

RECURSOS GENÉTICOS DE FAVA-D'ANTA: CARACTERIZAÇÃO  
MORFOLÓGICA E MOLECULAR, E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE  
ACESSOS COLETADOS EM DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS

**CLÁUDIA POMBO SUDRÉ**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
DEZEMBRO – 2009

RECURSOS GENÉTICOS DE FAVA-D'ANTA: CARACTERIZAÇÃO  
MORFOLÓGICA E MOLECULAR, E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE  
ACESSOS COLETADOS EM DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS

**CLÁUDIA POMBO SUDRÉ**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Genética e Melhoramento  
de Plantas.”

Orientadora: Profa. Rosana Rodrigues

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
DEZEMBRO – 2009

RECURSOS GENÉTICOS DE FAVA-D'ANTA: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR, E CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ACESSOS COLETADOS EM DIFERENTES REGIÕES BRASILEIRAS

**CLÁUDIA POMBO SUDRÉ**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 01 de dezembro de 2009.

Comissão Examinadora:

---

Profa. Telma Nair Santana Pereira (Ph. D., *Plant Breeding*) – UENF

---

Prof. Antonio Teixeira do Amaral Júnior (D. Sc., Genética e Melhoramento)–UENF

---

Prof. Ernane Ronie Martins (D. Sc., Produção Vegetal) – UFMG

---

Profa. Rosana Rodrigues (D. Sc., Produção Vegetal) – UENF  
(Orientadora)

## Dedico

A minha família: pais maravilhosos que me passaram o amor à natureza, irmãs queridas que me apoiam em tudo na minha vida, filha que faz a mãe sentir orgulho todos os dias, e cunhado, Fabrício Guedes, enviado por Deus.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, Pai Amigo de todos os segundos;

À UENF

Ao PGGMP, em nome da professora Telma e do técnico Daniel, por apoiar-me financeiramente nas viagens de coleta, confecção de pôsteres apresentados em congressos e submissão de artigos em revistas científicas da área;

Ao Naturatins, pela permissão de coletas de fruto no Parque Estadual do Lajeado;

Ao Fernando Fernandes, por auxiliar na identificação botânica dos acessos;

À professora Rosana, pelo apoio, orientação e amizade. Não esquecendo do raciocínio rápido e claro, o qual lapida as imperfeições das escritas dos filhotes;

Ao professor Ernane, pela coorientação, amizade e paixão pelo cerrado; e, especialmente, por vir à Campos, mesmo aos trancos e barrancos, tombando pelos caminhos...

À Lourdes, por me receber carinhosamente em Montes Claros, e sofrer, com calma e bom humor, as consequências do tombamento.

A todos os professores do LMGV, que permitiram a liberação para eu fazer o doutorado, além do aprendizado por meio das disciplinas e convívio;

À professora Telma e aos professores, Messias e Amaral, por terem participado da banca de defesa de projeto, além de contribuírem com a tese no decorrer dos experimentos;

À professora Virgínia, pela coorientação nos trabalhos de cultivo *in vitro*, amizade e as enigmáticas gargalhadas;

Ao professor Monnerat, por ceder o laboratório e reagentes para análise do teor de boro nos frutos;

Ao professor Messias, pelo apoio na realização das análises moleculares, cedendo equipamentos e a técnica-professora, Vitória, que, com muita paciência e boa vontade, ensinou-me o passo a passo das análises.

A toda equipe da sala 110, por realmente sermos uma EQUIPE, não importando o grau de afinidade, afinal, somos filhotes da mesma mãe, logo, somos meio-irmãos. Equipe unida sorri unida, trabalha unida, chora unida, comemora unida. Amo vocês: Rosana, Leandro, Cíntia; Marilene; Sarah; Monique; Rebeca; Cláudio; Charles; Carlos; Roberto; Márcio; Ozias...

À minha irmã Jussara, por amar e cuidar da Aminthia como se fosse sua filha (congressos...); e a todos de sua família (Nayrian – sobrinha mais querida; Pingo, Líbia, Vânia, Gualton, Melissa, Tiago, D. Conceição, Tia Zélia e Sr. Manhães) que são nossa família em Campos;

Às malas mais queridas do mundo, Isa e Conceição, que todos os dias me esperam para dar o melhor e mais sincero 'bom dia';

Ao Antônio Carlos (gigante), por ser amigo até embaixo d'água em cima da árvore;

Aos irmãos adotivos, Roberto (feijão), Graziela e Rosanete;

Aos técnicos, Jader e José Manoel, pela amizade e apoio nos trabalhos de campo;

Às pessoas que coletaram ou contribuíram para a coleta dos acessos (Ernane; Denílson; Cecílio; José Sena; Saulo Guilherme; Maria Moura; Carlos – Gigante; Vilarinho; Manoel);

À minha filha amada, que me ajudou até nos experimentos de laboratório;

Enfim, a todos que são ou foram importantes nessa caminhada,

Muito Obrigada!

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1. Botânica e Ocorrência .....	3
2.1.1. <i>Dimorphandra mollis</i> Benth. ....	4
2.1.2. <i>Dimorphandra gardneriana</i> Tul. ....	6
2.1.3. <i>Dimorphandra wilsonii</i> Rizz. ....	6
2.2. Genética.....	7
2.3. Usos.....	8
2.4. Importância econômica.....	10
2.5. Germoplasma .....	11
2.6. Marcadores de DNA e seu uso na caracterização de germoplasma	13
2.6.1. Marcadores moleculares – RAPD.....	14
2.7. Conservação de germoplasma.....	15
3. TRABALHOS.....	18
Coleta, Caracterização e Divergência Fenotípica de Frutos de Fava-	
d’Anta.....	18
Resumo.....	18
Abstract .....	19
Material e Métodos.....	21

Resultados e Discussão.....	23
Referências.....	27
Implantação de Coleção <i>Ex Situ</i> de Germoplasma, Estudo Preliminar de Descritores Mínimos para <i>Dimorphandra</i> spp e Quantificação da Divergência Genética entre Acessos de Fava-d’Anta.....	36
Resumo.....	36
Abstract.....	37
Introdução .....	37
Material e Métodos .....	39
Resultados e Discussão .....	41
Conclusões .....	44
Referências Bibliográficas .....	45
Divergência genética entre acessos de <i>Dimorphandra</i> spp. com base em marcadores RAPD .....	52
Resumo .....	52
Abstract .....	52
Introdução .....	53
Material e Métodos .....	54
Resultados e Discussão .....	55
Referências Bibliográficas .....	56
Conservação <i>In Vitro</i> de Germoplasma de Fava-d’Anta: Estudos Preliminares para Germinação de Sementes e Micropropagação .....	62
Resumo .....	62
Abstract .....	63
Introdução .....	63
Material e Métodos .....	66
Resultados e Discussão .....	72
Conclusões .....	80
Referências Bibliográficas .....	81
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	87

## RESUMO

SUDRÉ, Cláudia Pombo; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Dezembro, 2009; Recursos genéticos de fava-d'anta: caracterização morfológica e molecular, e conservação *in vitro* de acessos coletados em diferentes regiões brasileiras. Orientadora: Rosana Rodrigues; Conselheiros: Telma Nair Santana Pereira e Antonio Teixeira do Amaral Júnior.

A fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth. e *D. gardneriana* Tul.) é uma planta medicinal com alto valor comercial, sendo responsável por 50% da produção mundial de rutina, além de fornecer matéria-prima para extração de outros metabólitos secundários. O extrativismo, a falta de proteção de habitats e a propensão a incêndios constituem os fatores de maior risco de erosão genética deste gênero. Portanto, este requer ações voltadas para conservação da variabilidade genética. O presente estudo teve como objetivos: coletar, caracterizar e estimar a divergência fenotípica entre acessos de *Dimorphandra* spp. provenientes de diferentes localidades do Brasil com base em descritores de frutos; implantar uma coleção *ex situ* de germoplasma de *Dimorphandra* spp. por meio de manutenção de indivíduos no campo e via sementes; estabelecer uma lista de descritores mínimos para caracterização morfológica dos acessos; caracterizar morfológicamente os acessos em sua fase vegetativa; estimar a divergência genética entre os acessos com base nos descritores propostos; estudar a variabilidade entre os acessos de *Dimorphandra* spp. por meio de marcadores moleculares RAPD, e definir protocolos para a germinação de sementes *in vitro* e micropropagação. O número de plantas amostradas,

aproximadamente cinco indivíduos por acesso, foi eficiente para caracterizar e estudar a divergência fenotípica dos acessos trabalhados. Contudo, para a conservação do germoplasma, são necessárias mais coletas nas respectivas áreas para aumentar o número efetivo populacional e garantir, com maior precisão, que ocorra o mínimo de erosão genética. Detectou-se variabilidade fenotípica entre os acessos estudados com base em descritores morfológicos de fruto e a formação dos grupos foi concordante com a origem e a espécie. Um banco *ex situ* de germoplasma foi implantado no campo com 123 indivíduos representando três espécies de *Dimorphandra*. Sementes desses acessos estão sendo mantidas em condições de baixa temperatura e umidade. Os 26 descritores propostos foram eficientes na discriminação dos acessos. As caracterizações com base em descritores quantitativos de parte vegetativa e marcadores moleculares RAPD demonstraram que há variabilidade entre os acessos estudados. Ambos foram eficientes na discriminação das espécies pelo método de agrupamento UPGMA. Para os ensaios com germinação *in vitro*, definiu-se que o tempo de 48 h de embebição com água desionizada estéril, foi suficiente para retirada de embriões íntegros. O tempo de desinfestação da semente com hipoclorito de sódio a 0,5 % por 15 minutos foi o mais eficiente. Já a desinfestação do embrião com cotilédone teve melhor resultado quando feita na concentração de 0,2 % de hipoclorito de sódio por 10 minutos. Quanto ao meio, o ágar-água foi o mais eficiente para germinação *in vitro* de *D. wilsonii* Rizz. Após a germinação dos embriões, nos meios de cultura WPM, a adição de sacarose permitiu a produção de plantas mais verdes e com maior número de raízes secundárias. Para os ensaios utilizando micropropagação, constatou-se que os segmentos nodais podem ser utilizados para multiplicação *in vitro* de germoplasma de *D. mollis* e de *D. wilsonii*.

## ABSTRACT

SUDRÉ, Cláudia Pombo, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, December, 2009; Genetic resources of tapir fruit (*fava-d'anta*): morphological and molecular characterization and *in vitro* conservation of accessions collected in different regions of Brazil. Advisor: Rosana Rodrigues; Committee members: Telma Nair Santana Pereira and Antonio Teixeira do Amaral Júnior.

The tapir fruit (*D. mollis* Benth. and *D. gardneriana* Tul.) is a medicinal plant with high commercial value, accounting for 50% of world production of rutin, and provides raw material for extraction of other secondary metabolites. The extraction, lack of protection of habitats and prone to fires are the factors of greatest risk of genetic erosion of this genus. This requires actions for conservation of genetic variability. This study aimed to collect, characterize and estimate the phenotypic divergence among *Dimorphandra* spp. accessions from different regions of Brazil based on descriptors of fruit; to establish an *ex situ* *Dimorphandra* spp. germplasm collection, maintaining individuals under field conditions and seeds stored in cold chambers; to establish a minimum list of descriptors for morphological areas; to characterize the accessions in their vegetative stage using morphological descriptors and to estimate the genetic divergence; to determine the variability among *Dimorphandra* spp. accessions by RAPD markers; to define protocols for seed germination and *in vitro* micropropagation. The number of plants sampled was efficient to characterize and to study the phenotypic divergence among the collected accessions. However, for

germplasm conservation, more collection expeditions in order to obtain more samples are needed to increase the effective population number and to ensure an adequate accuracy to assure the occurrence of minimal genetic erosion. Phenotypic variability among accessions was detected. Correspondence between geographic region and species was observed in cluster analysis meaning that accessions from different regions and from different species were perfectly separated into different groups. An *ex situ* gene bank was established with 123 individuals representing three *Dimorphandra* species. Seeds of these accessions are being conserved in low temperature and humidity. The 26 descriptors proposed were efficient in accessions discrimination. Characterizations based on plant quantitative descriptors and molecular markers showed that there is variability among the accessions studied. Both were effective in discrimination of species by the clustering method UPGMA. For *in vitro* germination assays, it was observed 48 h of soaking in sterile deionised water was sufficient for removal of intact embryos. Seed desinfestation technique was more efficient when used sodium hypochlorite 0.5% for 15 minutes. Nevertheless, for embryo with cotyledon desinfestation more efficiency was noticed when a concentration of 0.2% sodium hypochlorite for 10 minutes was used. Considering the culture medium, the agar-water was the most efficient for *D. wilsonii in vitro* germination. After embryos germination in culture medium, the sucrose addition produced plants with more intensity of green color and with greater number of secondary roots. For tests using micropropagation, nodal segments can be used for *in vitro* multiplication of germplasm *D. mollis* and *D. wilsonii*.

## 1. INTRODUÇÃO

A fava-d'anta (*Dimorphandra* spp.) é uma espécie nativa do cerrado, cujo fruto é importante fornecedor de rutina para o mercado mundial de produtos farmacêuticos e cosméticos (Souza, 1991; ABIQUIF, 2009).

Embora a rutina seja encontrada no mesocarpo, todo o fruto, incluindo-se as sementes, é coletado e enviado às indústrias. Os frutos são coletados por moradores da zona rural, como uma alternativa para aumentar a renda das famílias (Macedo et al., 2004). Cerca de 10 kg de fava seca são necessários para produzir 1 kg de rutina (Gomes, 1998).

Um aspecto importante que envolve o cultivo de uma planta medicinal é o estudo da preservação da biodiversidade, de modo a evitar a extinção de uma espécie em seu ambiente de ocorrência. A exploração direta de plantas de uso medicinal da flora nativa, por meio da extração direta nos ecossistemas tropicais, tem levado à redução drástica das populações naturais de inúmeras espécies, colocando em risco a flora medicinal (Castro et al., 2001). A demanda por plantas medicinais nativas do Brasil tende a aumentar com as descobertas de substâncias que não podem ser obtidas sinteticamente. Esse é o caso da fava-d'anta, cujas vagens possuem alto teor dos flavonoides, rutina e quercetina, e o açúcar ramnose, utilizados em grande escala pela indústria farmacêutica. A rutina, o flavonoide mais importante, que tem atividade vitamínica P, diminui a permeabilidade dos glóbulos vermelhos, protege a vitamina C contra a oxidação e normaliza a resistência e a permeabilidade das paredes dos vasos capilares

(Mendes et al., 2005). Outra atividade atribuída à fava-d'anta trata-se da sua ação anti-inflamatória, podendo também ser usada como agente terapêutico, no tratamento de doenças, que envolvem radicais livres (Filho et al., 2001).

A exploração da fava-d'anta pela indústria farmacêutica tem ocasionado um extrativismo predatório em alta escala, sendo necessárias medidas para a conservação da espécie, que pode ser extinta em longo prazo (Mendes et al., 2005).

Os objetivos deste trabalho foram coletar, caracterizar, com base em marcadores RAPD e descritores morfológicos, quantificar a divergência genética entre acessos de três espécies de *Dimorphandra* e estabelecer protocolo de cultivo *in vitro* para três espécies do gênero.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Botânica e ocorrência

O gênero *Dimorphandra* literalmente possui “duas formas de androceu: dimorpho-andro”, nas quais as flores são hermafroditas com gineceu, cinco anteras e cinco estaminoídes, que são afuncionais (Figura 1). As flores são sésses e distribuídas em inflorescências. No IPNI (*The International Plant Names Index*), estão registradas 43 espécies do gênero *Dimorphandra*. Dentre estas, a espécie arbórea *D. mollis* Benth. é a de maior importância medicinal, seguida por *D. gardneriana* Tull. e, potencialmente, *D. wilsonii* Rizz. As espécies do gênero *Dimorphandra* estão distribuídas desde o Norte da América do Sul até o Sudeste do Brasil Central (Gonçalves, 2007).



Figura 1. Flores sésseis, hermafroditas, com cinco estames e cinco estaminoides de *Dimorphandra mollis* Benth. Foto cedida por Valdir Dala Marta.

### 2.1.1. *Dimorphandra mollis* Benth.

A espécie *Dimorphandra mollis* Benth., conhecida pelos nomes de fava-d'anta, favela, faveiro, falso barbatimão e farinha (Lorenzi, 2002), foi classificada em 1840 por George Bentham (IPNI, 2007). A princípio, foi classificada como pertencente à família Leguminosae e, após a nova classificação desta família, várias formas de citação são encontradas na literatura: família Fabaceae (Gonçalves, 2007); Fabaceae subfamília caesalpinioideae (Moreira-Coneglian et al., 2006; De Paula et al., 2006; Costa et al., 2007; Dôres, 2008; Herbário do IAC); Fabaceae/mimosoideae (Oliveira et al., 2006; Paula et al. 2006; Lorenzi, 2002); Caesalpinaceae (Chaves e Usberti, 2003); Mimosaceae (EMBRAPA, 2007) e Leguminosae (Paula et al., 2006). A classificação mais usual e coerente é a de família Fabaceae e subfamília caesalpinioideae.

Segundo Doyle e Luckow (2003), há membros da subfamília mimosoidae com distâncias genéticas muito próximas do gênero *Dimorphandra*, considerada caesalpinioideae. Provavelmente, essa proximidade seja responsável pela inserção deste gênero ora na subfamília Caesalpinioideae e ora na Mimosoideae na literatura.

A fava-d'anta (*D. mollis*) caracteriza-se por ter porte pequeno a mediano, atingindo até 15 m de altura. O caule é tortuoso, característico de cerrado. Possui folhas grandes, compostas, bipinadas e cartáceas, com folíolos alternos ou subopostos (Lorenzi, 2002), cujos foliólulos são pubescentes em ambas as faces, a epiderme é provida de tricomas glandulares e tectores, além de papilas (Dôres, 2007).

Possui inflorescência terminal em espigas de cor creme-amarelada. As flores são hermafroditas. Os frutos são legumes (vagens), oblongos, carnosos, achatados, semideiscentes a indeiscentes, de coloração marrom escura, com mesocarpo farináceo adocicado, de comprimento entre 10 e 15 cm, com 3 a 4 cm de largura, que produzem, cada um, de 10 a 13 sementes alongadas e avermelhadas (Lorenzi, 2002).

As sementes possuem dormência tegumentar, necessitando de escarificação. Silva et al. (2005) escarificaram sementes de fava-d'anta com ácido sulfúrico por três horas e obtiveram 100% de germinação; nas sementes não escarificadas, não houve germinação. Outra forma de quebrar a dormência é por escarificação mecânica. Segundo Chaves e Usberti (2003), as sementes são ortodoxas, portanto, são passíveis de serem armazenadas, permitindo a manutenção do germoplasma *ex situ*. Faria et al. (2005) reforçam essa afirmativa com o estudo sobre a germinabilidade e o vigor fisiológico de sementes de fava-d'anta, armazenadas em sacos de papel pardo, em condições de temperatura e umidade ambientais. Após 15 meses de avaliação, os autores concluíram que não houve alteração nos níveis de germinação e vigor.

No Brasil, há relatos da ocorrência da espécie *D. mollis* Benth. nos estados do Amazonas, Bahia, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo, Tocantins, Ceará e Distrito Federal, principalmente em cerrados e caatingas (Figura 2). São encontradas em solos argilosos ou arenosos e em altitudes que variam entre 500 m e 1.700 m (Almeida, 1998).

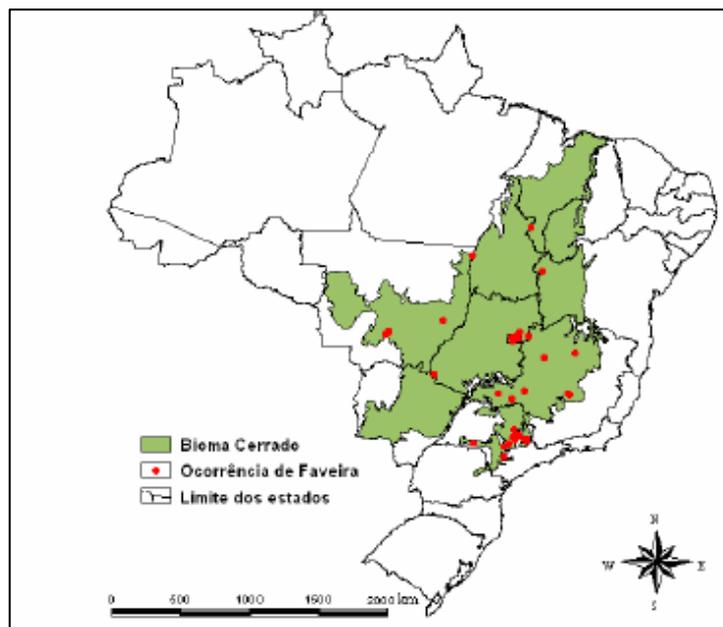


Figura 2. Distribuição geográfica de 38 relatos de ocorrência de faveira (*Dimorphandra mollis* Benth.) (Oliveira et al., 2008).

### 2.1.2. *Dimorphandra gardneriana* Tul.

A espécie *D. gardneriana* Tul. possui características de porte e produção de flavonoides similares a *D. mollis* Benth. Uma das diferenças marcantes entre essas espécies é que os foliólulos são glabros na parte adaxial. Esta espécie ocorre em Maranhão, Bahia e Goiás (Dôres, 2007). Segundo informação pessoal (Fernandes, 2009), esta espécie também ocorre nos estados do Pará, Pernambuco, Mato Grosso e Minas Gerais.

### 2.1.3. *Dimorphandra wilsonii* Rizz.

A *D. wilsonii* Rizz., espécie endêmica do estado de Minas Gerais, consta na *Red List of Threatened Plants* da IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) na categoria “criticamente em perigo”, e está atualmente com menos de 50 indivíduos adultos na natureza, localizados em áreas particulares nos municípios de Paraopeba, Pequi, Lagoa Santa e Sete Lagoas., todos localizados no estado de Minas Gerais (Souza et al., 2009).

