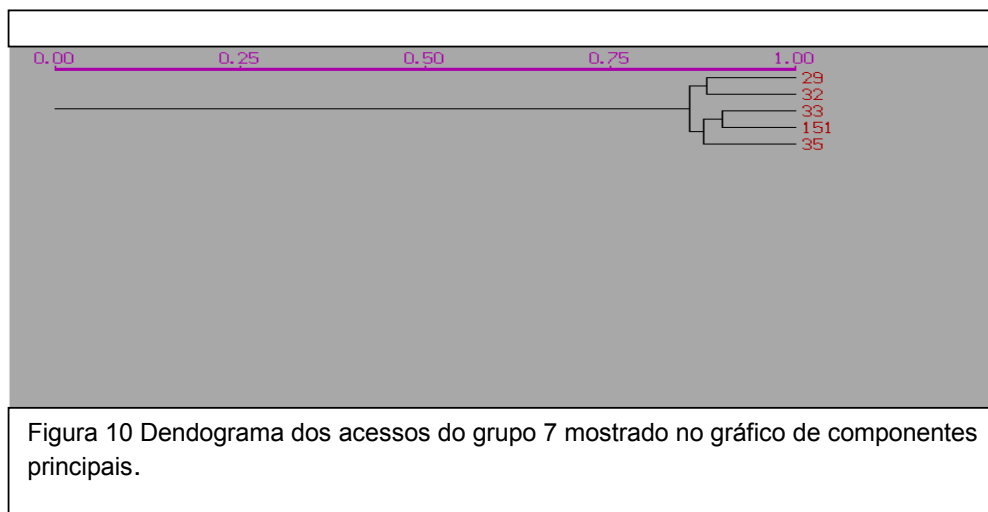
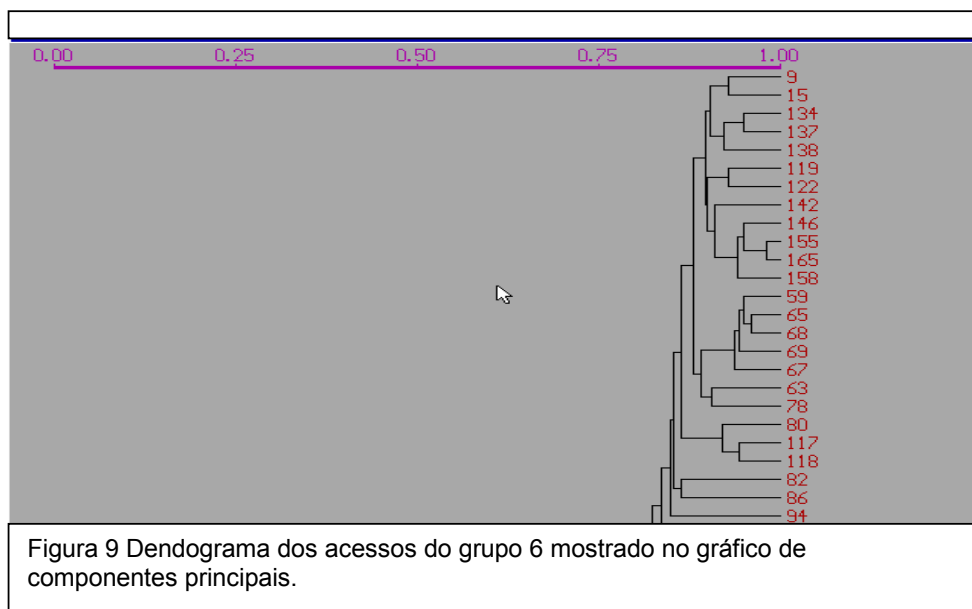


Figura 6 Dendrograma dos acessos do grupo 3 mostrado no gráfico de componentes principais.