Há indícios de que as populações existentes possuam certo grau de endogamia. Fernandes et al. (2007), ao estudarem a fenologia das populações conhecidas até 2007, constituídas por apenas 11 indivíduos adultos, observaram que, entre as populações, não houve uma sincronia perfeita das fenofases, além de observarem a ocorrência de 10% de plantas albinas ao realizarem a multiplicação das progênes desses indivíduos. Os autores, em testes preliminares, obtiveram valores altos de rutina por fruto, próximos a 30%, sendo potencialmente uma boa fonte desse flavonoide.

Os frutos e, conseqüentemente, as sementes são bem maiores do que os de *D. mollis* e *D. gardneriana*. Estudo sobre a biometria de frutos de *D. mollis* e *D. wilsonii* mostra valores máximos de massa de matéria fresca de 22,5 g e 47,2 g para *D. mollis* e *D. wilsonii*, respectivamente (Freitas et al., 2009). Outro fato discrepante é a altura das plantas, com a *D. wilsonii* chegando a 20 m de altura, enquanto a *D. mollis* a 14 m (Souza, 2008).

## 2.2. Genética

Bandel (1974), ao estudar 35 espécies de Leguminosae quanto ao número de cromossomos, observou que as espécies do gênero *Dimorphandra* apresentavam  $2n = 28$ . O mesmo número foi encontrado por Silva et al. (2001). Porém, Faria et al. (2005) encontraram valores de  $n = 8$  e  $2n = 16$ . Os autores sugerem que a espécie pode estar sofrendo processo de especiação. Segundo Biondo et al. (2005), alguns estudos sugerem que a subfamília Caesalpinioideae seja um grupo não natural e contenha tribos parafiléticas, estando sujeitas a mudanças futuras, com novas combinações. Além disso, essa subfamília possui grande variabilidade quanto ao número de cromossomos em níveis intergenéricos, interespecíficos e intraespecíficos, variando de  $2n = 14$  a 52.

Gonçalves (2007) estudou a estrutura genética em três populações de *D. mollis* em Minas Gerais, por meio de marcadores isoenzimáticos. A população que sofria menor pressão extrativista estava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg e maior amplitude de variação. O fluxo gênico encontrado entre as populações mais próximas (5,42 km) e em altitudes similares foi elevado, caracterizando baixa divergência genética entre elas. Porém, entre as populações mais distantes (16,20 km), o fluxo gênico foi menor, evidenciando a maior divergência genética

entre estas. A estimativa de tamanho efetivo populacional, realizado pela autora, sugere um valor mínimo de matrizes para a coleta de germoplasma de, pelo menos, 43 indivíduos, para que se garanta a manutenção da variabilidade genética nas sementes, e a população mínima viável, para a manutenção da espécie em curto e em longo prazo, é de 600 e 6.000 indivíduos, respectivamente. Outra conclusão foi que a espécie apresenta altos níveis de variabilidade genética dentro das populações e valores muito baixos entre as populações. Esses dados sugerem que a espécie seja alógama.

Souza (2008) estudou a diversidade e a estrutura genética de oito populações de *D. mollis* e 14 indivíduos de *D. wilsonii*. A autora observou que a porcentagem de locos polimórficos e o índice de Shannon foram consideravelmente menores em *D. wilsonii* ( $P = 35,6 \%$ ,  $Hsp = 0,168$ ) comparados a congênica *D. mollis* ( $P = 70,4 \%$  and  $Hsp = 0,297$ ). A divergência genética entre populações de *D. wilsonii* foi alta ( $fST = 0,509$ ), enquanto, para *D. mollis*, a diversidade genética foi maior dentro de populações do que entre populações ( $fST = 0,393$ ). A autora concluiu que a espécie *D. wilsonii* é altamente susceptível à extinção e, para tanto, sugere medidas para conservação tais como: coleta de sementes para conservação *ex situ*, reintrodução nas áreas de ocorrência, como também fundação de novas populações em áreas de reserva próximas às populações existentes, e ainda o cruzamento controlado entre indivíduos.

Abreu et al. (2002) estudaram a formação e crescimento dos tubos polínicos em *D. mollis* em três tratamentos: autogamia, geitonogamia e alogamia, e concluíram que a espécie é alógama e possui autoincompatibilidade de ação tardia.

### 2.3. Usos

Os frutos da fava-d'anta (*D. mollis* e *D. gardneriana*) são importantes fornecedores de rutina e quercetina, para o mercado mundial de produtos farmacêuticos e cosméticos (Souza, 1991), e são responsáveis por cerca de 50% da produção mundial de rutina, cabendo o restante à espécie chinesa *Sophora japonica*.

Embora a rutina seja encontrada no mesocarpo, todo o fruto, incluindo-se as sementes, é coletado e enviado às indústrias. Os frutos são coletados por moradores da zona rural, como uma alternativa para aumentar a renda das famílias (Macedo et al., 2004). Cerca de 10 kg de fava seca são necessárias para produzir 1 kg de rutina (Gomes, 1998).

A rutina, o flavonoide mais importante, tem atividade vitamínica P, diminui a permeabilidade dos glóbulos vermelhos, protege a vitamina C contra a oxidação e normaliza a resistência e a permeabilidade das paredes dos vasos capilares (Mendes et al., 2005). Outra atividade atribuída à fava-d'anta trata-se da sua ação antiinflamatória, podendo também ser usada como agente terapêutico no tratamento de doenças que envolvem radicais livres (Filho et al., 2001).

A quercetina possui ação antioxidante, removendo os radicais livres. É também encontrada em frutas, olerícolas e no vinho tinto. Noroozi et al. (1998) citam que a rutina e a quercetina foram mais eficazes do que a vitamina C na inibição dos danos oxidativos, induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no DNA de linfócitos humanos.

Outro produto extraído dos frutos da fava-d'anta é a ramnose, um açúcar utilizado pela indústria química e alimentícia (Gomes, 1998), em caracterizações bioquímicas de microorganismos (Rodrigues et al., 2003).

Gomas obtidas a partir do endosperma de sementes de leguminosas são compostas por manose e galactose (galactomanano). Esse polissacarídeo é utilizado como espessante, estabilizante e geleificante, melhorando a qualidade dos produtos alimentícios. Panegassi et al. (2000) estudaram a viabilidade de uso do galactomanano presente nas sementes de *D. mollis* Benth., na indústria de alimentos. Os autores obtiveram um extrato rico em galactomanano (83,2%) com proporção manose: galactose de 2,7. Esses parâmetros são comparáveis aos obtidos para os galactomananos de uso consagrado em formulações de alimentos, tais como, a goma guar com 78-82% de rendimento e razão manose: galactose igual a 2, e a goma locusta com 88% de rendimento e razão manose: galactose igual a 4. Valores similares foram encontrados para a espécie *D. gardneriana* Tul. (Cunha et al., 2009). No processo de obtenção de rutina e quercetina, cerca de 600 toneladas de sementes são descartadas por ano, o suficiente para produzir aproximadamente 160 t/ano de galactomanano somente com o rejeito, o que poderia minimizar a importação da goma guar e com maior grau de pureza (Cunha e Feitosa, 2009).

Ensaio biológicos demonstraram que a goma do faveiro é considerada praticamente atóxica, com potencial para ser utilizada em formulações de alimentos. Além disso, a massa do endosperma das sementes de *D. mollis* representa cerca de 65% do peso seco da semente. Esse valor é maior que a massa do endosperma das sementes de onde se obtém guar (35-42%) e locusta (42-46%).

Lorenzi (2002) cita que a madeira é utilizada para tabuados, fabricação de caixas, compensados, forros, painéis e brinquedos, além de ser usada para lenha e carvão. Rica em tanino extraído e utilizado para curtir couros. Possui potencial ornamental e é recomendada para áreas degradadas, pois tolera solos secos e pobres.

Costa et al. (2007) estudaram a nutrição mineral de *D. mollis* e comprovaram a capacidade desta espécie de tolerar a acidez do solo e altos teores de alumínio trocável, demonstrando potencial de uso na recuperação de áreas degradadas, corroborando Lorenzi (2002).

#### **2.4. Importância econômica**

Da produção mundial, cerca de 50 % da rutina, quercetina e ramnose são extraídas da fava-d'anta. Segundo Gomes (1998), os principais produtores foram, em 1996, o Maranhão (30%), Piauí (28%), Minas Gerais (23%), Ceará (6%), Bahia (4%), Mato Grosso e Goiás (3% cada). Os maiores importadores foram Bélgica, Alemanha, Japão e Estados Unidos da América. O valor médio de exportação anual de rutina/rutesídeo, no período de 1992 a 1996, foi de US\$12 milhões para as indústrias. Em dados mais recentes, a rutina e a quercetina estão entre os dez produtos farmacológicos mais exportados pelo Brasil. Somente no ano de 2008, as exportações geraram US\$ 6,2 milhões FOB (*free on board*), estando a rutina em quarto lugar no *ranking* dos produtos farmacológicos mais exportados ([www.abiquif.org.br](http://www.abiquif.org.br)).

Três empresas são responsáveis por toda a exportação de rutina no Brasil. São elas, a nacional Sanrisil, em Goiás, exportadora exclusiva para a França; a nacional Produtos Vegetais SA (PVP), no Piauí; e a multinacional Merck no Maranhão (ABIQUIM, 2010).

Madeira (2003) relata uma melhoria de renda dos trabalhadores que coletavam a fava-d'anta em 10 vezes em Minas Gerais. O quilo do fruto era vendido a R\$0,05 até 2003 e, a partir deste ano, alcançou R\$ 0,45. A exploração da fava-d'anta pela indústria farmacêutica tem ocasionado um extrativismo predatório em alta escala, sendo necessárias medidas para a conservação da espécie, que pode ser extinta em longo prazo (Mendes et al., 2005).

## 2.5. Germoplasma

O termo “recurso genético” data de 1970, quando Frankel e Bennett editaram o livro *Genetic Resources in Plants: Their Exploitation and Conservation*. A expressão é usada para denotar a informação genética presente em plantas e animais dos quais o homem depende para sobreviver, e envolve dois aspectos. O primeiro deles refere-se à diversidade de espécies e o segundo relaciona-se à diversidade dentro das espécies, necessária para uso contínuo (Holsinger, 2003).

A diversidade genética pode ser definida como a faixa da variação existente para uma determinada espécie (Allard, 1971), representando a distância genética entre populações ou indivíduos, e baseia-se na análise de características morfoagronômicas (qualitativas e quantitativas), citológicas, bioquímicas, do polimorfismo de DNA e fisiológicas, dentre outras (Nass, 2007). Outro conceito preconizado por Falconer (1987) define a diversidade genética como a diferença existente nas frequências alélicas das populações.

A caracterização de germoplasma visa a conhecer as potencialidades dos mesmos, identificando assim a variabilidade entre e dentre as populações, tornando-se ferramenta indispensável à pesquisa da variabilidade genética (Bastos et al., 1999). A caracterização refere-se à descrição e registro de características morfológicas, citogenéticas, bioquímicas e moleculares dos acessos, as quais são pouco influenciadas pelo ambiente em sua expressão (Giacometti, 1988; Valls, 2007).

Os marcadores moleculares são considerados ferramentas de grande importância para a caracterização de germoplasma, já que são úteis para localizar e caracterizar a diversidade genética, para proporcionar a construção de coleções nucleares, na identificação de duplicatas entre os acessos, e na localização de

acessos com base nas informações disponíveis eletronicamente. Os diferentes tipos de marcadores moleculares têm uma ampla capacidade de amostragem do genoma, sendo muito interessantes para a avaliação da diversidade genética, tanto para aplicações filogenéticas e evolutivas, quanto para fins práticos em programas de melhoramento e na manutenção de bancos de germoplasma. Os genótipos são avaliados por meio dos marcadores e as bandas comuns a todos os indivíduos são interpretadas como semelhanças genéticas, e as não comuns, como diferenças genéticas. Os resultados são codificados de forma que gerem uma matriz de similaridade (ou dissimilaridade), que pode ser graficamente interpretada por meio de análise de agrupamento (Hawtin et al., 1996; Lanza et al., 2000).

Para estudos de divergência genética, a técnica de análise multivariada (componentes principais, variáveis canônicas e métodos de aglomeração) tem sido empregada tanto para as características expressas por variáveis quantitativas quanto qualitativas, as quais são comumente utilizadas em caracterizações e avaliações de germoplasma. O critério utilizado para a escolha do método multivariado depende do tipo dos dados, da análise a ser realizada e da precisão requerida (Cruz e Carneiro, 2008).

Um dos métodos mais utilizados para construção de árvores filogenéticas é o algoritmo de "Neighbor Joining". Este é aplicado para reconstrução de árvores sem raiz a partir de uma matriz de distâncias e de acordo com o princípio da evolução mínima (*minimum evolution*). Para tanto, supõe-se que a aditividade da matriz de distâncias seja tomada como argumento. Além da proposição de uma topologia para a árvore sem raiz, o método também fornece o comprimento dos ramos da árvore resultante, usando o critério de Fitch-Margoliash. A eficiência deste método é superior a muitos outros métodos, tais como o UPGMA (*unweighted pair group method of analysis*), método de Farris, método de Li, e o método Farris, modificado por Tateno et al. (Saitou e Nei, 1987).

## **2.6. Marcadores de DNA e seu uso na caracterização de germoplasma**

Segundo Milach (1998), os marcadores são particularidades do DNA, herdadas geneticamente, que diferenciam dois ou mais indivíduos. Já, Ferreira e Grattapaglia (1998) citam que marcador molecular é qualquer fenótipo molecular

oriundo de um gene expresso, como, por exemplo, a isoenzima, ou de um segmento específico de DNA (correlacionado a regiões expressas ou não do genoma).

O panorama do uso de marcadores genéticos em larga escala teve início no cenário científico nas décadas de 60 e 70, com o desenvolvimento de marcadores, tais como, isoenzimas, proteínas totais e proteínas específicas, que são de certa forma, indicadores diretos da variação existente dentro do DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Com o advento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a manipulação do DNA, que culminou no surgimento dos vários tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente. Dentre os principais tipos, podem ser citados: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que se caracteriza por ser uma técnica de fácil execução de custo reduzido e aplicável a qualquer tipo de organismo; RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que se destaca por permitir uma análise mais detalhada da ação gênica e da interação de alelos em estudos de mapeamento de características quantitativas; microssatélites SSR (*Simple Sequence Repeat*), técnica de fácil execução, já que uma vez obtidos os iniciadores, pode ser amplamente automatizada pelo fato de se basear em PCR (*Polimerase Chain Reaction*); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), que se apresenta como a classe de marcadores com um grande poder de detecção de variabilidade genética, uma vez que a técnica explora polimorfismos de restrição e de amplificação. É importante salientar que a escolha da técnica a ser utilizada depende do objetivo do trabalho a ser realizado, dos recursos disponíveis para a sua execução e da espécie a ser estudada (Araújo, 2002).

Os estudos com marcadores moleculares trazem contribuições significativas para a compreensão da diversidade genética (Spooner et al., 2005). O benefício principal de usar marcadores moleculares é que estes são bons indicadores da distância genética entre acessos, devido à sua neutralidade seletiva.

### **2.6.1. Marcadores Moleculares – RAPD**

Com o surgimento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em meados da década de 80, houve um grande desenvolvimento de técnicas moleculares. Porém, havia necessidade de conhecimento prévio sobre a sequência de nucleotídeos da espécie a ser estudada, o que limitava sua aplicação (Lacerda et al., 2002).

No início da década de 90, simultaneamente, três grupos independentes desenvolveram técnicas de amplificação de DNA utilizando iniciadores (*primers*) pequenos e de sequência arbitrária, permitindo uma ampla aplicação a diversas espécies. Contudo, a técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), descrita por Williams et al. (1990), tornou-se a mais popular (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Segundo Caixeta et al. (2006), as vantagens da técnica de RAPD são: simplicidade, rapidez na obtenção de dados, custo baixo comparado com o de outras técnicas moleculares, necessidade de pouca quantidade de DNA para análise (10 a 25 ng), aplicabilidade imediata a qualquer tipo de organismo, e não utilizar a marcação radioativa.

Dois fatores limitantes da técnica são alvos de críticas e de estudos para minimizá-las. São estes, a baixa reprodutibilidade e a característica dominante da técnica (Freitas e Bered, 2003). As principais causas para baixa reprodutibilidade são alterações nas concentrações de cloreto de magnésio, DNA genômico, iniciador e *Taq polimerase*, que causam o aparecimento de bandas consideradas artefatuais, e a competição entre os sítios de ligação dos iniciadores por substrato e reagentes. Assim, visando a minimizar o aparecimento dessas bandas artefatuais, sugere-se que seja feita uma avaliação prévia dos iniciadores mais adequados, das concentrações ótimas dos reagentes e do programa PCR (Caixeta et al., 2006).

Quanto à característica dominante, criticada por Freitas e Bered (2003), afeta diretamente a análise estatística. Contudo, pesquisadores têm trabalhado para otimizar a obtenção de dados a partir desta técnica. Alguns baseiam suas análises na premissa de que as populações estudadas estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, porém, nem sempre isso é observado. Outros utilizam a AMOVA (*Analysis of molecular variance*), adaptada por Stewart e Excoffier (1996), que não parte do princípio que as populações estejam em equilíbrio. Esta análise tem sido muito empregada com dados de RAPD na determinação da diversidade

genética e estrutura genética de populações. Também podem ser obtidos alguns índices da estatística F, de Wright (1951), e sua significância, além do índice de Shannon, que mede a variação genética intrapopulacional em analogia à heterozigotidade esperada. O programa MLDT, desenvolvido por Kermit Ritland, é utilizado para estimar a taxa de fecundação cruzada (t) e o coeficiente de endogamia (F) a partir dos marcadores dominantes, inclusive RAPD (Lacerda et al., 2002).

Lacerda et al. (2002) fizeram uma revisão da técnica RAPD, em estudos de conservação de plantas, e concluíram ser esta técnica especialmente indicada para trabalhos com espécies desconhecidas geneticamente, raras ou ameaçadas de extinção, uma vez que utilizam iniciadores pequenos e de sequência aleatória, demandam pequena quantidade de material para análise e são relativamente rápidos.

Faleiro et al. (2003) avaliaram metodologia para operacionalizar a extração de DNA de 10 espécies nativas do cerrado e observaram que a metodologia empregada foi eficiente. Apenas o DNA de fava-d'anta apresentou relação  $A_{260}/A_{280}$  menor que 1,5, indicando presença de maior teor de proteínas nas amostras de DNA, não inviabilizando, porém, a obtenção de padrões nítidos e reprodutíveis de produtos de amplificação via PCR.

Oliveira et al. (2008) caracterizaram 44 indivíduos de fava-d'anta, por meio de marcadores RAPD, oriundos de sete localidades do norte de Minas Gerais. Os autores observaram que o grau de polimorfismo foi baixo, indicando que as populações trabalhadas são constituídas por genótipos próximos. A análise de variância molecular (AMOVA) indicou que 10,3% e 89,7% da variação genética foram distribuídas entre e dentro das populações, respectivamente.

## **2.7. Conservação de germoplasma**

A conservação da diversidade genética é fundamental, principalmente em espécies ameaçadas de extinção, como as espécies *D. mollis* e *D. wilsonii*. Existem várias formas de conservação, dentre estas, a conservação *in situ*, que permite a continuidade da evolução, não só da espécie em questão, mas de todo o bioma em que está inserida. Porém, corre riscos de erosão devido às ações da natureza e do homem.

Outra forma de conservação é *ex situ*, que consiste na conservação fora do local de ocorrência. Para tanto, são organizados bancos de germoplasma, na forma de sementes, plantas cultivadas *in vitro*, entre outros. Os bancos trabalham com populações finitas e, para que tal amostragem tenha sucesso absoluto, o ideal é que, na amostra, houvesse a mesma frequência alélica da população total. Como estatisticamente tal acontecimento é pouco provável, estima-se que toda amostragem feita para bancos de germoplasma tenha certo efeito de deriva ou fragmentação populacional (Walter e Cavalcanti, 2005).

Um banco de germoplasma pode sofrer consequências ligadas à adaptabilidade provenientes de endogamia e exogamia, ocorridas nas multiplicações antes ou depois da criação do banco (Pertoldi et al., 2007).

Apesar de todos os entraves para a manutenção de um banco de germoplasma que represente bem as populações originais, esta é uma forma alternativa que permite, além de conservar, conhecer a variabilidade fenotípica e genotípica existente e introduzir germoplasmas em programas de melhoramento.

Dentre os métodos de conservação *ex situ*, o método *in vitro* vem sendo cada vez mais utilizado. Isto porque demanda área relativamente pequena em relação à conservação no campo e não sofre com intempéries da natureza. Entretanto, no âmbito da evolução, podem ocorrer apenas variações somaclonais, sem a seleção natural. Uma vantagem, principalmente para espécies raras ou em extinção, é a manutenção de genomas tal como encontrados na natureza (Nass, 2001).

Apesar de a semente de fava-d'anta ser ortodoxa, existe uma dificuldade na germinação, uma vez que, além da dormência tegumentar, possui um baixo índice de germinação e elevada taxa de mortalidade pós-germinação. Giuliano et al. (2005) identificaram fungos em sementes de fava-d'anta e observaram que todas as sementes germinadas e contaminadas morreram. Assim, a conservação *in vitro* pode ser uma alternativa.

Na literatura, foram encontrados apenas dois relatos de cultivo *in vitro* de fava-d'anta. No primeiro, os autores testaram meios de cultura para a micropropagação de fava-d'anta. Os tecidos utilizados foram cotilédones e hipocótilos. O meio mais apropriado para enraizamento foi o meio MS (Murashige e Skoog), suplementado com 1 mg/L de BAP (6-benzilaminopurina). O tecido que melhor respondeu foi o cotilédone (Pereira et al., 2001). E, no segundo relato, o

objetivo foi estudar a produção de flavonoides em cultura de células de *D. mollis*. As análises revelaram que, na cultura de células, houve a produção de flavonoides, exceto de rutina, que é o flavonoide de maior interesse (Lourenço et al., 2001).

### 3. TRABALHOS

## COLETA, CARACTERIZAÇÃO E DIVERGÊNCIA FENOTÍPICA DE FRUTOS DE FAVA-D'ANTA

### RESUMO

A fava-d'anta (*Dimorphandra* spp.) é uma planta medicinal com alto valor comercial, sendo responsável por 50% da produção mundial de rutina. O extrativismo, a falta de proteção de habitats e a propensão a incêndios constituem os fatores de maior risco de erosão genética deste gênero. O presente estudo foi realizado com o objetivo de coletar, caracterizar e estimar a divergência fenotípica entre acessos de *Dimorphandra* spp., provenientes de diferentes localidades do Brasil. Frutos no estágio maduro foram coletados de 21 acessos, totalizando 84 árvores em localidades dos estados de Minas Gerais, Maranhão e Tocantins. Os frutos foram caracterizados com base nos seguintes descritores: massa fresca média do fruto e da semente, em g; comprimento e diâmetro do fruto, em mm; comprimento, diâmetro, espessura da semente, em mm; cor da semente; número de sementes viáveis e inviáveis, por fruto; e teor de boro no mesocarpo e endocarpo. Os dados foram analisados em uma matriz de distância Euclidiana Média Padronizada e o agrupamento por meio do algoritmo de *Neighbor Joining*. Detectou-se variabilidade fenotípica entre os acessos estudados. A formação dos grupos foi concordante com a região de coleta e a espécie, e o acesso de *D. wilsonii* Rizz. foi o mais divergente entre as espécies trabalhadas. O número de plantas amostradas foi suficiente para caracterizar e estudar a divergência fenotípica dos acessos trabalhados. Contudo, para a conservação do

germoplasma, são necessárias mais coletas nas respectivas áreas para aumentar o número efetivo populacional e garantir, com maior precisão, a ocorrência mínima de erosão genética.

Palavras-chave: *Dimorphandra spp*; *faveiro*; *Neighbor Joining*; *tamanho efetivo*.

## ABSTRACT

### **Collecting, characterizing and determining phenotypic divergence of *fava-d'anta* fruits**

The *fava-d'anta* (*Dimorphandra* spp.) is a medicinal plant with high commercial value, accounting for 50% of world production of rutin. The extractivism along with the lack of habitats protection and occurrence of fires are important factors that contribute to increase the genetic erosion risk of this genus. This study aimed to collect, to characterize and to estimate the phenotypic divergence among accessions of *Dimorphandra* spp. from different regions of Brazil. Fruits at mature stage were collected from 21 populations, totaling 84 trees in cities of Minas Gerais, Maranhão and Tocantins states. The following descriptors were used to characterize the collected fruits: mean fruit fresh weight (g); mean seed fresh weight (g); fruit length and diameter (mm); length, diameter and thickness of seed (mm); seed color; number of viable and unviable seeds per fruit, and boron content in mesocarp and endocarp. The data were analyzed using a standardized average Euclidian distance matrix. The accessions were clustered based on Neighbor Joining algorithm. Phenotypic variability among accessions was detected. The clustering of the accessions was consistent with geographic region of the collection and the species were perfectly separated in different groups. The *D. wilsonii* Rizz. population was the most divergent considering the three studied species. The number of plants sampled was efficient to characterize and to study the phenotypic divergence of the populations. However, for germplasm conservation, more expeditions to collect samples are needed to increase the effective population number and to ensure an adequate accuracy to assure the occurrence of minimal genetic erosion.

**Keywords:** *Dimorphandra spp*; *faveiro*; *Neighbor Joining*; effective population size.

Conservar a biodiversidade é primordial quando se trata de plantas que sofrem extrativismo. Pois, um dos principais fatores que levam uma espécie a extinção é o extrativismo sem preocupação com a conservação. A exploração de plantas de uso medicinal da flora nativa tem levado a redução drástica das populações naturais de inúmeras espécies, colocando em risco a flora medicinal (Castro *et al.*, 2001).

A demanda por plantas medicinais nativas do Brasil tende a aumentar com as descobertas de substâncias que não podem ser obtidas sinteticamente. Esse é o caso da fava-d'anta (*Dimorphandra* spp.), cujos frutos possuem alto teor dos flavonoides, rutina e quercetina, além de ramnose, utilizados em grande escala pela indústria farmacêutica. Desses compostos, a rutina é o mais importante, tendo como propriedades a atividade vitamínica P, que auxilia na diminuição da permeabilidade dos glóbulos vermelhos, protegendo a vitamina C contra a oxidação e normaliza a resistência e a permeabilidade das paredes dos vasos capilares (Mendes *et al.*, 2005). Outra atividade atribuída à fava-d'anta trata-se da sua ação anti-inflamatória, podendo também ser usada como agente terapêutico no tratamento de doenças que envolvem radicais livres (Filho *et al.*, 2001). As sementes possuem um alto teor de galactomanano com potencial para ser utilizado em indústria alimentícia como substituto da goma guar (Panegassi *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2009).

Dentre as espécies desse gênero, *D. mollis* Benth. é a de maior importância medicinal, seguida por *D. gardneriana* Tul. e, potencialmente, pela *D. wilsonii* Rizz. Esta última é endêmica do Brasil, mais especificamente do estado de Minas Gerais. Até 2007, havia relato de apenas onze indivíduos adultos e seis jovens (Fernandes *et al.*, 2007). Com trabalhos contínuos de prospecção, houve um acréscimo de quase 400% de indivíduos até meados de 2009, atingindo aproximadamente 50 indivíduos (Souza *et al.*, 2009).

Segundo Souza e Martins (2004), o extrativismo, a falta de proteção de habitats e a propensão a incêndios constituem os fatores de maior risco de erosão genética da espécie *D. mollis* Benth. no norte de Minas Gerais. Com base nestes dados, a conservação dessas espécies em Unidades de Conservação e bancos de germoplasma torna-se de fundamental importância para manutenção da variabilidade genética. O manejo de banco de germoplasma envolve diferentes etapas sequenciais que permitem a correta identificação, conhecimento, conservação e utilização do germoplasma (Ramos *et al.*, 2007). As etapas compreendem a aquisição do germoplasma, ou seja, coleta ou introdução; regeneração; caracterização e avaliação; conservação e documentação; e uso: pré-melhoramento e coleção nuclear.

Na coleta, é necessário observar o sistema reprodutivo da espécie, o status do acesso (domesticado ou silvestre), a área de coleta, a técnica de coleta, além de estratégias de amostragens de acordo com a genética de populações. Outro fator primordial é a solicitação para obtenção das devidas autorizações. Para tanto, o primeiro passo é entrar na página eletrônica do Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade - ICMBio e se cadastrar no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, e seguir as resoluções e normas deste.

A caracterização e a avaliação contribuem para um maior conhecimento dos acessos do banco de germoplasma, permitindo inferir sobre a variabilidade da coleção e sobre potenciais usos agronômicos, e em programas de melhoramento genético. O *Bioversity International* disponibiliza via internet diversas listas de descritores para caracterização e avaliação de germoplasma. Entretanto, não há lista para o gênero *Dimorphandra*, e, desta forma, cabe ao pesquisador definir os descritores a serem estudados. Geralmente, os descritores preferidos pelos pesquisadores são aqueles mais importantes para serem utilizados em programas de recursos genéticos e melhoramento de plantas, além de serem úteis para identificação botânica. Este trabalho teve por objetivos coletar, caracterizar e estimar a divergência fenotípica entre acessos de *Dimorphandra* spp., coletados em diferentes localidades do Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coletas

Foram realizadas coletas no norte de Minas Gerais com o apoio do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais - ICA-UFMG (Figura 1). Foi utilizado receptor GPS (*Global Positioning System*) para coleta de dados como latitude, longitude e altitude, além da localização de áreas já trabalhadas pela equipe do ICA-UFMG. Após identificação das áreas, a procura foi pelas árvores (acesso), uma vez que o objetivo era coletar entre cinco a dez frutos maduros por árvore, em cinco a dez árvores por acesso, o que totalizaria entre 25 a 100 frutos por acesso. Os frutos foram escolhidos por estarem no estágio maturo, aparentemente com sementes saudáveis, colhidos por planta e identificados. As plantas matrizes foram também identificadas.

Treze frutos de *D. wilsonii* foram doados pela Flona de Paraopeba (Floresta Nacional de Paraopeba) em Minas Gerais, os quais foram utilizados neste trabalho. Os frutos de *D. gardneriana* foram coletados pelo Sr. José Sebastião de Paula Sena - Fazenda

da Merck em Barra do Corda, no Maranhão, totalizando dois acessos, um nativo e outro de plantas cultivadas na fazenda.

No Parque Estadual do Lajeado em Palmas, TO, foram coletados três acessos de *Dimorphandra* sp. A autorização para coleta no Parque foi concedida pela Fundação Natureza do Tocantins - Naturatins, órgão responsável pelas autorizações de coleta em Unidades de Conservação do Estado do Tocantins (Processo nº 1612-2009).

Para coletas em campo aberto, que correspondem a áreas de extrativismo, obteve-se uma autorização do ICMBio, por meio de inscrição no SISBIO (sob o número 19829-1), tendo como titular Cláudia Pombo Sudré.

Embora o sistema de reprodução destas espécies ainda não esteja seguramente determinado, alguns autores indicam que a alogamia deve ser a forma reprodutiva predominante (Abreu *et al.*, 2002; Gonçalves, 2007). Apesar disto, optou-se por coletar amostras mesmo quando havia apenas um indivíduo, utilizando-se dois critérios. O primeiro critério foi utilizar uma localidade diferente das outras onde já haviam sido realizadas coletas. Apesar de estudos demonstrarem que, para várias espécies de plantas alógamas, a variância entre populações é menor que a variância dentro de populações, existe o fator evolução, que, de acordo com o ambiente e mudanças genotípicas, pode originar germoplasma com características importantes para o *pool* gênico trabalhado. O segundo critério foi buscar forte ação antrópica na área de coleta, o que poderia acarretar a extinção desta única planta, sem deixar descendentes. Caracterizar e, principalmente, conservar esse germoplasma, mesmo de forma parcial, tornaram-se importantes aspectos deste trabalho. Apesar de mais da metade dos acessos terem sido coletados seguindo uma proposta de se considerar um tamanho mínimo de coleta, esse germoplasma foi também amostrado e analisado, sendo considerados representantes de acessos nas análises, para as quais se utilizou a distância Euclidiana Média Padronizada, uma vez que esta não necessita de repetições.

### **Caracterização dos frutos**

Os frutos coletados ou doados foram caracterizados para as seguintes variáveis: massa fresca média do fruto e da semente, em g; comprimento e diâmetro do fruto, em mm; comprimento, diâmetro, espessura da semente, em mm; cor da semente por meio de uma escala de notas a partir da carta de cores de Munsell, variando entre um e cinco, sendo a nota 1 equivalente à cor bege clara; e 5, à cor marrom avermelhado escuro; número de sementes viáveis e inviáveis (mal formadas; doentes), por fruto. Considerando-se que, nos

pátios das indústrias que extraem os produtos e subprodutos de frutos de *Dimorphandra* spp., há um acúmulo de matéria orgânica (aproveitam-se apenas 10%, e os 90% restantes são resíduos industriais (Gomes, 1998), que têm potencial para serem utilizados como compostos, e, dentre os micronutrientes passíveis de serem detectados, encontra-se o boro, determinou-se o teor de boro, no pericarpo e no mesocarpo, dos frutos coletados.

A determinação do teor de boro foi realizada dividindo-se os frutos em duas partes, em função da cor e consistência de cada segmento: pericarpo + mesocarpo (coloração marrom escuro e consistência macia) e endocarpo (coloração amarela e consistência rígida). Antes da análise, as sementes de todos os frutos foram retiradas. Para análise, foi realizado um *bulk* de cinco frutos por acesso, com as partes devidamente separadas. As amostras foram trituradas em moinho, em seguida, secas em mufla a 550°C e analisadas segundo o método da Azometina-H (Malavolta *et al.*, 1997) no setor de nutrição mineral do Laboratório de Fitotecnia da UENF. O teor de boro foi expresso em  $\text{mg.kg}^{-1}$ .

### **Análise estatística**

O número efetivo populacional sem e com controle gamético, para os acessos de *Dimorphandra* spp., foi obtido utilizando-se as fórmulas sugeridas por Vencovsky (1987), respectivamente:

$$Ne = n / [(n - 1) / 4F] + 1 \text{ (sem controle gamético) e}$$

$$Ne = n / [(n / 4F) + 3 / 4] \text{ (com controle gamético), em que:}$$

$Ne$  = número efetivo populacional;

$n$  = número de sementes colhidas; e

$F$  = número de plantas

Para fins de análise estatística multivariada, foi obtida a matriz de dissimilaridade por meio da Distância Euclidiana Média Padronizada, uma vez que os dados obtidos por acesso foram transformados em apenas um número, que correspondeu à média. A obtenção do dendrograma foi realizada por meio do algoritmo *Neighbor Joining* (Nj) (Saitou e Nei, 1987), que permitiu uma melhor visualização dos grupos que os métodos UPGMA, WARD e vizinho mais próximo. Os programas utilizados foram Excel, Genes (Cruz, 2006) e Mega 4 (Tamura *et al.*, 2007).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Coletas**

Foram coletados 21 acessos em 13 municípios dos estados de Minas Gerais, dois no Maranhão e um no Tocantins (Tabela 1).

O número mínimo de plantas desejado por acesso foi parcialmente alcançado, pois houve área com apenas um indivíduo isolado, localizado à margem de uma lavoura de eucalipto, tal como na localidade de Bocaiúva, e áreas com poucos indivíduos, que previamente tinham sido trabalhadas pela equipe do ICA/UFMG, com número suficiente de indivíduos, porém, ao chegar ao local, encontraram-se plantas cortadas e/ou poucos indivíduos com frutos no ponto de maturação desejado (Tabela 2).

Para preservação de plantas alógamas, deve-se considerar o tamanho efetivo populacional na coleta, que mede a representatividade genética contida numa amostra em relação à geração imediatamente anterior (Vencovsky, 1987; Vencovsky *et al.*, 2007). Ao simular uma população com frequência de alelo muito baixa ( $P = 0,01$ ), Vencovsky (1987) conclui que seria necessário alcançar um  $N_e$  acima de 150 para garantir a conservação sem deriva genética. Contudo, cabe ao coletor definir, no momento da coleta, se as estratégias para alcançar tal representatividade são cabíveis, de acordo com os fatores tempo e magnitude de sua tarefa e do rigor que ele pode adotar na amostragem. Os valores encontrados de número efetivo são baixos, considerando-se o alto rigor de amostragem, porém, para estudos de diversidade genética, estes números são suficientes (Namkoong e Koshi, 2001).

Outra estratégia, durante a coleta, para maximizar a representatividade da população é o controle gamético (Vencovsky, 1987). Nas coletas realizadas, o número de frutos por planta foi de aproximadamente dez unidades, porém, como muitos frutos eram totalmente indeiscentes, não foi possível conhecer o estado das sementes no momento da coleta e, ao chegar ao laboratório, foi observado um número baixo de sementes aparentemente saudáveis e, às vezes, nenhuma semente por vagem. Assim, a opção foi armazenar o máximo de sementes encontradas em embalagens individualizadas por planta, para melhor representatividade e conservação do germoplasma.

### **Caracterização e avaliação de sementes e frutos**

O acesso de *D. wilsonii* obteve valores máximos para: comprimento, diâmetro e massa média do fruto; comprimento, diâmetro e massa média da semente; e número de sementes inviáveis por fruto, sendo esta espécie bem discrepante em relação aos demais acessos das espécies estudadas (Tabela 3). Os valores de comprimento, diâmetro e espessura de *D. wilsonii*, foram concordantes com os encontrados por Lopes e Matheus

(2008) e Freitas *et al.* (2009), cujos valores médios para estas características foram 17,9; 6,7 e 4,3 mm; e 15,5 a 17,5; 3,25 a 3,56; e 1,08 a 1,16 cm, respectivamente. Os acessos Tocantins III, Pirapora e Bocaiúva tiveram os menores valores para as características citadas acima, sendo o primeiro de espécie não identificada e os dois últimos pertencentes à espécie *D. mollis* Benth.

Quanto à cor da semente, os acessos de Lontra e Japonvar, municípios vizinhos, tiveram as sementes com as menores notas (nota 1), de coloração bege claro; e os acessos I e III, do Tocantins, Bocaiúva, *D. wilsonii* e Maranhão, tiveram as sementes mais escuras, ou seja, marrom avermelhado bem escuro. Segundo Dôres (2007), quanto mais escura a semente de *Dimorphandra*, maior o teor de lignina, logo, maior dormência tegumentar, uma vez que a lignina é componente estrutural das paredes celulares. Assim, provavelmente, as sementes mais claras germinam em menos tempo que as mais escuras. Baldoni *et al.* (2002) estudaram o controle genético de alguns caracteres relacionados à cor de sementes de feijão e constataram um gene controlando a cor bege clara ou escura. Para o gênero *Dimorphandra*, não foram encontrados trabalhos relativos ao controle genético da cor da semente.

O número de sementes viáveis e inviáveis por fruto teve uma grande amplitude e variou entre 2 e 18, e 0 e 12, respectivamente. Os acessos do CAA e Tocantins III obtiveram frutos com maior número de sementes viáveis, enquanto *D. wilsonii* teve o menor número. Os acessos de Coração de Jesus e Mirabela não tiveram nenhuma semente inviável, já *D. wilsonii* teve o maior número de sementes inviáveis por fruto. Todas as sementes da localidade São Romão, MG, foram inviáveis, sendo este acesso descartado do trabalho. Assim, sementes inviáveis constituem um fator altamente influenciado pelo ambiente, não devendo ser utilizado como caráter de identificação, porém são informações importantes como referenciais para planejamentos futuros (Ferreira *et al.*, 2001). Além disso, as condições fisiológicas, tais como, idade da planta e do fruto, colheita na árvore ou no chão, são fatores que contribuem para o número de sementes viáveis.

Para o teor de boro, as médias variaram entre 5,39 e 22,40 mg.kg<sup>-1</sup>, valores considerados baixos quando se consideram os teores de boro em folhas de dicotiledôneas, que variam entre 20 e 70mg.kg<sup>-1</sup> (Kirkby e Römheld, 2007). Especificamente em *D. mollis* Benth., Costa *et al.* (2007) encontraram valores entre 47,5 e 481,5 mg.kg<sup>-1</sup>, para teor de boro em folhas, sendo o menor valor observado para plantas que não receberam nenhuma aplicação de nutrientes, apenas calagem. Dados do teor de boro em frutos de faveiro não

foram encontrados na literatura. Entretanto, espera-se que, em frutos, o teor de boro seja inferior àquele verificado para as folhas, já que o elemento é pouco móvel na planta.

As maiores médias para teor de boro no pericarpo + mesocarpo foram encontradas nos acessos das localidades de Riacho Fundo, Mirabela, Olhos d'Água, CAA (Montes Claros) e Brasília de Minas, todas no norte de Minas Gerais. As médias mais baixas foram observadas nos acessos do Maranhão, Tocantins III, *D. wilsonii* e de Uberlândia. Para o endocarpo, as maiores médias foram obtidas dos acessos de CAA (Montes Claros) e Brasília de Minas, e as menores, nos acessos de Tocantins III, *D. wilsonii*, Maranhão e Patrocínio.

Os frutos com maior teor de boro, independentemente da parte do fruto analisada, foram os provenientes dos acessos CAA e Brasília de Minas, e os frutos com menor teor foram os amostrados nos acessos Tocantins III e Maranhão, além dos frutos de *D. wilsonii*.

Em um levantamento ecogeográfico de *D. mollis*, realizado no norte de Minas Gerais, no qual foram utilizadas 31 populações, totalizando 275 indivíduos, os autores observaram correlações não significativas entre atributos físicos e químicos dos solos, características morfológicas dos frutos e teor de flavonoides entre os genótipos trabalhados (Souza *et al.*, 2008).

### **Divergência fenotípica entre e dentro das espécies**

As espécies foram separadas em seis grupos (Figura 2). *D. wilsonii* foi a mais discrepante e isolada das demais; *D. gardneriana* também ficou isolada em um grupo distinto; três grupos foram constituídos por acessos pertencentes a *D. mollis*; e outro pelos acessos coletados no Tocantins, as quais provavelmente devem pertencer a uma espécie distinta das citadas, ou a um ecotipo, uma vez que estão em uma Unidade de Conservação, distando dos demais locais de coleta no mínimo 800 km. Outra hipótese a ser considerada é que os descritores de fruto, utilizados neste trabalho, não foram suficientes para agrupar este acesso no grupo da espécie correspondente.

A formação dos grupos foi concordante com a origem geográfica dos acessos. Os acessos do Alto Paranaíba (MG), do norte de MG e do Tocantins ficaram isoladas em um grupo. Os acessos de *D. gardneriana*, provenientes de Barra do Corda (MA), ficaram no mesmo grupo dos acessos recebidos como *D. mollis*, coletados nos municípios de Chapadinha (MA) e Uberlândia (MG). Contudo, o mesmo ocorreu em análise quando os mesmos acessos foram caracterizados por meio de marcadores moleculares, sugerindo que esses dois acessos pertençam à espécie *D. gardneriana*, informação referendada pelo

pesquisador responsável pela área de coleta do material (Fernandes, 2009, informação pessoal). O único acesso de *D. wilsonii* ficou bem distante dos demais, o que pode ser de fato verificado em função da discrepância observada nos caracteres estudados. Seus frutos e, conseqüentemente, as sementes são bem maiores em comprimento, largura e espessura que os dos demais acessos trabalhados, além de ter sementes bem escuras, obtendo notas máximas (cinco) (Figura 2).