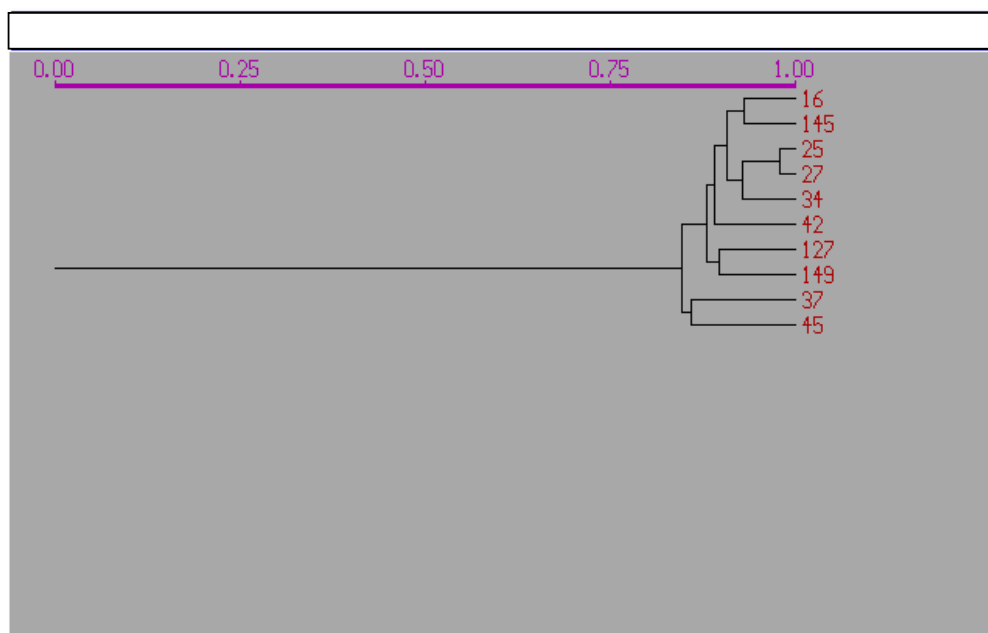


Figura 11 Dendrograma dos acessos do grupo 8 mostrado no gráfico de componentes principais.

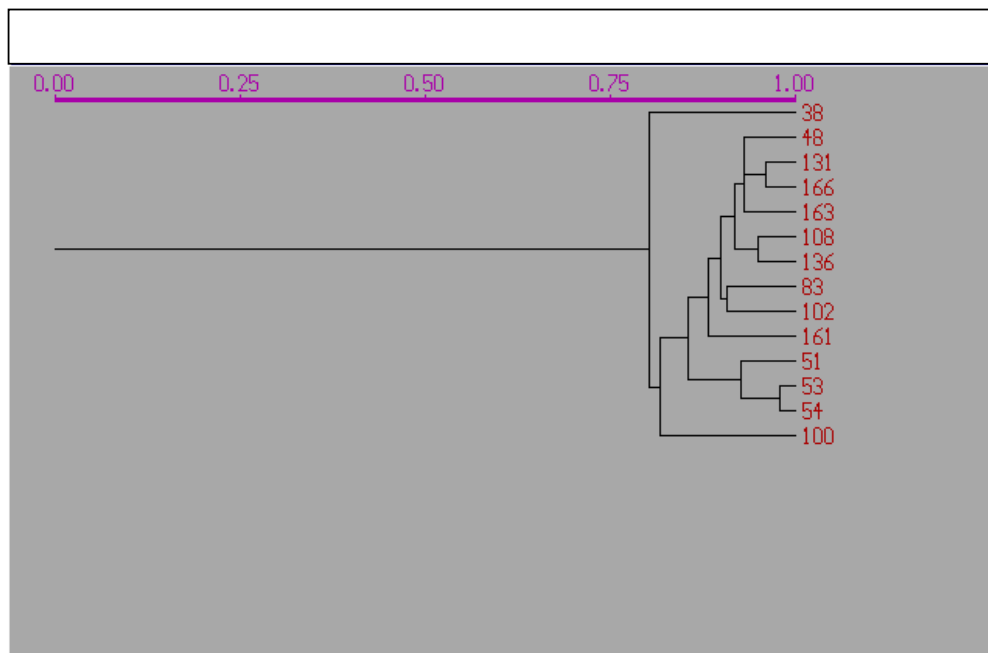


Figura 12 Dendrograma dos acessos do grupo 9 mostrado no gráfico de componentes principais.