De acordo com os dados obtidos, pode-se concluir que o número de plantas amostradas foi eficiente para caracterizar e estudar a divergência fenotípica dos acessos trabalhados, uma vez que houve agrupamento das espécies. Contudo, para conservação *ex situ*, são necessárias mais coletas nas áreas amostradas para garantir, com maior precisão, o mínimo de erosão genética. Os descritores utilizados foram eficientes na discriminação das espécies. Há variabilidade fenotípica entre e dentro dos acessos estudados. O acesso de *D. wilsonii* é o mais divergente entre as espécies trabalhadas. A formação dos grupos com base em descritores de fruto é concordante com a origem geográfica e a espécie.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos agrônomos, Cecílio Fróes Caldeira Júnior, Denílson de Oliveira Guilherme, José Sebastião de Paula Sena, Maria da Cruz Chaves Lima Moura e Saulo Guilherme da Silva, por terem realizado e/ou apoiado as coletas dos frutos de *Dimorphandra* spp. E especialmente ao professor Pedro Henrique Monerat e ao técnico José Acácio por terem cedido o laboratório de nutrição mineral para análise do teor de boro nos frutos.

## REFERÊNCIAS

- BALDONI AB; TEIXEIRA FF; SANTOS JB. 2002. Controle genético de alguns caracteres relacionados à cor da semente de feijão no cruzamento Rosinha X Esal 693. *Acta Scientiarum. Agronomy* 24: 1427-1431.
- BANDEL, G. (1974) Chromosome numbers and evolution in the Leguminosae. *Caryologia*, 27:17-32.
- CASTRO HG; FERREIRA FA; SILVA DJH. 2001. *Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabolismo secundário*. Viçosa: UFV. 104p.

- COSTA CA; ALVES DS; FERNANDES LA; MARTINS ER; SOUZA IGB; SAMPAIO RA; LOPES PSN. 2007. Nutrição mineral da fava-d'anta. *Horticultura Brasileira* 25: 24-28.
- CUNHA PLR; VIEIRA IGP; ARRIAGA AMC; PAULA RCM; FEITOSA JPA. 2009. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. *Food hydrocolloids*. 23: 880-885.
- DÔRES RGR. 2007. *Análise morfológica e fitoquímica da fava-d'anta* (*Dimorphandra mollis* Benth.). Viçosa: UFV. 375p (Tese de doutorado).
- FERNANDES FM; FONSECA AG; KAECHHELE K; GOULART MF; MARINHO W; SOUZA HAV; QUEIROZ AR; GIORNI V; OLIVEIRA G; RODRIGUES MJ; BACELAR M; LOVATO MB. 2007. Tentando evitar mais uma extinção: o caso do "Faveiro de Wilson" (*Dimorphandra wilsonii* Rizzini). *Matéria* 3: 87-98.
- FERREIRA RA; BOTELHO SA; DAVIDE AC; MALAVASI MM. 2001. Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de *Dimorphandra mollis* Benth. - faveira (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Revista Brasileira Botânica* 24: 303-309.
- FREITAS VLO; ALVES THS; LOPES RMF; LEMOS FILHO JP. 2009. Biometria de frutos e sementes e germinação de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth. e *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (Fabaceae – Caesalpinioideae) *Scientia Forestalis* 37: 027-035.
- FILHO DW; SILVA EL; BOVERIS A. 2001. *Flavonóides, antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas*. In: Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. São Paulo: Universitária. p. 317.
- GOMES LJ. 1998. *Extrativismo e comercialização de fava-d'anta* (*Dimorphandra sp*): um estudo de caso na região de cerrado de Minas Gerais. Lavras: UFLA, 158p.
- KIRKBY EA; RÖMHELD V. 2007. Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. *Informações agronômicas* 118: 1-24.
- LOPES JC; MATHEUS MT. 2008. Caracterização morfológica de sementes, plântulas e da germinação de *Dimorphandra wilsonii* Rizz. - faveiro-de-Wilson (fabaceae-caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Sementes* 30: 96-101.
- MALAVOLTA E; VITTI GC; OLIVEIRA AS. 1997. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. Piracicaba: POTAFOS, 319p.

- MENDES ADR. 2005. Produção de biomassa e flavonóides totais por fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) sob diferentes níveis de fósforo em solução nutritiva. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 7: 7-11.
- NAMKOONG G e KOSHI MP. 2001. Application of genetic markers to forest tree species. [www.biovertyinternational.org](http://www.biovertyinternational.org).
- PANEGASSI VR; SERRA GE; BUCKERIDGE MS. 2000. Potencial tecnológico do galactomanano de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis*) para uso na indústria de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 20: 1-28.
- RAMOS SRR, QUEIROZ MA, PEREIRA TNS. 2007. Recursos Genéticos Vegetais: Manejo e uso. *Magistra* 19: 265-272.
- SANTOS EAM, MENDES ADR, QUEIROZ JMR, MARTINS ER. 2004. Influência da época de colheita, procedimento de secagem e parte do fruto no teor de flavonóides em fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 7: 1-5.
- SAITOU N; NEI M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- SISBIO. 2009. <http://www.icmbio.gov.br/sisbio/> Disponível em 02 de novembro de 2009.
- SOUZA GA, MARTINS ER. 2004. Análise de risco de erosão genética de populações de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) no Norte de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Plantas mediciniais* 6: 42-47.
- SOUZA GA, QUEIROZ JMR, ANJOS OF, SANTOS EAM, MARTINS ER, FERNANDES LA, COSTA CA. 2008. Levantamento ecogeográfico de *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae) no Norte de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Plantas mediciniais* 10: 51-62.
- SOUZA HAV; RIBEIRO RA; FERNANDES FM; LOVATO MB. 2009. Estrutura genética espacial do faveiro de Wilson (*Dimorphandra wilsonii* - Leguminosae), espécie criticamente ameaçada de extinção, e estratégias para sua conservação e manejo. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética.
- TAMURA K; DUDLEY J; NEI M; KUMAR S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

VENCOVSKY R. 1987. Tamanho Efetivo Populacional na Coleta e Preservação de Germoplasmas de Espécies Alógamas. *IPEF* 35: 79-84.

Tabela 1. Locais de coleta, com respectivas regiões, dados georreferenciados e espécies de *Dimorphandra* spp.  
 Table 1. Collection sites, with their regions, geo-referenced data and species *Dimorphandra* spp.

Código	Localidade	Região/Estado	Latitude	Longitude	Altitude	Provável espécie
BOC	Bocaiúva	Norte/MG	S17°10'	W43°43'	799 m	<i>D. mollis</i> Benth.
BRM	Brasília de Minas	Norte/MG	S16°10'	W44°29'	810m	<i>D. mollis</i> Benth.
CAA	Centro de Agricultura Alternativa, Montes Claros	Norte/MG	S16°25'	W44°02'	845 m	<i>D. mollis</i> Benth.
CAC	Cachoeira	Norte/MG	S17°26'	W43°37'	657 m	<i>D. mollis</i> Benth.
COJ	Coração de Jesus	Norte/MG	S16°51'	W44°09'	738m	<i>D. mollis</i> Benth.
DGC	Barra do Corda	Central/MA	S05° 30'	W45°14'	83m	<i>D. gardneriana</i> Tul.
DGN	Barra do Corda	Central/MA	S05° 30'	W45°14'	83m	<i>D. gardneriana</i> Tul.
DWF	Paraopeba	Metropolitana/MG	S19° 16'	W44°24'	733 m	<i>D. wilsonii</i> Rizz.
JAP	Japonvar	Norte/MG	S16°02'	W44°14'	798 m	<i>D. mollis</i> Benth.
JEQ	Jequitaiá	Norte/MG	S17°13'	W44°29'	559 m	<i>D. mollis</i> Benth.
LON	Lontra	Norte/MG	S15°50'	W44°17'	843 m	<i>D. mollis</i> Benth.
MAR	Chapadinha	Nordeste/MA	S03° 44'	W43° 21'	105 m	<i>D. gardneriana</i> Tul.
MIR	Mirabela	Norte/MG	S16°16'	W44°09'	792 m	<i>D. mollis</i> Benth.
OLD	Olhos d'Água	Norte/MG	S17°26'	W43°37'	780 m	<i>D. mollis</i> Benth.
PAT	Patrocínio	Alto do Parnaíba/MG	S18° 56'	W46°59'	965 m	<i>D. mollis</i> Benth.
PIR	Pirapora	Norte/MG	S17° 20'	W44°56'	489 m	<i>D. mollis</i> Benth.
RIF	Riacho Fundo, Claros dos Poções	Norte/MG	S 16°57'	W44°16'	730 m	<i>D. mollis</i> Benth.
TOI	Palmas	TO	S10° 00'	W48°15'	625 m	<i>Dimorphandra</i> sp.
TOII	Palmas	TO	S10° 00'	W48°15'	625 m	<i>Dimorphandra</i> sp.
TOIII	Palmas	TO	S10° 00'	W48°15'	625 m	<i>Dimorphandra</i> sp.
UBE	Uberlândia	Triângulo Mineiro/MG	S18° 55'	W48° 16'	863 m	<i>D. gardneriana</i> Tul.

Tabela 2. Números efetivos ( $N_e$ ) inerentes às amostras coletadas sem e com controle gamético de *Dimorphandra* spp. em 21 localidades do Brasil.

Table 2. Effective numbers ( $N_e$ ) attached to the samples with and without control gametes *Dimorphandra* spp. in 21 locals in Brazil.

Acessos	Nº de Plantas	Nº de Sementes	$N_e$ sem controle gamético	$N_e$ com controle gamético
BOC	1	62	3,82	3,82
BRM	8	357	29,44	29,98
CAA	10	485	37,02	37,67
CAC	6	152	20,85	21,46
COJ	6	269	22,11	22,49
DGC	5	678	19,45	19,57
DGN	5	618	19,40	19,53
DWS	1	110	3,89	3,89
JAP	5	171	18,00	18,39
JEQ	4	109	14,06	14,41
LON	5	190	18,18	18,54
MAR	1	266	3,96	3,96
MIR	4	162	14,64	14,90
OLD	5	144	17,67	18,11
PAT	1	48	3,76	3,76
PIR	1	6	2,67	2,67
RIF	9	516	33,71	34,21
TO I	2	93	7,44	7,52
TO II	3	188	11,34	11,45
TO III	1	230	3,95	3,95
UBE	1	54	3,79	3,79
Total	84	5.526		

<sup>1/</sup>BOC= Bocaiúva; BRM= Brasília de Minas; CAA= Centro de Agricultura Alternativa, Montes Claros; CAC= Cachoeira; COJ= Coração de Jesus; DGC= *D. gardneriana* cultivada; DGN= *D. gardneriana* nativa; DWS= *D. wilsonii* semente; JAP= Japonvar; JEQ= Jequitaiá; LON= Lontra; MAR= Maranhão; MIR= Mirabela; OLD= Olhos d'Água; PAT= Patrocínio; PIR= Pirapora; RIF= Riacho Fundo, Claros dos Poções; TOI= Palmas; TOII= Palmas; TOIII= Palmas; e UBE= Uberlândia).

Tabela 3. Caracterização de frutos de 21 acessos de *Dimorphandra* spp., com base em 12 descritores quantitativos.  
Table 3. Fruit characterization of 21 populations of *Dimorphandra* spp. based on 12 quantitative descriptors.

Acesso	MMF <sup>1/</sup>	COM	DIA	CSE	DSE	ESE	COR	SVF	SIF	BPE	BME	MMS
Bocaiúva	16,24	104,90	25,91	12,04	5,71	4,17	4,00	4,27	5,64	13,75	8,45	0,23
Brasília de Minas	25,4	122,11	28,31	11,65	5,51	3,88	2,75	13,50	0,21	19,71	20,58	0,24
Centro de Agricultura Alternativo	11,47	127,62	29,34	11,31	5,12	3,64	3,00	17,64	0,75	20,23	22,40	0,16
Cachoeira	31,00	128,27	31,47	11,71	5,18	3,25	3,33	10,50	1,61	18,60	17,10	0,18
Coração de Jesus	18,36	115,39	26,57	11,81	5,27	3,94	3,00	14,44	0,00	17,52	16,66	0,22
<i>D. gardneriana</i> cultivada	20,84	142,91	30,54	11,70	5,40	3,82	2,80	12,50	4,92	7,8	12,50	0,23
<i>D. gardneriana</i> nativa	30,07	140,77	29,43	12,19	5,24	3,86	3,80	11,84	5,60	12,1	12,90	0,22
<i>D. wilsonii</i>	44,02	180,22	36,36	15,89	6,86	3,72	4,00	2,00	11,86	8,57	7,44	0,34
Japonvar	16,56	133,22	32,64	12,29	5,84	3,55	1,80	10,45	0,25	18,57	9,28	0,18
Jequitaiá	21,86	126,84	33,71	12,67	5,39	3,63	3,00	5,26	1,14	16,81	9,35	0,21
Lontra	12,61	130,43	28,01	11,33	5,57	3,57	1,00	5,90	8,22	16,20	11,92	0,26
Maranhão	25,91	139,32	28,27	11,57	5,53	3,66	4,00	15,66	0,24	7,68	8,67	0,23
Mirabela	19,02	122,58	28,06	10,92	5,31	3,85	3,00	11,12	0,00	21,43	15,77	0,22
Olhos d'Água	29,14	113,71	28,04	10,95	5,77	3,69	3,40	5,24	7,78	20,83	16,52	0,20
Patrocínio	35,19	156,47	32,89	11,07	6,64	4,50	2,00	9,60	6,60	15,81	8,68	0,25
Pirapora	11,17	111,92	26,68	10,97	5,92	3,82	2,00	2,80	3,80	12,34	9,79	0,20
Riacho Fundo	24,01	133,79	30,86	12,49	5,36	3,60	3,56	14,03	1,57	21,61	11,01	0,22
Tocantins I	12,67	133,63	25,83	10,43	4,81	3,60	4,00	9,60	0,79	11,42	16,00	0,14
Tocantins II	16,99	109,56	28,08	11,50	4,83	3,51	3,67	7,35	6,38	11,43	11,22	0,16
Tocantins III	14,60	123,02	24,37	10,37	4,45	3,67	5,00	16,07	1,27	8,23	5,39	0,17
Uberlândia	24,84	144,33	33,18	11,61	5,00	3,58	3,00	10,60	5,60	8,64	10,06	0,25
Máximo	44,02	180,22	36,36	15,89	6,86	4,50	5,00	17,64	11,86	21,61	22,40	0,34
Mínimo	11,17	104,90	24,37	10,37	4,45	3,25	1,00	2,00	0,00	7,68	5,39	0,14
Média	22,13	131,57	29,70	11,86	5,47	3,75	3,10	10,00	3,66	14,73	12,46	0,22

<sup>1/</sup>MMF= massa média por fruto; COM= comprimento do fruto; DIA= diâmetro do fruto; CSE= comprimento da semente; DSE= diâmetro da semente; ESSE= espessura da semente; COR= cor da semente; SVF= sementes viáveis por fruto; SIF= sementes inviáveis por fruto; BPE= teor de boro no pericarpo; BME= teor de boro no mesocarpo; MMS= massa média da semente.

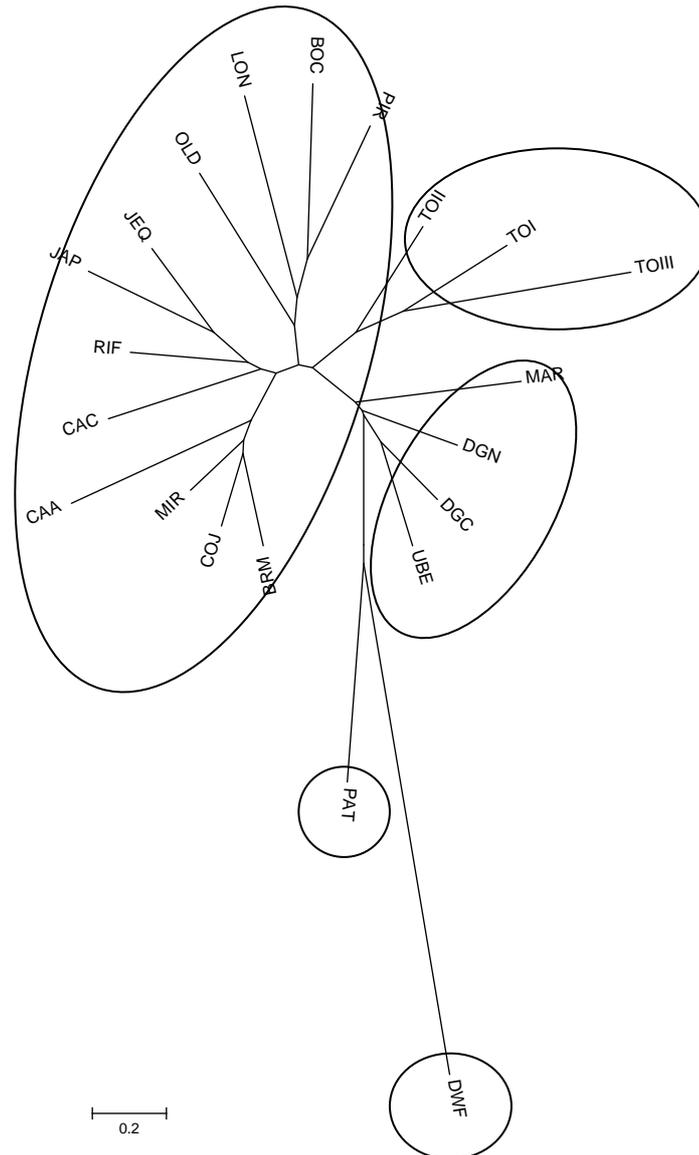


Figura 1. Dendrograma obtido pelo método Neighbor Joining, utilizando a distância Euclidiana Média Padronizada entre 21 acessos de *Dimorphandra* spp. com base em 12 características quantitativas. (BOC= Bocaiúva; BRM= Brasília de Minas; CAA= Centro de Agricultura Alternativa, Montes Claros; CAC= Cachoeira; COJ= Coração de Jesus; DGC= Barra do Corda; DGN= Barra do Corda; DWF= *D. wilsonii*; JAP= Japonvar; JEQ= Jequitaiá; LON= Lontra; MAR= Chapadinha; MIR= Mirabela; OLD= Olhos d'Água; PAT= Patrocínio; PIR= Pirapora; RIF= Riacho Fundo, Claros dos Poções; TOI= Palmas; TOII= Palmas; TOIII= Palmas; UBE= Uberlândia).

Figure 1. Dendrogram obtained by the Neighbor Joining method, using the standardized mean Euclidean distance among 21 accessions of *Dimorphandra* spp. based on 12 quantitative traits. (BOC= Bocaiúva; BRM= Brasília de Minas; CAA= Centro de Agricultura Alternativa, Montes Claros; CAC= Cachoeira; COJ= Coração de Jesus; DGC= Barra do Corda; DGN= Barra do Corda; DWF= *D. wilsonii*; JAP= Japonvar; JEQ= Jequitaiá; LON= Lontra; MAR= Chapadinha; MIR= Mirabela; OLD= Olhos d'Água; PAT= Patrocínio; PIR= Pirapora; RIF= Riacho Fundo, Claros dos Poções; TOI= Palmas; TOII= Palmas; TOIII= Palmas; UBE= Uberlândia).



Figura 2. Frutos de *Dimorphandra* spp. (fava-d'anta) coletados no norte de Minas Gerais.  
 Figure 2. Fruits *Dimorphandra* spp. (tapir fruit) collected in Northern Minas Gerais.

IMPLANTAÇÃO DE COLEÇÃO *EX SITU* DE GERMOPLASMA, ESTUDO PRELIMINAR DE DESCRITORES MÍNIMOS PARA *Dimorphandra* spp. E QUANTIFICAÇÃO DA DIVERGÊNCIA GENÉTICA ENTRE ACESSOS DE FAVA-D'ANTA

**RESUMO**

As espécies de *Dimorphandra* necessitam de ações para conservação da variabilidade genética. Dentre as formas recomendadas estão a conservação *ex situ*, por meio de coleções de germoplasma no campo, via armazenamento de sementes em câmaras apropriadas, e o cultivo *in vitro*. Este trabalho teve como objetivos: implantar uma coleção *ex situ* de germoplasma das espécies *D. mollis* Benth., *D. gardneriana* Tul. e *D. wilsonii* Rizz., por meio de manutenção de indivíduos no campo e via sementes; estabelecer uma lista de descritores mínimos para caracterização morfológica dos acessos; caracterizar morfológicamente os acessos em sua fase vegetativa; e estimar a divergência genética entre os acessos com base nos descritores propostos. A definição dos descritores a serem utilizados foi feita após uma consulta em literatura sobre os caracteres mais utilizados e considerados mais relevantes nos trabalhos de caracterização de germoplasma de espécies perenes, especialmente espécies arbóreas. Vinte e seis descritores foram utilizados, considerando-se três etapas de estudo. Um banco *ex situ* de germoplasma foi implantado com 123 indivíduos representando três espécies de *Dimorphandra*. Sementes desses acessos estão sendo mantidas em condições de baixa temperatura e umidade. Os descritores

propostos foram eficientes na discriminação dos acessos. Pelo método UPGMA, nas duas primeiras etapas de caracterização, cinco grupos foram formados, enquanto, na terceira, seis grupos foram observados, demonstrando a variabilidade entre os acessos.

Palavras-chave: coleção de germoplasma; planta medicinal; caracterização morfológica.

### ABSTRACT

The variability genetic conservation of *Dimorphandra* spp. is dependent on specific procedures. Among the strategies recommended are the *ex situ* conservation, with cultivation of the gene bank collection in the field along with storing seeds in appropriate chambers or even with *in vitro* cultivation. The aim of this work were: to start an *ex situ* collection of *D. mollis* Benth., *D. gardneriana* Tul., and *D. wilsonii* Rizz., with maintenance of the accessions in field conditions and with seeds storage; to establish a minimum list of descriptors to morphological characterization of the accessions; to characterize collected accessions; to estimate the genetic divergence among the accessions based on descriptors proposed. The definition of the descriptors was done after a literature search seeking for the most used and relevant traits pointed in papers about perennial species characterization. Twenty six descriptors were used in three different stages of the research. An *ex situ* gene bank was created with 123 individuals representing three *Dimorphandra* species. Seeds of these accessions are being maintained in low temperature and humidity. According to UPGMA method, in the two first steps of the characterization five clusters were formed, while in the third characterization six groups were observed, confirming the accessions variability.