7.4.Conclusões

Com os resultados obtidos nas análises químicas, podemos concluir que o ácido ursólico é o componente majoritário nessa espécie. Também foi possível verificar que a maior variabilidade esta dentro das populações de *Zeyheria montana*.

7.5.Referências

- Binutu ,O.A.; Lajubutu, B.A. Antimicrobial potentials of some plant species of the Bignoniaceae family. Afr J Med Med Sci, 23(3). p.269-73. 1994.
- Boido, C.; Boido, V.; Sparatore, F. Formulation and antileukemic activity of quinolizidinylalkylaminic derivatives of naphthoquinone and anthraquinone Boll Chim Farm., 128(6). p.208-11. 1989.
- Brown, Jr.; Keith, S. Engenharia Ecológica: Novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais.Supl. Acta Amazônica, 18(1-2). p.291-303. 1988.
- Chulasiri, M.; Bunyaphrathatsara, N.; Moongkarndi, P. Mutagenicity and antimutagenicity of hispidulin and hortensin, the flavonoids from *Millingtonia hortensis* L. Environ. Mol. Mutagen., 20(4).p.307-12. 1992.
- Claudi, F.; Felici, M.; Ferappi, M.; Grifantini, M; 2-amino-3-azirino-1,4-naphthoquinone and its derivatives with antitumor activity Farmaco [Sci] 24(8).p.725-31. 1969.

- Colman de Saizarbitoria, T.; Anderson, J.E.; Alfonso, D.; McLaughlin, J.L. Bioactive furanophytoquinones from *Tabebuia barbata* (bignoniaceae). *Acta Cient. Venez.*, 48(1).p.42-6. 1997.
- Corrêa, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das Exóticas. Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, IBDF, Brasil. 1931
- Cruz, C. D. Aplicação de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas. 1990. 188p. Tese de Doutorado, Piracicaba: ESALQ/USP, 1990.
- Cruz, C. D., Regazzi, A. J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa: UFV. 1994. 390p.
- D'Andrea, A.; Adami, M.; Salvatore, G.; Ricciardi, A.; Veglia, J.; Agrelo, A.; Torres, A.; Ricciardi, G. Examen del Aceite esencial de *Lippia alba* (mill.) N.E.Br la salvia morada de Corrientes., IX Sesión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la UNNE; p. 74. 1995.
- Duarte, D.S.; Dolabela, M.F.; Sala, C.E.; Raslan, D.S.; Oliveiras, A .B.; Nenninger, A .; Wiedemann, B.; Wagner, H.; Lombardi, J.; Lopes, M.T. Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguiscati* (Bignoniaceae). *J. Pharm. Pharmacol.*, 52(3).p.347-52. 2000.
- Fulda S, Jeremias I, Steiner HH, Pietsch T, Debatin KM. Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int J Cancer* 30;82(3). p.435-41. 1999.
- Gershenzon, J.; Kreis, Wolfgang. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins. In *Biochemistry of plant secondary metabolism*. Edited by Michael Wink. Sheffield Academic Press Ltd. 1999. Vol.2. p 222-299.

Grayerbarkmeijer, R.J.; Tomasbarberaran, F.A. 8-hydrorxylated flavone o-glycosides and other flavonoids in chemotypes of *Gratiola officinalis*. *Phytochemistry* 34(1)p. 205-210. 1993.

Hammouda, Y.; Khalafallah, N. Stability of tecomine, the major antidiabetic factor of *Tecoma stans* (Juss.) f. bignoniaceae. *J Pharm Sci*, 60(8).p.1142-5. 1971.

Itoigawa, M; Ito, C.; Tan, H.T.; Okuda, M.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, H. Cancer chemopreventive activity of naphthoquinones and their analogs from *Avicennia* plants. *Cancer Lett* 28;174(2).p.135-9. 2001.

Jácome, R. L. R. P.; Oliveira, A. B.; Raslan, D. S.; Muller, A.; Wagner, H. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria montana* M. (bolsa de Pastor). *Química Nova*, 22(2).p. 175-177. 1999.

Li J, Guo WJ, Yang QY. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World J Gastroenterol* ; 8(3).p.493-5. 2002

Lim,C.E.; Park,J.H.; Park,C.W. Flavonoid variation of the *Aconitum jaluense* complex (Ranunculaceae) in Korea. *Plant Systematics and Evolution*: 218:125-131. 1999.

Liu,J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J. Ethnopharmacol*. 49 (2).p.57-68. 1995.

Manez S, Recio MC, Giner RM, Rios JL. Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation. *Eur J Pharmacol* 3;334(1).p.103-5 .1997

- Min BS, Jung HJ, Lee JS, Kim YH, Bok SH, Ma CM, Nakamura N, Hattori M, Bae K. Inhibitory effect of triterpenes from *Crataegus pinatifida* on HIV-I protease. *Planta Med*;65(4):374-5. 1999.
- Miranda, F.G.; Vilar, J.C.; Alves, I.A.; Cavalcanti, S.C.; Antonioli, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. *BMC Pharmacol*;1(1).p.6-9. 2001.
- Ogura, M.; Cordell, G.A.; Farnsworth, R. Potential anticancer agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier (Bignoniaceae). *Lloydia*;40(2).p.157-68. 1977.
- Oliveira, A. F. M. Química e ecofisiologia de ceras epicuticulares de espécies brasileiras da caatinga e cerrado. São Paulo. 1999. 93 p. Tese (Doutorado) IB - INSTITUTO DE BIOCIEÊNCIAS-USP São Paulo. 1999.
- Otero, R.; Nunez, V.; Barona, J.; Fonnegra, R.; Jimenez, S.L.; Osorio, R.G.; Saldarriaga, M.; Diaz, A.. Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom. *J Ethnopharmacol*, 73(1-2).p.233-41. 2000.
- Piazzano, M. Número Cromosômicos em Bignoniaceae de Argentina. *Kurtziana* (26) p.179-189. 1998.
- Poser, G. L. von; Schripsema, J.; Henriques, A. T.; Jensen, S. R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*. V.28,p. 351-366,2000.
- Rao, R. C. *Advanced statistical methods in biometric research*. New York: J. Wiley. 1952. 390p.

- Repcak,M.; Svehlikova, V.; Imrich, J.; Pihlaja,K. Jaceidin and chrysosplenetin chemotypes of *Chamomilla recutita* (L.) Reuschert. *Biochemical Systematic and ecology*, 27(7) p. 727-732. 1999.
- Saikia,D.; Khauja, S.P.S.; Shasany,A.K.; Daroka,AM.P.; Kukreja, A.K.; Kumar, S. Assessment of diversity among *Taxus wallichiana* accessions from northeast india using RAPD analysis. *Plant Genetic Newsletter*, 121.p.27-31. 2000.
- Steele JC, Warhurst DC, Kirby GC, Simmonds MS. In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial. *Phytother Res* Mar;13(2).p.115-9. 1999
- Subbaramaiah K, Michaluart P, Sporn MB, Dannenberg AJ. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells.*Cancer Res* 1;60(9).p.2399-404. 2000.
- Torsell, K.B.G. The mevalonic acid pathway the terpenes. In: *Natural Product Chemistry*. Apotekarsocieteten-Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, Sweden. 480p.1997
- Traore-Keita F, Gasquet M, Di Giorgio C, Ollivier E, Delmas F, Keita A, Doumbo O, Balansard G, Timon-David P. Antimalarial activity of four plants used in traditional medicine in Mali. *Phytother Res* .14(1).p.45-7. 2000
- Tillequin, F.; Henri, M.E.; Paris, R.R.. Isolation of 5-hydroxy 6,7,4' trimethoxy-flavone from *phylarthrone madagascariense* leaves (Bignoniaceae). *Planta Med.*, 31(1).p.76-8. 1977
- Vieira, R.F.; Grayer, R.J.; Paton, A.; Simon,J.E.. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. Based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. *Biochemical Systematic and Ecology*, 29 (3). p. 287-304. 2001.