Keywords: gene bank collection; medicinal plant; morphological characterization.

### INTRODUÇÃO

O gênero *Dimorphandra* possui 43 espécies listadas no IPNI (*International Plant Names Index*) e, dentre estas, as espécies *D. mollis* Benth. e *D. gardneriana* Tul. são exploradas economicamente, principalmente para a extração dos bioflavonoides, rutina e quercetina, utilizados nas indústrias farmacológicas. Toda a produção de rutina e quercetina oriundas de espécies de *Dimorphandra* é baseada no extrativismo, o que permite um acréscimo da renda familiar para populações carentes, além da proteção por parte de alguns coletores no âmbito da não derrubada dessas árvores. Por outro lado, são os frutos verdes que são coletados e vendidos para a indústria, impedindo que os indivíduos coletados deixem descendentes ao longo de sua existência.

Em estudo realizado por Bizerril et al. (2005), foi observada a ocorrência de 15 a 272 frutos por árvore, por estação reprodutiva, e os autores relataram que a produtividade foi de 95 kg por hectare, uma vez que a densidade era de 30 plantas por hectare. Assim, percebe-se quão difícil é a coleta desses frutos, e a conscientização dos coletores da necessidade de deixar frutos na planta para atingirem a maturação.

O extrativismo, como modo de exploração econômica de uma planta medicinal está, via de regra, associado ao risco de erosão genética e mesmo de extinção da espécie em questão. Além do extrativismo, outras formas podem colocar uma espécie em risco de erosão genética e algumas delas estão associadas às populações de fava-d'anta. A falta de proteção de habitats e a propensão a incêndios estão entre os fatores de maior risco (Souza e Martins, 2004). A espécie *D. wilsonii* inclusive já está criticamente em perigo de extinção. Endêmica do estado Minas Gerais, essa espécie possui menos de 50 indivíduos em sua totalidade (Fernandes et al., 2007; Souza et al., 2009).

As espécies de *Dimorphandra* necessitam de ações para conservação da variabilidade genética. Dentre as formas recomendadas, está a conservação *ex situ*, por meio de coleções de germoplasma no campo; via armazenamento de sementes em câmaras apropriadas; e cultivo *in vitro*. Além da conservação, a caracterização e avaliação fazem parte do manejo de coleções de germoplasma, potencializando o uso dos acessos (Valls, 2007).

Este trabalho teve como objetivos: implantar uma coleção *ex situ* de germoplasma das espécies *D. mollis*, *D. gardneriana* e *D. wilsonii*, por meio de manutenção de indivíduos no campo e via sementes; estabelecer uma lista de

descritores mínimos para caracterização morfológica dos acessos; caracterizar morfológicamente os acessos em sua fase vegetativa; estimar a divergência genética entre os acessos com base nos descritores propostos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os acessos utilizados para a implantação da coleção de germoplasma foram oriundos de coletas de frutos em 17 acessos de *Dimorphandra* spp. nos estados de Minas Gerais, Tocantins e Maranhão. Treze acessos foram coletados em Minas Gerais, três no Tocantins e um no Maranhão (Tabela 1). O número de plantas amostradas variou entre uma e dez por acesso, sendo a maioria do material coletado representado por pelo menos cinco indivíduos, coletando-se 10 frutos por planta.

De cada planta amostrada nas coletas, 20 sementes foram colocadas para germinar em tubetes contendo substrato organovegetal Plantmax®, em viveiro de produção de mudas do Laboratório de Fitotecnia da UENF. Estas foram previamente tratadas com fungicida Derosal e escarificadas mecanicamente com auxílio de pedra de carborundum. Após a emissão de dois pares de folhas definitivas, as mudas foram transplantadas para sacos plásticos com capacidade de 10 L e mantidas em área de convênio da UENF com a PESAGRO-RIO/Estação Experimental de Campos dos Goytacazes, RJ.

A definição dos descritores a serem utilizados foi feita após uma consulta em literatura sobre os caracteres mais utilizados e considerados mais relevantes nos trabalhos de caracterização de germoplasma de espécies perenes, especialmente espécies arbóreas (Keller, 2004). As observações de características divergentes entre as plantas, durante o decorrer do trabalho, também foi útil para a determinação dos descritores, uma vez que não há lista de descritores específica para o gênero *Dimorphandra* (*Bioversity International*, 2009).

Devido à ausência de informações específicas sobre esses descritores, e em função das observações feitas ao longo do trabalho, alguns descritores foram utilizados apenas na primeira etapa e outros apenas na terceira etapa de

caracterização, conforme indicado na Tabela 2. Vinte e seis descritores foram utilizados, considerando-se todas as etapas, e os caracteres foram os seguintes:

- 1) Porcentagem de Germinação – observada diariamente e registrada a partir do momento da emergência do hipocótilo;
- 2) Dias para germinação – número de dias até a observação de 50% das plantas emergidas;
- 3) Altura da planta – medida em cm, com auxílio de trena metálica;
- 4) Altura da 1ª inserção foliar – medida com auxílio de régua graduada;
- 5) Diâmetro da copa – medida em cm, com auxílio de trena metálica;
- 6) Diâmetro do caule – medido com auxílio de paquímetro digital na altura média entre a inserção da primeira folha e o coleto;
- 7) Comprimento do internódio – média de dois comprimentos dos intervalos entre o 3º e 4º, e entre o 4º e 5º internódios;
- 8) Número de folhas primárias – foram consideradas folhas primárias, as folhas pinadas;
- 9) Número de folhas bipinadas – contadas todas as folhas bipinadas;
- 10) Número de folíolos – média obtida do número de folíolos observados em duas folhas mais jovens, porém totalmente expandidas;
- 11) Número de foliólulos/folíolo – média obtida do número de foliólulos nos folíolos mais jovens, porém expandidos;
- 12) Pilosidade do caule – avaliada de acordo com escala de notas (1 = glabro; 3 = pouco piloso; 5 = medianamente piloso; e 7 = muito piloso) entre o terceiro e quarto nós de cima para baixo. Foi utilizado o dedo mínimo para sentir a pilosidade, uma vez que este é o mais sensível;
- 13) Pilosidade da folha – avaliada de acordo com escala de notas (1 = glabro; 3 = pouco piloso; 5 = medianamente piloso; e 7 = muito piloso). Não foram diferenciadas as partes adaxial e abaxial;
- 14) Presença de “fungo” na folha – foi avaliada a presença de pequenas pontuações amareladas com aspecto de sintoma de doença fúngica, porém não foram encontrados sinais de patógenos em amostras analisadas;
- 15) Presença de cotilédone – foi considerada a persistência do cotilédone na plântula no momento da avaliação e quantificado por meio de porcentagem;
- 16) Número de brotações – número de brotações originadas do caule principal;
- 17) Comprimento da folha – medida em cm, com auxílio de régua;

- 18) Diâmetro da folha – medida em cm, com auxílio de régua;
- 19) Comprimento do foliólolo – medida em cm, com auxílio de régua;
- 20) Diâmetro do foliólolo – medida em cm, com auxílio de régua;
- 21) Formato do foliólolo – com base em escala de notas 1= foliólolos mais alongados e com ápice obtuso; 2= oblongas com ápice arredondado; 3= oblongas com ápice com reentrância;
- 22) Ocorrência de danos nas folhas causados por formigas – porcentagem de indivíduos com folhas cortadas parcialmente à nervura central;
- 23) Cor da brotação – foram conferidas as notas 1= marrom escuro e 2= róseo;
- 24) Cor do caule – marrom acinzentado;
- 25) Comprimento da estípula – foi medido o comprimento das estípulas em folhas mais velhas que ainda as continham; e
- 26) Presença de resina no caule – quando presente recebeu a nota 1 e, quando ausente, a nota 0.

As avaliações foram realizadas em intervalos de aproximadamente cinco meses, totalizando três avaliações. Foi avaliada a divergência fenotípica, utilizando-se a distância euclidiana média padronizada e o método de agrupamento UPGMA. Os dados foram analisados utilizando o programa GENES (Cruz, 2006).

Após a terceira avaliação, cinco plantas de cada progênie foram transplantadas para local definitivo na própria área de convênio entre a UENF e a PESAGRO-RIO/Estação Experimental de Campos dos Goytacazes, RJ, onde, anteriormente, havia uma plantação de eucaliptos. As plantas foram dispostas em delineamento inteiramente casual, para possibilitar análises estatísticas em futuras avaliações.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 288 indivíduos que foram utilizados na primeira etapa de caracterização, apenas 123 permaneceram até a terceira caracterização, registrando-se uma perda de mais de 50% das plantas. Essa diminuição se deu por alguns motivos, dentre estes, podem ser citados a fragilidade das mudas quanto ao manuseio, não tolerando o mínimo de flexuosidade do caule, levando à

quebra; corte por formigas; e doenças não identificadas. Apesar de uma taxa alta de mortalidade dos indivíduos, esse resultado pode ser considerado normal em função da dificuldade de reprodução dessas espécies fora de seu habitat natural, conforme relatos do Engenheiro Agrônomo Denílson de Oliveira Guilherme (comunicação pessoal) que trabalhou com a multiplicação desta espécie no norte de Minas Gerais (Figura 4). Assim, para uma implantação de coleção de germoplasma *ex situ* de *Dimorphandra* spp., considerou-se adequado o número de 123 indivíduos.

Na primeira caracterização, com base em 13 descritores quantitativos, verificou-se a formação de cinco grupos, considerando o ponto de mudança abrupta, pelo método hierárquico UPGMA (Figura 1). Os dois acessos representantes da espécie *D. gardneriana* foram alocados nos grupos 4 e 5, juntamente com indivíduos que representavam as espécies *D. mollis*; e os três acessos, cujas espécies não puderam ser identificadas, foram tratados como *Dimorphandra* sp.

Ainda na primeira etapa de caracterização, observou-se que os acessos de *D. wilsonii* foram separados das demais espécies e agrupados em dois *clusters* (2 e 3).

Já para a segunda caracterização, na qual se utilizaram nove descritores, houve a formação do mesmo número de grupos obtidos pela primeira caracterização, embora esses descritores tenham permitido que os acessos pertencentes à espécie *D. gardneriana* ficassem alocados no mesmo grupo. Em relação às demais espécies, entretanto, não foi verificada a mesma eficiência na formação de grupos.

Por sua vez, a terceira caracterização foi a que melhor discriminou as espécies estudadas, formando seis grupos, nos quais o primeiro e segundo grupos continham somente acessos da espécie *D. gardneriana*; o terceiro grupo foi formado apenas com o acesso Tocantins III, que corresponde a uma espécie ainda não identificada de *Dimorphandra*; o quarto grupo reuniu todos os acessos de *D. mollis*; o quinto grupo reuniu os demais acessos do Tocantins (*Dimorphandra* sp.); e o sexto grupo, os dois acessos de *D. wilsonii*.

A primeira avaliação não conseguiu separar eficientemente os grupos, tendo em vista que, quanto mais novas as plântulas, maior a similaridade entre elas. Os valores médios obtidos para altura média e diâmetro médio da copa

foram, respectivamente, de 8,00 e 16,12 cm, caracterizando assim um lento crescimento inicial das espécies, o que dificultou a separação das mesmas apenas com base no fenótipo. Assim, poucos descritores foram observados nessa fase, uma vez que quatro descritores eram da fase de germinação. Além disso, embora o gênero possua dimorfismo foliar, nesta fase, devido ao pequeno tamanho das plântulas, observou-se predominantemente a presença de folhas pinadas.

A segunda avaliação ocorreu quando as plantas estavam com aproximadamente 10 meses de idade. Nesta fase, obviamente, não foram mais inseridos os descritores de germinação. A discriminação das espécies foi similar à da formação de grupos, obtida na primeira caracterização, porém, uma segunda espécie pôde ser separada das demais.

Na primeira caracterização, ficaram separados os acessos pertencentes à espécie *D. wilsonii*, enquanto, na segunda, os acessos da espécie *D. gardneriana* (Figura 2), o que demonstra certa inconsistência dos dados trabalhados. Vários fatores podem ter influenciado tais resultados, como a deficiência de discriminação dos descritores observados, a característica quantitativa desses descritores, o padrão da tomada de dados, a época de avaliação ou mesmo a pouca variabilidade entre os materiais estudados. Entretanto, deve-se levar em consideração que nem todos os descritores foram utilizados em ambas as etapas, tendo em vista não se aplicarem à época de caracterização dos acessos, como por exemplo, a porcentagem de germinação, que foi utilizada somente na primeira etapa. Deve-se também ressaltar que, a primeira etapa de tomada de dados, embora feita numa fase bastante precoce, permitiu a discriminação de pelo menos uma espécie. Já na segunda etapa, houve a possibilidade de discriminação de uma segunda espécie, de modo que, ao se considerar isoladamente cada etapa de caracterização, foi possível discriminar pelo menos duas espécies de *Dimorphandra* sp.

A formação de grupos, obtida com base na tomada de dados da terceira caracterização, foi condizente com as espécies trabalhadas. Este resultado indica que os itens a seguir contribuíram para melhoria da formação de grupos: a) diferenciação do desenvolvimento da planta como um todo; b) inserção dos descritores, comprimento e diâmetro, da folha; comprimento, diâmetro do folíolo; ocorrência de danos e formigas; comprimento das estípulas; e c) tomada de

dados mais consistente, devido a um melhor conhecimento das plantas, uma vez que, conforme o desenvolvimento das mudas, um maior aprendizado sobre a morfologia e a ontogenia das espécies era obtido. Por exemplo, a medida do comprimento do internódio que, na terceira etapa de caracterização, foi feita em dois segmentos de cada planta, nas duas primeiras caracterizações, fez-se apenas a medida de um internódio por planta. Apesar de o número médio de indivíduos por acesso ter sido aproximadamente 17, os internódios alternam, sendo ora curtos e ora longos. Assim, para a terceira avaliação com plantas mais desenvolvidas, fez-se a coleta de dois comprimentos de internódios, do terceiro ao quarto nó e do quarto ao quinto nó de cima para baixo, mostrando, dessa forma, um internódio curto e outro longo em todas as plantas.

Os coeficientes de correlações cofenéticas obtidos nos três dendrogramas referentes à divergência fenotípica foram crescentes, aumentando da primeira para a terceira avaliação, cujos valores foram, respectivamente, 0,8395; 0,8509; 0,9403. Esses valores comparam as reais distâncias obtidas entre os acessos com as distâncias representadas graficamente, sujeitas ao acúmulo de erro. Assim, o dendrograma da terceira avaliação representa melhor as distâncias originais entre os acessos.

## CONCLUSÕES

- a) Existe viabilidade na implantação de bancos de germoplasma fora do ambiente natural (bioma) das espécies do gênero *Dimorphandra*;
- b) Descritores quantitativos foram eficientes na discriminação das espécies na fase vegetativa. Entretanto, novos caracteres devem ser testados e inseridos numa possível lista de descritores para o gênero;
- c) Houve variabilidade genética entre os acessos coletados e, durante as diferentes etapas de caracterização, foram formados número de grupos diferentes; e
- d) A idade da planta influencia na eficiência da discriminação entre os acessos, e plantas com maior período de desenvolvimento fornecem resultados mais confiáveis para análise da divergência genética.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bioversity International. (2009). [www.bioversityinternational.org](http://www.bioversityinternational.org).
- Bizerril, MXA., Rodrigues, F.H.G., Hass, A. (2005) Fruit consumption and seed dispersal of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) by the lowland tapir in the Cerrado of Central Brazil. *Braz. J. Biol.*, 65: 407-413.
- Cruz, CD. (2006) *Programa Genes: análise multivariada e simulação*. Viçosa: ed. UFV. 175p.
- Fernandes, FM., Fonseca, A.G., Kaechele, K., Goulart, M.F., Marinho, W., Souza, H.A.V., Queiroz, A.R., Giorni, V., Oliveira, G., Rodrigues, M.J., Bacelar, M., Lovato, MB. (2007) Tentando evitar mais uma extinção: o caso do "Faveiro de Wilson" (*Dimorphandra wilsonii* Rizzini). *Matéria* 3: 87-98.
- Keller, R. 2004. Identification of tropical Woody plants in the absence of flowers. Germany: Birkhäuser. 294p.
- Souza, G.A., Martins, E.R. (2004) Análise de risco de erosão genética de populações de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) no Norte de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Plantas medicinais* 6: 42-47.
- Souza, HAV; Ribeiro RA; Fernandes FM; Lovato MB. (2009). Estrutura genética espacial do faveiro de Wilson (*Dimorphandra wilsonii* - Leguminosae), espécie criticamente ameaçada de extinção, e estratégias para sua conservação e manejo. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética.
- Valls, JFM. (2007). Caracterização de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L.L. (Org.). *Recursos Genéticos Vegetais*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 281-305.

Tabela 1. Locais de coleta, com respectivas regiões, dados georreferenciados e espécies de *Dimorphandra* spp.

Código	Localidade	Região/Estado	Latitude	Longitude	Altitude	Provável espécie
BOC	Bocaiúva	Norte/MG	S17°10'	W43°43'	799 m	<i>D. mollis</i> Benth.
BRM	Brasília de Minas	Norte/MG	S16°10'	W44°29'	810m	<i>D. mollis</i> Benth.
CAA	Centro de Agricultura Alternativa, Montes Claros	Norte/MG	S16°25'	W44°02'	845 m	<i>D. mollis</i> Benth.
COJ	Coração de Jesus	Norte/MG	S16°51'	W44°09'	738m	<i>D. mollis</i> Benth.
DWF	Paraopeba	Metropolitana/MG	S19° 16'	W44°24'	733 m	<i>D. wilsonii</i> Rizz.
DWS	Paraopeba	Metropolitana/MG	S19° 16'	W44°24'	733 m	<i>D. wilsonii</i> Rizz.
JAP	Japonvar	Norte/MG	S16°02'	W44°14'	798 m	<i>D. mollis</i> Benth.
JEQ	Jequitaiá	Norte/MG	S17°13'	W44°29'	559 m	<i>D. mollis</i> Benth.
MAR	Chapadinha	Nordeste/MA	S03° 44'	W43° 21'	105 m	<i>D. gardneriana</i> Tul.
MIR	Mirabela	Norte/MG	S16°16'	W44°09'	792 m	<i>D. mollis</i> Benth.
OLD	Olhos d'Água	Norte/MG	S17°26'	W43°37'	780 m	<i>D. mollis</i> Benth.
PIR	Pirapora	Norte/MG	S17° 20'	W44°56'	489 m	<i>D. mollis</i> Benth.
RIF	Riacho Fundo, Claros dos Poções	Norte/MG	S 16°57'	W44°16'	730 m	<i>D. mollis</i> Benth.
TOI	Palmas	TO	S10° 00'	W48°15'	625 m	<i>Dimorphandra</i> sp.
TOII	Palmas	TO	S10° 00'	W48°15'	625 m	<i>Dimorphandra</i> sp.
TOIII	Palmas	TO	S10° 00'	W48°15'	625 m	<i>Dimorphandra</i> sp.
UBE	Uberlândia	Triângulo Mineiro/MG	S18° 55'	W48° 16'	863 m	<i>D. gardneriana</i> Tul.

Tabela 2. Descritores utilizados nas três caracterizações morfológicas de progênies, oriundas de polinização aberta de 17 acessos de *Dimorphandra* spp., conduzidos em Campos dos Goytacazes, RJ.

Nº	Descritores /Caracterizações	1ª	2ª	3ª
1	% de Germinação	X	-	-
2	Dias para germinação	X	-	-
3	Altura da planta	X	X	X
4	Altura da 1ª inserção foliar	X	-	-
5	Diâmetro da copa	X	X	X
6	Diâmetro do caule	X	X	X
7	Comprimento do internódio	X	X	X
8	Número de folhas primárias	X	-	-
9	Número de folhas bipinadas	X	X	X
10	Número de folíolos	X	X	X
11	Número de foliólolo/folíolo	-	X	X
12	Pilosidade do caule	X	X	X
13	Pilosidade da folha	X	X	X
14	Presença de fungo na folha	X	X	X
15	Presença de cotilédone	X	X	-
16	Número de brotações	X	X	X
17	Comprimento da folha	-	-	X
18	Diâmetro da folha	-	-	X
19	Comprimento do foliólolo	-	-	X
20	Diâmetro do foliólolo	-	-	X
21	Formato do foliólolo	-	-	X
22	Ocorrência de danos, nas folhas, causados por formigas	-	-	X
23	Cor da brotação	-	-	X
24	Cor do caule	-	-	X
25	Comprimento da estípula	-	-	X
26	Presença de resina no caule	-	-	X

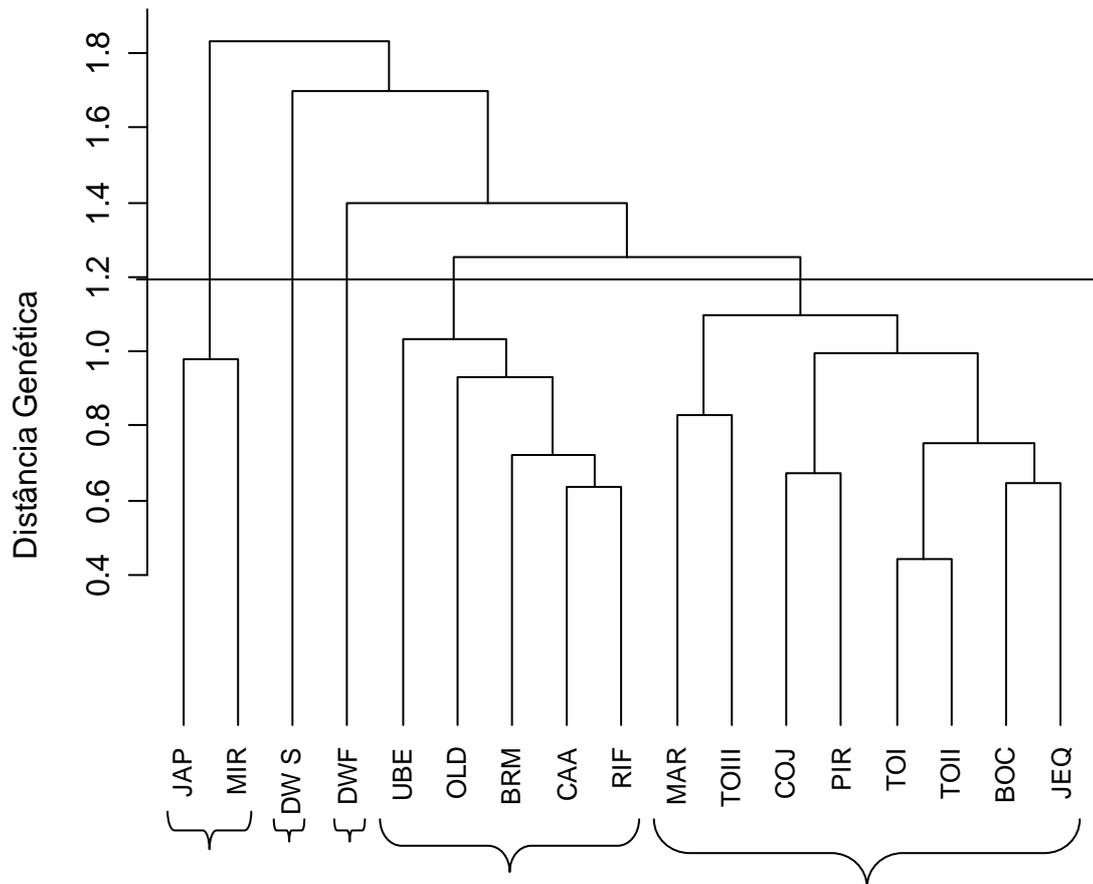


Figura1. Dendrograma obtido a partir de 13 variáveis quantitativas em relação a 17 acessos de *Dimorphandra* spp., utilizando a distância Euclidiana Média Padronizada, por meio do método UPGMA (CCC: 0,8395). Ponte de corte = 1,2. (BOC= Bocaiúva; BRM= Brasília de Minas; CAA= Centro de Agricultura Alternativa, Montes Claros; COJ= Coração de Jesus; DWF= *D. wilsonii* fruto; DWS= *D. wilsonii* semente; JAP= Japonvar; JEQ= Jequitáí; MAR= Maranhão; MIR= Mirabela; OLD= Olhos d'Água; PIR= Pirapora; RIF= Riacho Fundo, Claros dos Poções; TOI= Palmas; TOII= Palmas; TOIII= Palmas; UBE= Uberlândia).

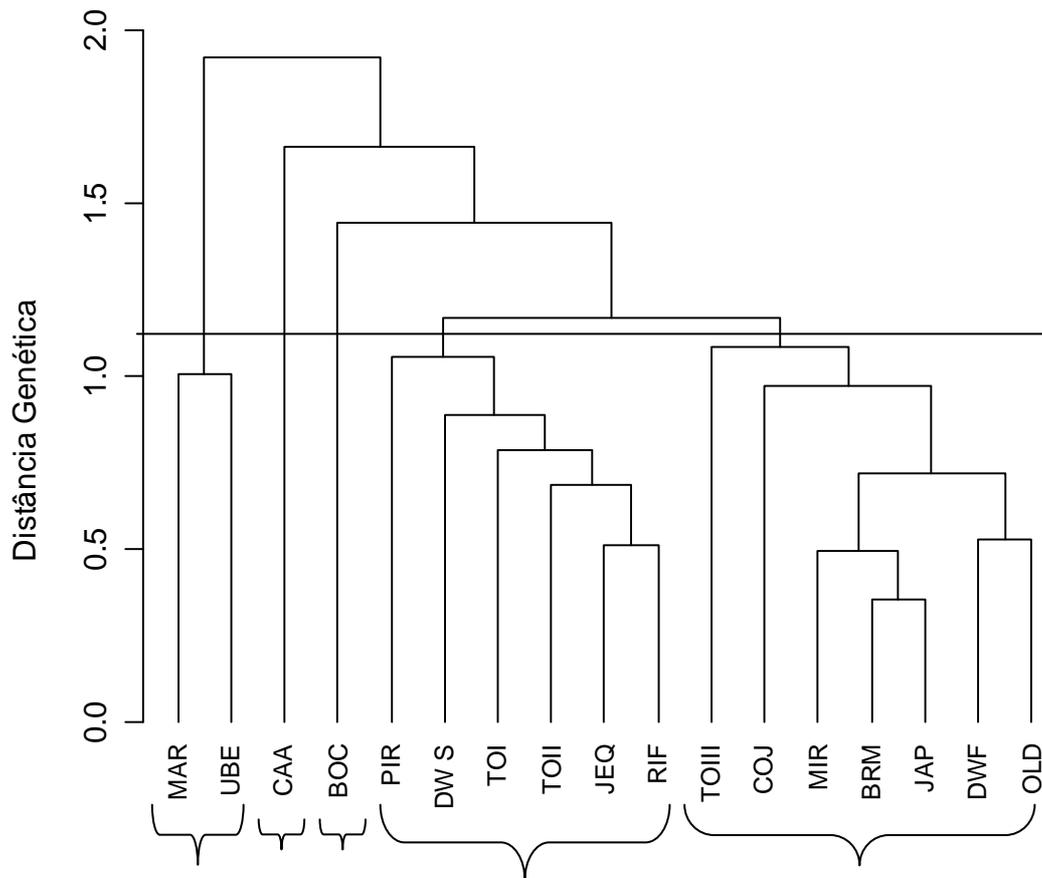


Figura 2. Dendrograma obtido a partir de nove variáveis quantitativas em relação a 17 acessos de *Dimorphandra* spp., utilizando a distância Euclidiana Média Padronizada, por meio do método UPGMA (CCC: 0,8509). (BOC= Bocaiúva; BRM= Brasília de Minas; CAA= Centro de Agricultura Alternativa, Montes Claros; COJ= Coração de Jesus; DWF= *D. wilsonii* fruto; DWS= *D. wilsonii* semente; JAP= Japonvar; JEQ= Jequitaiá; MAR= Maranhão; MIR= Mirabela; OLD= Olhos d'Água; PIR= Pirapora; RIF= Riacho Fundo, Claros dos Poções; TOI= Palmas; TOII= Palmas; TOIII= Palmas; UBE= Uberlândia).

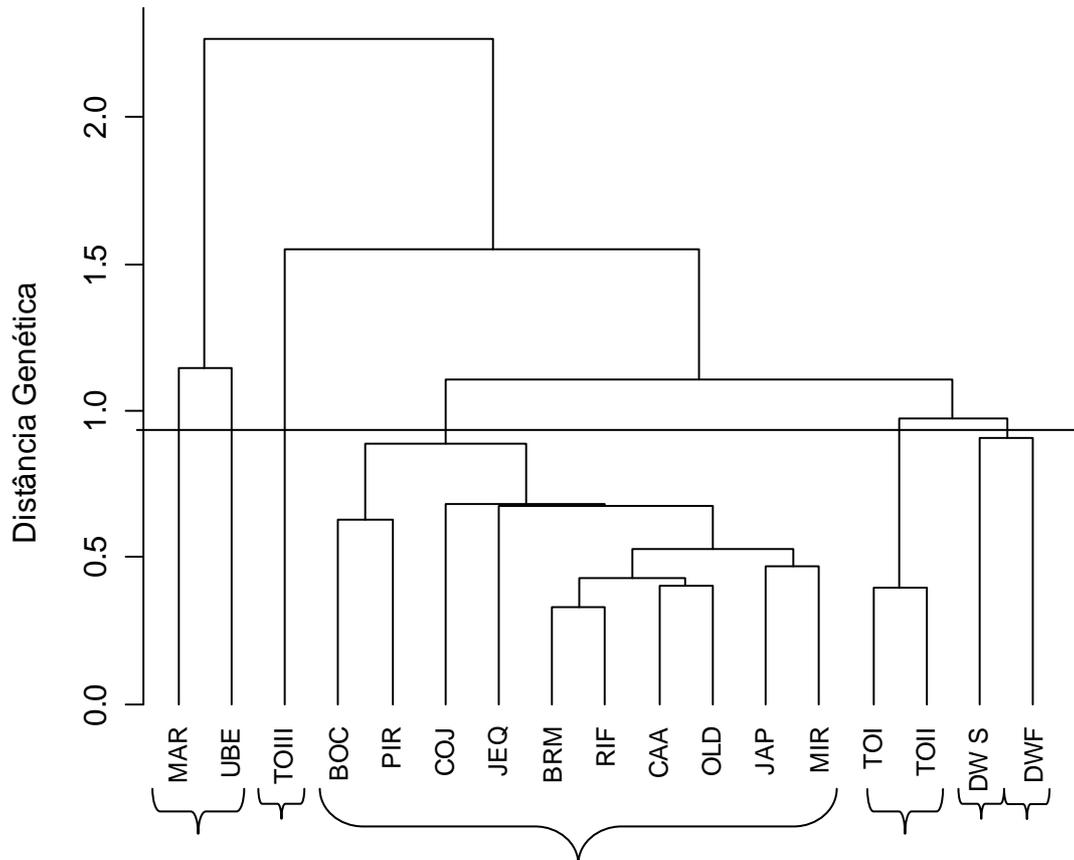


Figura 3. Dendrograma obtido a partir de 16 variáveis quantitativas em relação a 17 acessos de *Dimorphandra* spp., utilizando a distância Euclidiana Média Padronizada, por meio do método UPGMA (CCC: 0,9403). (BOC= Bocaiúva; BRM= Brasília de Minas; CAA= Centro de Agricultura Alternativa, Montes Claros; COJ= Coração de Jesus; DWF= *D. wilsonii* fruto; DWS= *D. wilsonii* semente; JAP= Japonvar; JEQ= Jequitaiá; MAR= Maranhão; MIR= Mirabela; OLD= Olhos d'Água; PIR= Pirapora; RIF= Riacho Fundo, Claros dos Poções; TOI= Palmas; TOII= Palmas; TOIII= Palmas; UBE= Uberlândia).

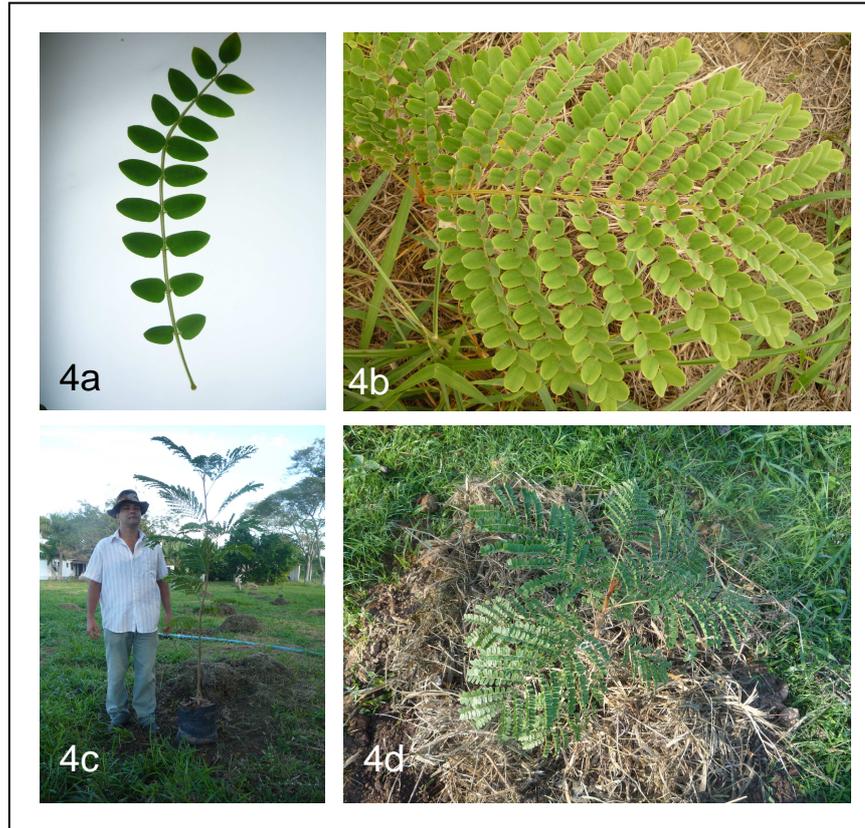


Figura 4. 4a) folíolo e foliólulos de *Dimorphandra wilsonii* Rizz.; 4b) Folha bipinada de *Dimorphandra* sp.; 4c) Transplântio das mudas para local definitivo; Muda transplantada do acesso do Tocantins III (*Dimorphandra* sp.).

## **Divergência genética entre acessos de *Dimorphandra* spp. com base em marcadores RAPD**

**Resumo:** O gênero *Dimorphandra* é importante por possuir duas espécies economicamente exploradas para extração de flavonoides pela indústria farmacológica (*D. mollis* Benth. e *D. gardneriana* Tull.); ter espécies endêmicas do Brasil, tais como, a *D. wilsonii* Rizz. e *D. jorgei* Silva, além de uma de suas espécies, a *Dimorphandra wilsonii* Rizz., estar criticamente ameaçada de extinção. Objetivando avaliar a variabilidade entre acessos de *D. mollis* Benth., *D. gardneriana* Tul. e *D. wilsonii* Rizz., oriundas de várias localidades brasileiras, foram realizadas coletas de frutos separados por planta em três estados brasileiros e os acessos coletados foram analisados por meio da técnica RAPD. Utilizaram-se vinte sementes por progênie e o DNA foi extraído de folhas definitivas jovens coletadas em *bulk*. Os dados foram analisados utilizando-se uma matriz de dados binários em que o número 1 correspondeu à presença da banda, o zero, ausência da banda. Para formação da matriz de dissimilaridade, foi utilizado o complemento aritmético do Índice de Jaccard e, posteriormente, o agrupamento pelo algoritmo de *Neighbor Joining* e Análise de Coordenadas Principais (PCoA). O estudo demonstrou que existe ampla variabilidade entre e dentro das espécies de *Dimorphandra* spp., o qual formou sete grupos. Apesar da ampla variabilidade genética constatada, as expedições de coleta demonstraram que a maioria das áreas amostradas está sujeita a perdas de recursos genéticos de fava-d'anta, devido aos seguintes fatores: ocorrência de contínua ação antrópica; propensão a incêndios naturais; diminuição dos dispersores naturais de sementes (grandes mamíferos frugívoros) influenciando na dispersão. Assim, a proteção destas áreas e a conservação *ex situ* são primordiais para manutenção da variabilidade genética dessas espécies.

**Palavras-chave:** fava-d'anta; caracterização molecular; UPGMA; recursos genéticos vegetais; germoplasma

**Abstract:** The genus *Dimorphandra* is important economically because it has two species commercially exploited for the extraction of flavonoids by pharmaceutical industry (*D. mollis* Benth. e *D. gardneriana* Tull.), having a species endemic to Brazil, such as *D. wilsonii* Rizz. and *D. jorgei* Silva, besides having one of their species, the *D. wilsonii* critically endangered. Aiming to evaluate the variability among accessions of *D. mollis*, *D. gardneriana* and *D. wilsonii* germplasm collection expeditions to collect fruits in three Brazilian states were made and the accessions collected were analyzed by RAPD. Twenty seeds per progeny were studied

and the DNA was extracted from definitive young leaves harvested in bulk. The data were analyzed using a binary matrix in which numbers 0 and 1 matched respectively with absence and presence of bands. Dissimilarity matrix was performed using Jaccard Index and clustering analysis was done with Neighbor Joining algorithm and Principal Coordinate Analysis (PCO). This study showed that there is wide variability among and within *Dimorphandra* spp. species and seven clusters were formed. However, despite of large genetic variability observed, the collection expeditions showed that most areas sampled are exposed to “fava-d’anta” genetic resources losses because of the following factors: continuous anthropic disturbance; prone to fire; diminishing of natural seeds dispersers (large frugivorous mammals). Thus, the protection of these areas and *ex situ* conservation are essential for maintenance of *Dimorphandra* spp. genetic variability.

**Keywords: fava-d’anta; molecular characterization; UPGMA; genetic resources; germplasm**

## INTRODUÇÃO

A demanda por plantas medicinais nativas do Brasil tende a aumentar com as descobertas de substâncias que ainda não podem ser obtidas sinteticamente. Esse é o caso da fava-d’anta (*Dimorphandra* spp.), cujos frutos possuem alto teor dos flavonoides rutina e quercetina, que estão entre os produtos farmacológicos mais exportados pelo Brasil, o qual é responsável por 50% da produção mundial. Somente no ano de 2008, as exportações geraram US\$ 6,2 milhões FOB (*free on board*), estando a rutina em quarto lugar no *ranking* dos produtos farmacológicos mais exportados ([www.abiquif.org.br](http://www.abiquif.org.br)).

Este gênero ocorre preferencialmente em regiões de cerrado e caatinga, abrangendo os estados do Amazonas, Bahia, São Paulo, Maranhão, Pará, Piauí, Ceará, Tocantins, Pernambuco, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. O número de espécies conhecidas no gênero é variável, existindo relatos que mencionam a ocorrência de 11 até 43 espécies do gênero *Dimorphandra* (Gonçalves, 2007; IPNI, 2009). Dentre estas, a espécie arbórea *D. mollis* Benth. é a de maior importância medicinal, seguida por *D. gardneriana* Tul. A *D. wilsonii* Rizz. é considerada também potencialmente importante.

As espécies *D. mollis* e *D. gardneriana*, exploradas comercialmente, são espécies para as quais há uma grande preocupação com a ameaça de extinção. Por meio de uma análise de risco de erosão genética em 32 populações de *D. mollis* Benth. no Norte de Minas Gerais, foi possível inferir que 40,6% das populações apresentaram risco de erosão genética maior ou igual a 40%. Dentre os principais fatores de risco que mais contribuíram destacaram-se o extrativismo, a falta de proteção de habitats e a propensão a incêndios (Souza e Martins, 2004).

Já *D. wilsonii*, espécie endêmica do estado de Minas Gerais, consta na *Red List of Threatened Plants* da IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) na categoria “criticamente em perigo”, e está atualmente com menos de 50 indivíduos adultos na natureza, localizados em áreas particulares nos municípios de Paraopeba, Pequi, Lagoa Santa e Sete Lagoas, todos no estado de Minas Gerais (Souza *et al.*, 2009).

Para propor medidas que visem à conservação de germoplasma de *Dimorphandra* spp., é necessário conhecer a estrutura genética das populações, assim como a variabilidade entre as populações. Uma das ferramentas utilizadas para este fim é o uso de marcadores moleculares que permitem inferir sobre a divergência genética entre e dentro de populações (Huang *et al.*, 2009).

Em estudos de conservação de plantas, a técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) é indicada para trabalhos com espécies desconhecidas geneticamente, raras ou ameaçadas de extinção, uma vez que são utilizados iniciadores pequenos e de seqüência aleatória, demandam pequena quantidade de material para análise e são relativamente rápidos (Lacerda *et al.*, 2002). Por se tratar de um gênero pouco estudado, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a variabilidade genética, por meio da técnica RAPD, entre os acessos de *D. mollis*, *D. gardneriana* e *D. wilsonii*, oriundas de várias localidades brasileiras.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção do material vegetal

Foram realizadas coletas de frutos das espécies, *D. mollis* Benth., *D. gardneriana* Tul. e *D. wilsonii* Rizz. em 20 localidades abrangendo três estados brasileiros: Minas Gerais, Maranhão e Tocantins (Tabela 1). Foram amostradas áreas com elevada ação antrópica, principalmente com extrativismo de frutos de fava-d'anta e áreas dentro de Unidade de Conservação (Parque Estadual do Lajeado, TO).

Coletaram-se frutos de uma a dez plantas por acesso, sendo a maioria acima de cinco plantas, em função da disponibilidade verificada no momento da coleta. De cada planta coletada, foram selecionadas 20 sementes para formação de mudas. As sementes foram extraídas, escarificadas mecanicamente, com auxílio de pedra de carborundum, e semeadas em tubetes com substrato organovegetal em casa de vegetação. Como padrão divergente, foi inserido um genótipo de *Cassia grandis* L.f., pertencente à mesma subfamília do gênero *Dimorphandra*.

Folhas em estágio juvenil foram coletadas em *bulk* por progênies provenientes de 57 plantas-mãe e do acesso de *C. grandis* L.f. Logo após a coleta, as folhas foram levadas ao laboratório e maceradas imediatamente. Parte do material macerado foi congelado em N<sub>2</sub> líquido e acondicionado em tubos de 15 mL com tampa, devidamente identificados, e armazenados em ultrafreezer a -86 °C. A outra parte foi utilizada para extração de DNA no Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF.

### Isolamento de DNA Genômico

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o método CTAB (Doyle e Doyle, 1990), modificado por Daher *et al.*, (2002). Após a extração do DNA, foi realizada a quantificação em gel de agarose 0,8%. O marcador utilizado foi o *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen®, USA). Para visualização das bandas no gel, as amostras foram coradas com uma mistura de *Blue Juice* com *Gel Red* na proporção 1:1, e a imagem foi revelada pelo sistema *MiniBis Pro*.

### Análise RAPD

Foram utilizados 20 iniciadores RAPD aleatoriamente, pois não havia referências na literatura, sobre o gênero *Dimorphandra*, para serem seguidas (Tabela 2). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador, modelo *Mastercycler gradient* (*Eppendorf*), em um volume final de 15 µL, contendo 10 ng de DNA, 10 mmol L<sup>-1</sup> Tris HCl (pH 8,3); 50 mmol L<sup>-1</sup> KCl; 2,0 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 100 µM de dNTP; 0,4µM de iniciador; e 0,75 U de Taq DNA polimerase. As reações foram submetidas a 45 ciclos de amplificação, após desnaturação inicial a 95°C por um minuto. Cada ciclo consistiu de um

minuto a 94°C; um minuto a 36°C; e dois minutos a 72°C. Ao final de 45 ciclos, foi realizada uma extensão final de sete minutos a 72°C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em géis de agarose 1,4%. Para visualização das bandas no gel, as amostras foram coradas com a mistura de *Blue Juice* com *Gel Red* na proporção 1:1, e a imagem foi revelada pelo sistema *MiniBis Pro*.