CAPÍTULO 8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos efetuados com sementes de *Zeyheria montana* demonstraram que elas não são longévoas, o que dificulta sua conservação em temperatura ambiente. Portanto, a produção de mudas a partir de sementes coletadas e armazenadas em um período superior a trinta dias pode ser comprometida. Neste trabalho também foi demonstrado que as sementes tiveram comportamento ortodoxo, o que possibilita seu armazenamento sob condições especiais de baixas temperaturas. O protocolo de micropropagação foi elaborado e recomenda-se que a expansão alada das sementes seja retirada parcialmente e de forma manual antes do processo de assepsia. O enraizamento pode ser obtido sob condições *in vitro* ou *ex vitro* de acordo com a infra-estrutura do produtor de mudas.

Após várias coletas no estado de São Paulo, constatamos que *Zeyheria montana*, ocorre em Cerrado aberto, com tendência a se tornar ruderal. O estudo do sistema reprodutivo mostrou que essa espécie se reproduz por alogamia facultativa.

As avaliações dos dados obtidos nas análises genéticas mostraram que não há um padrão espacial e que esta espécie suporta um modelo de ilhas evoluindo no espaço genético. Foi observada uma grande variabilidade dentro das populações de *Zeyheria montana* e os resultados das análises químicas mostraram também uma variabilidade significativa entre os indivíduos, mas não significativa entre a maioria das populações analisadas.

A associação entre os resultados das análises permitiu selecionar indivíduos com maior representatividade em termos de variabilidade química e genética. Este estudo permitiu selecionar 1/3 dos 167 acessos coletados e esses indivíduos, considerados elites, serão conservados em banco de germoplasma *in vitro*. Consideramos que esse trabalho é um novo modelo de conservação de plantas medicinais e poderá ser empregado para outras espécies do Cerrado.

Os estudos efetuados com sementes de *Zeyheria montana* demonstraram elas não são longévoas o que dificulta sua conservação sob de temperatura ambiente, portanto a produção de mudas a partir de sementes colhidas em tempo superior a trinta dias pode ser comprometida. Nesse trabalho também foi demonstrado que as sementes tiveram comportando ortodoxos, o que possibilita seu armazenamento sob condições especiais em baixas temperaturas. O protocolo de micropropagação foi obtido e recomenda-se que a expansão alada das sementes seja parcialmente e de forma manual antes do processo de assepsia, e que o enraizamento seja estimulado sob condições *in vitro* ou *ex vitro* de acordo com a infra-estrutura do produtor de mudas .

Após várias coletas no estado de São Paulo, constatamos que *Zeyheria montana*, ocorre em Cerrado aberto, com tendência a se tornar ruderal. O estudo do sistema reprodutivo mostrou que essa espécie se reproduz por alogamia facultativa.

A avaliação dos dados obtidos nas análises genéticas mostraram que não há um padrão espacial e que esta espécie suporta um modelo de ilhas evoluindo no espaço genético. Foi observada uma grande variabilidade dentro das populações de *Zeyheria montana* e os resultados das análises químicas mostraram também uma variabilidade significativa entre os indivíduos, mas não significativa entre a maioria das populações analisadas.

A associação dos dados de análise química e genética permitiu selecionar indivíduos com maior representatividade em termos de variabilidade química e genética. Esse estudo permitiu selecionar 1/3 dos 167 acessos coletados e esses indivíduos, considerados elites, serão conservados em banco de germoplasma *in vitro*. Consideramos que esse trabalho é um novo modelo de conservação de plantas medicinais e poderá ser empregado em outras espécies do Cerrado.