### **Análise dos Dados**

Os dados foram obtidos pela avaliação visual das bandas mais evidentes e consistentes nos indivíduos avaliados. Foi elaborada uma matriz de dados binários em que o número 1 correspondeu à presença da banda; o zero, ausência da banda; e dois; quando não foi possível determinar se a banda estava presente ou não; em função da não amplificação de um dado acesso para aquele iniciador. Para formação da matriz de dissimilaridade, foi utilizado o complemento aritmético do Índice de Jaccard e, posteriormente, o agrupamento pelo algoritmo de *Neighbor Joining* e Análise de Coordenadas Principais (PCoA) (Saitou e Nei, 1987; Gower, 1967). Todas as análises foram realizadas pelos programas DARwin 5 (Perriet *et al.*, 2003).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 20 iniciadores utilizados, quatro não amplificaram fragmentos polimórficos entre 57 acessos *Dimorphandra* spp. e um acesso de *Cassia grandis* L.f. Foram geradas 100 bandas, sendo 94 polimórficas e seis monomórficas. O número de bandas polimórficas por iniciador variou de um a 11, com média de seis bandas por iniciador. O nível de polimorfismo obtido por iniciador variou de 60 a 100% e a média de polimorfismo foi de 96%. Apenas os iniciadores OPAA11, OPAE18 e OPAE20 não obtiveram 100% de polimorfismo, demonstrando, assim, um alto polimorfismo entre os genótipos trabalhados (Tabela 2). Isto provavelmente ocorreu por se tratar de um estudo interespecífico, que favorece o polimorfismo em detrimento do monomorfismo.

O dendrograma obtido pelo algoritmo de *Neighbor Joining* permitiu separar os acessos em sete grupos distintos (Figura 1). Os acessos 58, 35, 40 e 47 foram os mais distantes, quando comparados com os demais, sendo o acesso 58 pertencente à espécie *C. grandis* L.f., cuja subfamília é Caesalpinioideae, a mesma do gênero *Dimorphandra*. Importante destacar que os acessos 35, 40 e 47, pertencentes ao gênero *Dimorphandra*, não se agruparam com nenhuma das outras espécies e, portanto, não houve uma classificação taxonômica completa para esses acessos, apenas com base nos marcadores RAPD. Percebe-se que esses acessos estão distanciados dos acessos de *D. mollis* Benth., *D. gardneriana* Tul. e *D. wilsonii* Rizz., podendo supor que pertençam a uma espécie diferente. No IPNI (*The International Plant Names Index*), estão registradas 43 espécies deste gênero, podendo haver equívoco na identificação das espécies pelo coletor.

Os acessos pertencentes à espécie *D. mollis* obtiveram uma distância média intragrupo, pelo coeficiente de Jaccard, de 0,2304 ( $\pm 0,08$ ), estando estes alocados em um mesmo grupo pelo algoritmo de *Neighbor Joining*. O mesmo foi observado para os acessos de *D. gardneriana* Tul., porém com valores de distância média intragrupo de 0,3738 ( $\pm 0,09$ ). A espécie *D. mollis* foi coletada em treze localidades de Minas Gerais, abrangendo três mesorregiões deste estado, com distância máxima de 600 km entre os locais de coleta. Por sua vez, a espécie *D. gardneriana* foi coletada em um número menor de localidades, porém, abrangendo dois estados, Maranhão e Minas Gerais. Além disso, dois acessos de *D. gardneriana*, coletados em Barra do Corda (MA), são provenientes de

diferentes áreas de manejo: uma de área cultivada e outra de uma região de ocorrência natural. O acesso 29 (Uberlândia, MG) obteve a maior distância média entre os acessos de *D. gardneriana*, que dista fisicamente mais de 2000 km das localidades do Maranhão. Como o número de relatos de *D. gardneriana* em Minas Gerais é pequeno, prospecções neste estado, visando a coletas dessa espécie, podem ser de grande valia no futuro.

Dados obtidos por Oliveira *et al.* (2008), ao trabalharem com 44 genótipos de *D. mollis* Benth., por meio de marcadores RAPD, oriundos de seis localidades do norte de Minas Gerais, indicaram que as populações são constituídas por genótipos próximos, visto terem observado um grau de polimorfismo baixo. A distância máxima entre os locais de coleta deste trabalho foi de 270 km.

Os dois acessos de *D. wilsonii*, oriundos de Paraopeba (MG), ficaram com distância de 0,3594, restritos em um mesmo grupo pelo *Neighbor Joining*. Em 2007, quando foram coletados esses dois acessos, havia registro de apenas onze plantas identificadas desta espécie, todas localizadas fora de áreas protegidas, em locais impactados pela ação antrópica (Fernandes *et al.*, 2007). Ainda assim, observa-se que há variabilidade entre os genótipos estudados.

Pela análise de coordenadas principais (PCoA), houve concordância com o agrupamento obtido pelo algoritmo de *Neighbor Joining*, demonstrando uma confiabilidade na formação de grupos.

Os resultados obtidos pelos algoritmos demonstram eficiência dos marcadores moleculares do tipo RAPD, para o estudo de diversidade genética entre os acessos de *Dimorphandra* spp. Outros trabalhos têm demonstrado a confiabilidade deste marcador em plantas alógamas, como por exemplo, o estudo realizado por Pamidiamarri *et al.* (2009), os quais avaliaram a diversidade genética interespecífica por meio de marcadores RAPD e AFLP, entre acessos do gênero *Jatropha*, predominantemente alógamas, uma vez que possuem plantas monoicas. Os autores concluíram que ambos os marcadores foram eficientes e concordantes e que podem ser empregados eficientemente para identificação de híbridos interespecíficos, seleção assistida por marcadores e manejo de recursos genéticos. Leal *et al.* (2010), estudando a eficiência do marcador RAPD e microsatélites em linhagens de milho pipoca, concluíram que ambas as técnicas fornecem informações consistentes e podem ser utilizadas para estudar a diversidade genética em milho pipoca.

Este estudo demonstra que, apesar de a maioria das áreas coletadas sofrer contínua ação antrópica, ser propensa a incêndios e deficiente na dispersão de sementes, uma vez que há uma diminuição dos dispersores naturais (grandes mamíferos frugívoros), ainda há ampla variabilidade entre e dentro das espécies de *Dimorphandra* spp. Assim, a proteção destas áreas e a conservação *ex situ* são primordiais para manutenção da variabilidade genética dessas espécies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIF, (2009) Disponível em: [www.abiquif.org.br/mercado/mercado.pdf](http://www.abiquif.org.br/mercado/mercado.pdf)

Daher RF, Pereira MG, Pereira AV, Amaral Junior AT. (2002). Genetic divergence among elephantgrass cultivars assessed by RAPD markers in composit samples. *Scientia Agricola*, 59: 623-627.

Doyle JJ; Doyle JL. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.

Fernandes FM, Fonseca AG, Kaechele K, Goulart MF; Marinho W, Souza HAV, Queiroz AR, Giorni V, Oliveira G, Rodrigues MJ, Bacelar M, Lovato MB. (2007).

- Tentando evitar mais uma extinção: o caso do "Faveiro de Wilson" (*Dimorphandra wilsonii* Rizzini). *Matéria*, 3: 87-98.
- Gonçalves AC. (2007). *Estrutura genética em populações naturais de Dimorphandra mollis Benth. (Fabaceae)*. Lavras: UFLA, 83p. Dissertação de mestrado.
- Gower, JC. (1967). Multivariate Analysis and Multidimensional Geometry. *Journal of the Royal Statistical Society. Series D (The Statistician)*, 17: 13-28.
- Huang Y, Yang M, Zhang H, Zhuang X, Wu X, Xie W. (2009). Genetic Diversity and Genetic Structure Analysis of the Natural Populations of *Lilium brownii* from Guangdong, China. *Biochem Genet*, 47:503–510.
- INPI. 2007. The International Names Plant Index. (www.inpi.org). Disponível em 12 de agosto de 2007.
- Lacerda DR, Lemos Filho JP, Acedo MDP, Lovato MB. (2002). Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathymenia foliosa* and *P. reticulata* (Mimosoidae), infred using RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution*, 235: 67-77.
- Leal AA, Mangolin CA, Amaral Júnior AT, Gonçalves LSA, Scapim CA, Mott AS, Eloi IBO, Cordovés V, Silva MFP. (2010). Efficiency of RAPD versus SSR markers in determination of genetic diversity among popcorn lines. *Genetics and Molecular Research* 9: 9-18.
- Oliveira DA, Paula MFB, Pimenta MAS, Braga RF, Ferreira MFM, Rodrigues LA. (2008). Variabilidade genética de populações de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis*) da região norte do Estado de Minas Gerais. *Rev. Árvore*, 32: 355-363.
- Pamidiamarri DVNS, Pandya N, Reddy MP, Radhakrishnan T. (2009). Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. *Mol Biol Rep*, 36: 901–907.
- Perrier X, Flori A, Bonnot F. (2003) Data analysis methods, pp 43–76 in *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*, edited by P. HAMON, M. SEGUIN, X. PERRIER and J. C. GLASZMANN. CIRAD/Science, Montpellier, France.
- Souza GA, Martins ER. (2004). Análise de risco de erosão genética de populações de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) no Norte de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Plantas medicinais*, 6: 42-47.
- Souza HAV, Ribeiro RA, Fernandes FM, Lovato MB (2009). Estrutura genética espacial do faveiro de Wilson (*Dimorphandra wilsonii* - Leguminosae), espécie criticamente ameaçada de extinção, e estratégias para sua conservação e manejo. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética.

Tabela 1. Locais de coleta, com respectivas regiões, dados georreferenciados e espécies de *Dimorphandra* spp.

Código	Localidade	Região/Estado	Latitude	Longitude	Altitude	Provável espécie
BOC	Bocaiúva	Norte/MG	S17°10'	W43°43'	799 m	<i>D. mollis</i> Benth.
BRM	Brasília de Minas	Norte/MG	S16°10'	W44°29'	810m	<i>D. mollis</i> Benth.
CAA	Centro de Agricultura Alternativa, Montes Claros	Norte/MG	S16°25'	W44°02'	845 m	<i>D. mollis</i> Benth.
CAC	Cachoeira	Norte/MG	S17°26'	W43°37'	657 m	<i>D. mollis</i> Benth.
COJ	Coração de Jesus	Norte/MG	S16°51'	W44°09'	738m	<i>D. mollis</i> Benth.
DGC	Barra do Corda	Central/MA	S05° 30'	W45°14'	83m	<i>D. gardneriana</i> Tul.
DGN	Barra do Corda	Central/MA	S05° 30'	W45°14'	83m	<i>D. gardneriana</i> Tul.
DWF	Paraopeba	MG	S19° 16'	W44°24'	733 m	<i>D. wilsonii</i> Rizz.
JAP	Japonvar	Norte/MG	S16°02'	W44°14'	798 m	<i>D. mollis</i> Benth.
JEQ	Jequitaiá	Norte/MG	S17°13'	W44°29'	559 m	<i>D. mollis</i> Benth.
LON	Lontra	Norte/MG	S15°50'	W44°17'	843 m	<i>D. mollis</i> Benth.
MAR	Chapadinha	Nordeste/MA	S03° 44'	W43° 21'	105 m	<i>D. gardneriana</i> Tul.
MIR	Mirabela	Norte/MG	S16°16'	W44°09'	792 m	<i>D. mollis</i> Benth.
OLD	Olhos d'Água	Norte/MG	S17°26'	W43°37'	780 m	<i>D. mollis</i> Benth.
PAT	Patrocínio	Alto do Parnaíba/MG	S18° 56'	W46°59'	965 m	<i>D. mollis</i> Benth.
PIR	Pirapora	Norte/MG	S17° 20'	W44°56'	489 m	<i>D. mollis</i> Benth.
RIF	Riacho Fundo, Claros dos Poções	Norte/MG	S 16°57'	W44°16'	730 m	<i>D. mollis</i> Benth.
TOI	Palmas	TO	S10° 00'	W48°15'	625 m	<i>Dimorphandra</i> sp.
TOII	Palmas	TO	S10° 00'	W48°15'	625 m	<i>Dimorphandra</i> sp.
TOIII	Palmas	TO	S10° 00'	W48°15'	625 m	<i>Dimorphandra</i> sp.
UBE	Uberlândia	Triângulo Mineiro/MG	S18° 55'	W48° 16'	863 m	<i>D. gardneriana</i> Tul.

<sup>1</sup>BOC= Bocaiúva; BRM= Brasília de Minas; CAA= Centro de Agricultura Alternativa, Montes Claros; CAC= Cachoeira; COJ= Coração de Jesus; DGC= *D. gardneriana* cultivada; DGN= *D. gardneriana* nativa; DWS= *D. wilsonii* semente; JAP= Japonvar; JEQ= Jequitaiá; LON= Lontra; MAR= Maranhão; MIR= Mirabela; OLD= Olhos d'Água; PAT= Patrocínio; PIR= Pirapora; RIF= Riacho Fundo, Claros dos Poções; TOI= Palmas; TOII= Palmas; TOIII= Palmas; e UBE= Uberlândia).

Tabela 2. Número de bandas polimórficas e monomórficas, obtidas por marcadores moleculares RAPD em 59 *bulks* de progênies, de 21 acessos de *Dimorphandra* spp., com base em 16 iniciadores.

Código do iniciador	Sequência 5' → 3'	Bandas polimórficas	Bandas monomórficas	% de marcas polimórficas
OPAA11	ACCCGACCTG	8	1	89
OPA12	TCGGCGATAG	8	0	100
OPAA16	GGAACCCACA	6	0	100
OPAA18	TGGTCCAGCC	4	0	100
OPAA19	TGAGGCGTGT	9	0	100
OPAE06	GGGGAAGACA	6	0	100
OPAE07	GTGTCAGTGG	11	0	100
OPAE09	TGCCACGAGG	1	0	100
OPAE08	CTGGCTCAGA	3	0	100
OPAE15	TGCCTGGACC	4	0	100
OPAE18	CTGGTGCTGA	3	2	60
OPAE20	TTGACCCCAG	7	1	87,5
OPAW09	ACTGGGTCGG	6	0	100
OPBO7	GGTGACGCAG	10	0	100
OPB19	ACCCCCGAAG	6	0	100
OPD19	CTGGGGACTT	4	0	100
Total	16	96	4	96

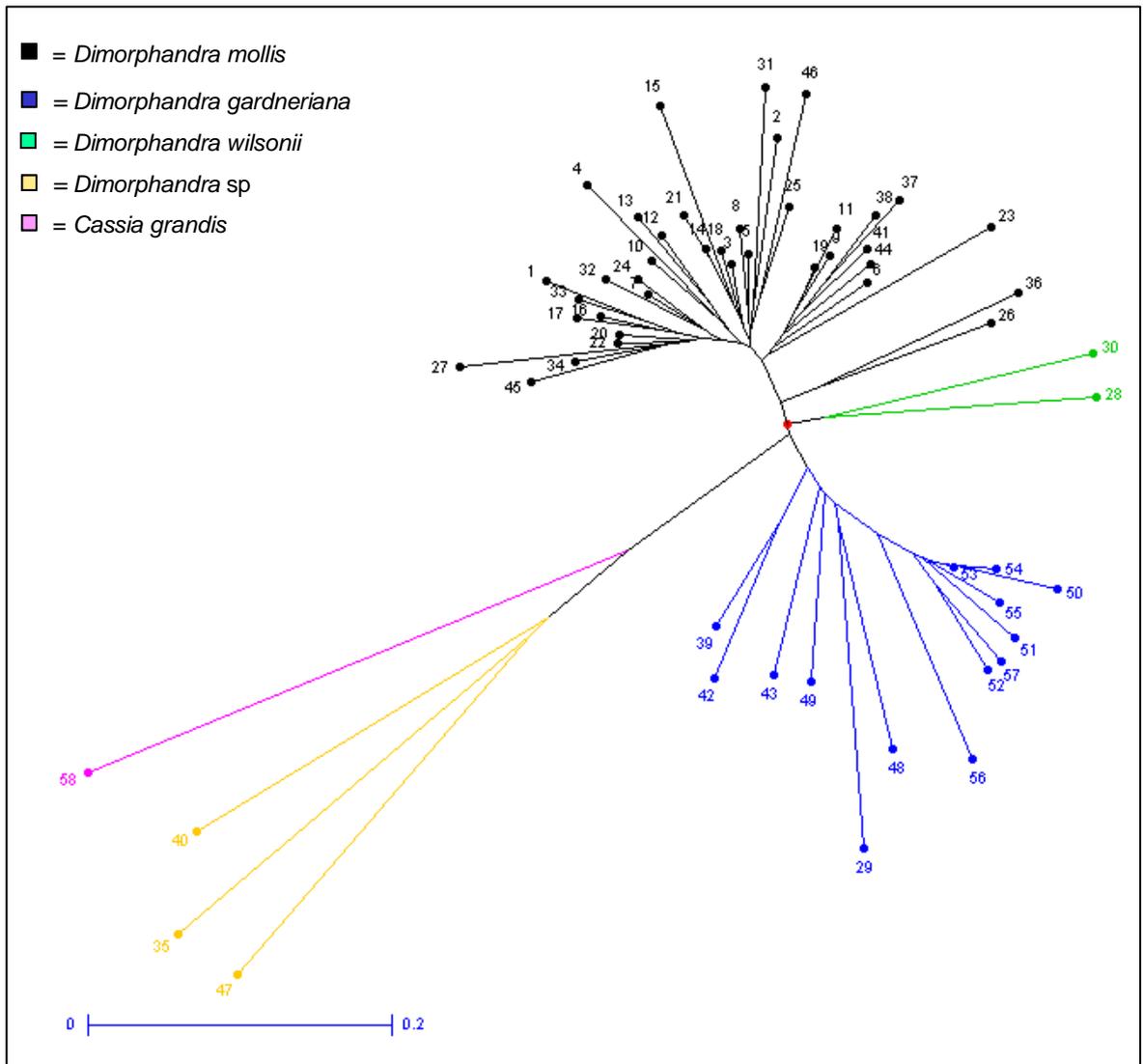


Figura 1. Dendrograma de divergência genética entre 57 progênie, oriundas de 20 acessos de *Dimorphandra* spp. e *Cassia grandis* L.f., utilizando o coeficiente de Jaccard, por meio do algoritmo de *Neighbor Joining*, com base em dados moleculares (RAPD). (*D. mollis* [1-25-27; 31-34; 36-38; 41; 44-46]; *D. gardneriana* [29; 39; 43; 48-57]; *D. wilsonii* [28; 30]; *Dimorphandra sp* [35; 40; 47]; e *Cassia grandis* [58])

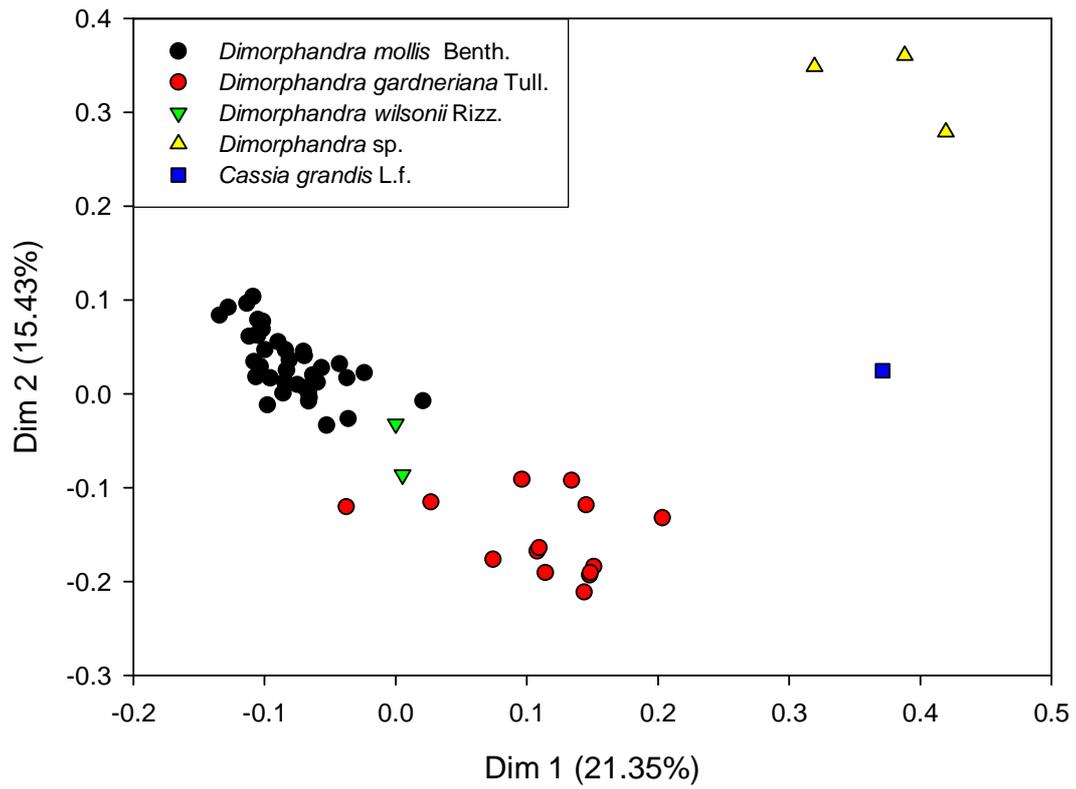


Figura 2. Diagrama de dispersão das 57 progênies oriundas de 20 acessos de *Dimorphandra* spp. e *Cassia grandis* L.f., nos eixos 1 e 2, obtidos por Análise de Coordenadas Principais (PCoA).

CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE GERMOPLASMA DE FAVA-D'ANTA: ESTUDOS  
PRELIMINARES PARA GERMINAÇÃO DE SEMENTES E  
MICROPROPAGAÇÃO.

**RESUMO**

Espécies do gênero *Dimorphandra*, sob extrativismo intenso, estão correndo risco de erosão genética. E a espécie *D. wilsonii* Rizz. está, criticamente, ameaçada de extinção. Objetivando o estabelecimento de uma coleção de germoplasma de espécies potencialmente econômicas do gênero *Dimorphandra*, este trabalho teve como objetivos específicos: definir protocolos para a germinação de sementes *in vitro*; avaliar diferentes meios de cultura e métodos de desinfestação de sementes e embriões; e avaliar a viabilidade do cultivo *in vitro* de segmentos de raiz, caule e folha. Para os ensaios com germinação *in vitro*, o tempo de 48 horas de embebição com água desionizada estéril foi suficiente para retirada de embriões íntegros. O tempo de desinfestação da semente, com hipoclorito de sódio a 0,5 % por 15 minutos, foi o mais eficiente. Já a desinfestação do embrião com cotilédone teve melhor resultado quando feita na concentração de 0,2 % de hipoclorito de sódio por 10. Quanto ao meio, o ágar-água foi o mais eficiente para germinação *in vitro* de *Dimorphandra wilsonii* Rizz. Após a germinação dos embriões, nos meios de cultura WPM, a adição de sacarose permitiu a produção de plantas mais verdes e com maior número de raízes secundárias. Nos ensaios utilizando micropropagação, os segmentos nodais puderam ser utilizados para multiplicação *in vitro* de germoplasma de *Dimorphandra mollis* Benth. e de

*Dimorphandra wilsonii* Rizz., sendo necessários ajustes quanto à composição do meio de cultura para maximizar o número de brotações e a produção de novas plantas.

Palavras-chave: *Dimorphandra* spp; faveiro; banco de germoplasma; cultivo *in vitro*; cultura de tecido.

## ABSTRACT

Species of *Dimorphandra* under intense extractivism are at risk of genetic erosion and specie *D. wilsonii* Rizz. is endangered species. Aiming to establish an *in vitro* germplasm collection of potentially economic species of the genus *Dimorphandra*, this work had the following objectives: to define the culture medium for seed germination *in vitro*; to evaluate different methods of seeds and embryos disinfection; to evaluate the viability of *in vitro* culture of root segments, stem segments and leaf segments. On the seeds and embryos germination assays, 48 hours of soaking in sterile deionised water was sufficient to removal of intact embryos. The most efficient time for seed disinfection was 15 minutes with Sodium hypochlorite 0.5%. Instead, for embryo disinfection, the most efficient time was 10 minutes and the Sodium hypochlorite concentration was 0.2%. The most efficient medium for *in vitro* embryos germination of *D. wilsonii* was the agar-water. After the germination, the medium WPM with the addition of sucrose led to the production of plants greener and greater number of secondary roots. For the micropropagation tests the nodal segments can be used for *in vitro* multiplication of germplasm *D. mollis* Benth. and *D. wilsonii* Rizz. Adjustment are required on the culture medium composition to maximize the production of shoots and new plants

Key words: *faveiro*; genebank; *in vitro* propagation; tissue culture.

## INTRODUÇÃO

A fava-d'anta (*Dimorphandra* spp.), planta nativa do cerrado, é explorada pela indústria farmacêutica para obtenção dos flavonoides, rutina e quercetina, além de outros produtos e subprodutos. Estes flavonoides estão entre os dez produtos farmacológicos mais exportados pelo Brasil (ABIQUIF, 2009), responsável por 50 % da produção mundial de rutina. Como consequência, a exploração da fava-d'anta pela indústria farmacêutica tem ocasionado um extrativismo predatório em alta escala, sendo necessárias medidas para a conservação da espécie, que pode ser extinta a médio e longo prazo (Mendes *et al.*, 2005).

O extrativismo, a falta de proteção de habitats e a propensão a incêndios constituem os fatores de maior risco de erosão genética de *D. mollis* Benth. no norte de Minas Gerais (Souza e Martins, 2004). Outra espécie importante do gênero *D. wilsonii* Rizz. é endêmica do estado de Minas Gerais, Brasil, e está listada na *Red List of Threatened Plants 2006* da IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*) na categoria “criticamente em perigo”. Após quatro anos de prospecções de novos indivíduos realizadas por uma equipe multidisciplinar, o número de indivíduos adultos observados passou de 10 para aproximadamente 50 indivíduos (Souza *et al.*, 2009). Uma outra causa provável pelo reduzido número de indivíduos encontrados desta espécie, além dos fatores citados acima, é a eliminação de plantas em áreas de pastagem, para evitar que os frutos sejam ingeridos pelo gado, uma vez que estes são abortivos, causam fotossensibilidade e podem levar os animais à morte. A *D. gardneriana* Tul., espécie também explorada comercialmente, pode estar correndo risco de erosão por fatores semelhantes aos das espécies supracitadas.

O gênero *Dimorphandra* possui frutos carnosos, odoríferos e indeiscentes, com a dispersão de sementes por mastocoria, ou seja, realizada principalmente por grandes mamíferos herbívoros, tais como, a anta, veados, queixadas, entre outros. Porém, em estudo realizado por Bizerril *et al.* (2005), a dispersão observada de frutos foi muito baixa, ficando a maioria sob a planta-mãe, demonstrando, assim, a falta de dispersores no local trabalhado. Por outro lado, antas em cativeiro aceitaram a dieta com frutos de fava-d'anta, mostrando que esse mamífero continua potencialmente sendo um dispersor da espécie, desde que tenha acesso às sementes. Outro fator importante é que 41 % das fezes de anta, coletadas em regiões de ocorrência de fava-d'anta, continham

sementes íntegras desta espécie. E, ao comparar a germinação destas sementes com outras obtidas diretamente de frutos maduros, não houve diferença significativa, ficando a germinação próxima a 14 %. A integridade da semente, após passagem pelo trato intestinal, se dá pela dormência tegumentar devido à presença de lignina (Dôres, 2007). Esta dormência pode ser quebrada por ação mecânica ou química. A utilização de ácido sulfúrico por três horas é eficiente para a quebra da dormência em sementes de *D. mollis* Benth. (Silva *et al.*, 2005). Os autores citam que outra possível explicação para o baixo consumo de frutos por esses mamíferos possa ser pelo fato de os dispersores originais de *D. mollis* pertencerem à megafauna sul-americana extinta (Janzen e Martin, 1982; Guimarães *et al.*, 2008).

A necessidade de conservação é iminente pelos vários fatores acima citados. Apesar de a semente de fava-d'anta ser ortodoxa, esta possui dormência tegumentar, com baixo índice de germinação e elevada taxa de mortalidade pós-germinação. Giuliano *et al.* (2005) identificaram fungos em sementes de fava-d'anta e observaram que morreram todas as sementes germinadas e contaminadas.

Uma das formas possíveis de conservação de germoplasma é a manutenção de plantas *in vitro*, que permite manter indivíduos que necessitariam de grandes áreas, para manutenção no campo, em pequenos espaços. Principalmente no caso de plantas ameaçadas de extinção, consegue-se conservar grande parte do genoma da espécie, além da vantagem de se ter um indivíduo cultivado em condições de ausência de patógenos.

Na literatura, há poucos relatos de cultivo *in vitro* de *Dimorphandra*. Pereira *et al.* (2001) testaram meios de cultura para a micropropagação de fava-d'anta. Os tecidos utilizados foram cotilédones e hipocótilos. O meio mais apropriado para enraizamento foi o meio MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementado com 1mg/L de BAP (6-benzilaminopurina) e o tecido que melhor respondeu foi o cotilédone. E Lourenço *et al.* (2001) estudaram a produção de flavonoides em cultura de células de *D. mollis* Benth. Contudo, as análises revelaram que, na cultura de células, houve a produção de flavonoides, exceto de rutina.

A conservação *in vitro* de germoplasma é uma realidade para diversas culturas importantes e já vem sendo utilizada com sucesso para espécies como

mandioca, cuja coleção do CIAT *in vitro* possui mais de 6.000 acessos; 57 acessos de batata-doce mantidos pelo INTA (Angel et al., 1996; Arizio et al., 2006). Outras espécies vêm sendo trabalhadas para a obtenção de protocolos de multiplicação *in vitro* para permitir futuros trabalhos de conservação, tais como, a nectarina (Mangarino et al., 2003).

Este trabalho tem como objetivo geral obter protocolo para conservação *in vitro* de fava-d'anta e estabelecer uma coleção *in vitro* de germoplasma. Os objetivos específicos foram: definir condições ideais do meio de cultura para germinação de sementes *in vitro*; avaliar diferentes métodos de desinfestação de sementes e embriões; e avaliar a viabilidade do cultivo *in vitro* de segmentos de raiz, caule e folha.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no laboratório de cultura de tecidos vegetais (LFIT/CCTA) da UENF. Todas as sementes trabalhadas foram obtidas de frutos maduros. Devido à dormência, todas as sementes foram escarificadas friccionando-as em pedra de carborundum, do lado oposto ao hilo para, em seguida, proceder-se ao tratamento das mesmas. Esse procedimento se fez necessário para permitir a embebição das sementes e facilitar a retirada do embrião (Lopes e Matheus, 2008). Todos os meios de cultura foram autoclavados por 20 minutos a 1,5 atm e 121 °C.

Foram realizados cinco ensaios de germinação *in vitro* e dois de multiplicação, todos utilizando delineamento inteiramente ao acaso, conforme descritos a seguir.

### **Germinação *in vitro***

#### a) Ensaio 1. Uso direto do embrião sem desinfestação da semente

Sementes de *Dimorphandra gardneriana* Tul., oriundas de Chapadinha, MA, após a escarificação, foram imersas 10 sementes em água desionizada não estéril por 18 horas para embebição. Em seguida, retiraram-se os embriões com cotilédones, transferindo-os para câmara de fluxo laminar.

Os embriões com cotilédone foram imersos em álcool 70 %, durante um minuto, e desinfestados em hipoclorito de sódio 0,2 %, por 15 minutos. Após esse procedimento, foram feitas três enxaguaduras em água desionizada estéril nos tempos de 5, 10 e 10 minutos, respectivamente. Os embriões foram transferidos para frascos *baby food* contendo 40 mL de meio de cultura, constituído pelos sais minerais de MS e as vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,7. Os frascos foram colocados em sala de crescimento a 27 ± 2 °C onde permaneceram no escuro durante seis dias. Após esse período, foram transferidos para a luz com fotoperíodo de 16:8 horas (luz: escuro) e intensidade de 25 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, fornecidas por lâmpadas fluorescentes OSRAM® luz do dia.

#### b) Ensaio 2. Utilização do meio MS para germinação

Devido ao número limitado de sementes, foram selecionados seis acessos oriundos de diferentes localidades. Estes receberam as seguintes codificações: A - Tocantins III (*Dimorphandra* sp.); B - Chapadinha, MA (*D. gardneriana*); C - *D. wilsonii*, MG; D - Centro de Agricultura Alternativo, Montes Claros, MG (*D. mollis*); E - Lontra, MG (*D. mollis*); e F - Brasília de Minas, MG (*D. mollis*). De cada acesso, foram selecionadas 55 sementes, totalizando 330.

As sementes, após escarificação, foram inseridas em solução de fungicida Derosal® (3mL L<sup>-1</sup>) por 15 minutos e, em seguida, foram imersas em água desionizada estéril durante 48 horas em *Erlenmeyer*, vedado com filme de PVC.

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % por 30 minutos, sendo agitadas periodicamente. Após esse procedimento, foram feitas três enxaguaduras em água desionizada estéril nos tempos de 5, 10 e 10 minutos, respectivamente.

Em seguida, os embriões com cotilédone foram devidamente retirados e colocados em água estéril para não desidratarem. Fez-se uma nova desinfestação, porém, utilizando a metade do tempo de imersão no hipoclorito de sódio a 0,5 % (15 min) e, posteriormente, foram feitas três enxaguaduras em água desionizada estéril nos tempos de 5, 10 e 10 min, respectivamente (Figura 1).

Os embriões com cotilédone, devidamente desinfestados, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura, constituído

pelos sais minerais de MS e as vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose e 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol. O pH foi ajustado para 5,7. Estes foram colocados no escuro durante cinco dias e, em seguida, transferidos para luz fluorescente OSRAM® luz do dia, fotoperíodo de 16:8 horas (luz: escuro), 25 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de irradiância e temperatura de 27±2°C (Figura 1).

Após 73 dias de cultivo *in vitro*, foi realizado teste de viabilidade em embriões não contaminados e em amostras de sementes dos respectivos acessos, pelo método do tetrazólio. As sementes foram imersas em solução a 0,075 % de Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio durante seis horas e, em seguida, avaliadas com relação à coloração.



Figura 1. Experimento de germinação *in vitro* com espécies de *Dimorphandra* spp. Correspondente ao ensaio 2 de germinação *in vitro*.

c) Ensaio 3. Tempo de desinfestação, concentrações de sais minerais e fonte de carbono no meio de cultura WPM

Noventa sementes de *D. Gardneriana* Tul. coletadas no estado do Maranhão, após escarificação, foram imersas em solução de fungicida Derosal® (3mL L<sup>-1</sup>) durante 15 minutos e, em seguida, foram feitas três enxaguaduras em água desionizada estéril. Posteriormente, em câmara de fluxo laminar, as sementes foram imersas em água desionizada estéril e deixadas durante 48 horas em *Erlenmeyer* vedado com filme de PVC. Após 48 horas em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de

sódio a 0,5 % por 10 minutos, sendo agitadas periodicamente. Após esse procedimento, foram feitas três enxaguaduras em água desionizada estéril nos tempos de 5, 10 e 10 min. Logo em seguida, os embriões com cotilédone foram retirados das sementes e imersos em água desionizada estéril para evitar a desidratação.

O experimento foi realizado no Delineamento Inteiramente Casualizado em esquema fatorial 2 x 2 x 2, o qual consistiu de dois tempos de desinfestação dos embriões (10 e 20 minutos) com solução de hipoclorito de sódio 0,2%; duas concentrações dos sais minerais do meio WPM (Wood Plant Medium; Lloyd e McCown, 1980): WPM e WPM/4 sem ou com sacarose (20 g.L<sup>-1</sup>), com 10 repetições por tratamento. O pH do meio foi ajustado para 5,7.

Os tubos de ensaio, contendo meio e embriões com respectivos cotilédones, foram colocados no escuro durante seis dias à temperatura de 27 ± 2 °C e, posteriormente, transferidos para luz fluorescente OSRAM® luz do dia, fotoperíodo de 16:8 horas (luz: escuro), 25 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de irradiância e temperatura de 27±2°C.

A avaliação foi qualitativa, realizada semanalmente, até a terceira semana. As características avaliadas foram: contaminação por patógenos, em porcentagem de frascos contaminados; desenvolvimento do embrião (P= pequeno; M= médio; G= germinado); cor do cotilédone (E= escuro; C= claro, normal); abertura do cotilédone (F= fechado; SA= semiaberto; A= aberto, AF= aberto e com folhas).

#### d) Ensaio 4. Teste de germinação em meio Ágar-Água.

Após escarificação e embebição durante 40 horas em água desionizada estéril, 55 sementes de *D. wilsonii* Rizz. foram imersas em álcool etílico 70% por um minuto e, em seguida, desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 15 minutos. Após esses procedimentos, foram feitos três enxaguaduras em água desionizada estéril por 5, 10 e 10 minutos, respectivamente.

Os embriões com o cotilédone foram excisados em câmara de fluxo laminar com auxílio de bisturi e pinça. Os embriões foram imersos em álcool 70 % por um minuto e, em seguida, desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a

0,2 % durante 15 minutos. Após esse procedimento, foram feitas três enxaguaduras em água desionizada estéril nos tempos de 5, 10 e 10 min.

Após desinfestados, os embriões foram inseridos em tubos de ensaio de 25 x 150 mm na posição vertical, com a parte cotiledonar voltada para cima, contendo 10 mL de meio ágar-água (água solidificada com 8 g L<sup>-1</sup> de ágar Vetec<sup>®</sup>). O pH do meio foi ajustado para 5,7. Os frascos foram colocados em sala de crescimento a 27 ± 2 °C, onde permaneceram durante cinco dias no escuro. Após esse período, foram transferidos para a luz com fotoperíodo de 16:8 horas (luz: escuro) e intensidade de 25 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> fornecidas por lâmpadas fluorescentes OSRAM<sup>®</sup> luz do dia.

Os embriões foram avaliados seis dias após a transferência para a luz, quando foram realizadas medições com paquímetro digital do comprimento e diâmetro do embrião, medidos em milímetros, além da abertura ou não dos cotilédones.

#### e) Ensaio 5. Adição de sacarose e carvão ativado no meio WPM

A partir do quarto ensaio, após 17 dias de cultivo *in vitro*, 40 plântulas bem formadas e sem contaminação foram transferidas para tubos de ensaio de 25 x 25 mm, contendo 30 mL de meio de cultura composto pelos sais minerais de WPM, em esquema fatorial 2 x 2, com dez repetições. Os tratamentos foram constituídos pelo meio de cultura sem ou com sacarose (4 g L<sup>-1</sup>) e sem ou com carvão ativado (3 g L<sup>-1</sup>). O pH do meio foi ajustado para 5,7.

Após 21 dias, foi avaliado o comprimento das partes vegetativas, de reserva e de raiz propriamente dita. Também foram dadas notas para a intensidade de verde nas folhas e presença de raízes secundárias. Para as características quantitativas, foram realizadas análise de variância e teste de Duncan de comparação de médias, com auxílio do programa GENES (Cruz, 2006).

### **Micropropagação**

#### a) Ensaio 1. Cultivo de segmentos de caule, raiz e folha

Duas plântulas, oriundas do ensaio 1 de germinação *in vitro*, foram seccionadas transversalmente em toda sua extensão em frações de aproximadamente 1 cm de comprimento. Os segmentos compreenderam: três

segmentos de raiz; 19 segmentos nodais e dois segmentos com as gemas apicais; dois folíolos e dois foliólulos.

Os segmentos foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura, constituído pelos sais minerais de MS e as vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 0,5 µmol de ANA (ácido naftaleno acético), 4,4 µmol de BAP (benzilaminopurina) e 6 g L<sup>-1</sup> de Ágar Vetec<sup>®</sup>. O pH foi ajustado para 5,7. Os tubos de ensaio foram transferidos para sala de cultura à temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16:8 horas (luz: escuro) e 25 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de irradiância fornecidos por luz fluorescente OSRAM<sup>®</sup> luz do dia.

#### b) Ensaio 2. Cultivo de segmentos nodais de planta

Foram selecionadas dez plantas jovens de *Dimorphandra wilsonii* Rizz., germinadas em casa de vegetação, para o estabelecimento *in vitro*. Cinco plantas, identificadas com números de 1 a 5, foram colocadas em câmara escura durante três semanas para induzir o estiolamento. As outras cinco plantas, numeradas de 6 a 10, foram colocadas em gaiola com tela antiafídica em casa de vegetação na UAP (Unidade de Apoio à Pesquisa) da UENF (Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro) em Campos dos Goytacazes, RJ. As plantas foram pulverizadas semanalmente com Amistar<sup>®</sup> (Azoxystrobin) e Vertimec<sup>®</sup> 18 CE (Abamectin), ambos sistêmicos, nas concentrações de 0,12 g L<sup>-1</sup> e 0,3 mL L<sup>-1</sup>, respectivamente, para uma prévia desinfestação do material.

Após três semanas de pré-tratamento, as plantas estioladas e não estioladas foram levadas para o laboratório e cortadas logo abaixo da sexta gema, de cima para baixo e, após a retirada das folhas, foram colocadas em frasco individualizado com água destilada estéril e transferidas para a câmara de fluxo laminar. Cada segmento de ramo contendo seis gemas axilares foi submerso por um minuto em álcool 70 % e, em seguida, desinfestado em solução de hipoclorito de sódio 0,5 % por 15 minutos. Após esses procedimentos, foram feitos três enxaguaduras em água desionizada estéril nos tempos de 5, 10 e 10 minutos, respectivamente. Os ramos foram colocados em solução de ácido ascórbico, esterilizada em membrana Millipore<sup>®</sup> de 0,22 µm (400 mg L<sup>-1</sup>), para minimizar possível oxidação.

Os explantes, constituídos pelas gemas apicais e os segmentos nodais dos ramos foram excisados de cima para baixo e numerados em ordem crescente. Em seguida, foram inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 10 mL de meio de cultura, constituído pelos sais minerais de MS e as vitaminas de White (Murashige e Skoog, 1962), 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 4,4 µmol de BAP (benzilaminopurina) e 6 g L<sup>-1</sup> de Ágar Vetec<sup>®</sup>. O pH foi ajustado para 5,7. Os tubos de ensaio foram transferidos para sala de cultura à temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16:8 horas (luz: escuro) e 25 µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de irradiância fornecidos por luz fluorescente OSRAM<sup>®</sup> luz do dia.

A avaliação foi realizada após dez semanas e foram observados os fatores contaminação, número de brotações, interferência da posição do meristema na planta e o efeito do estiolamento na produção de brotação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Germinação *in vitro***

a) Ensaio 1 - Uso direto do embrião sem desinfestação da semente.

O tempo de embebição das sementes não foi suficiente para permitir a retirada do embrião sem danificá-lo. Em 18 horas, os cotilédones ainda estavam aderidos ao galactomanano dificultando a retirada de embriões íntegros. Nos próximos ensaios, este tempo foi elevado para 40-48 horas.

Neste ensaio, no qual foi testada a germinação de 10 embriões colocados em meio MS, observou-se a germinação de dois embriões e os demais apresentaram contaminação e não germinaram. Não foi feita a desinfestação das sementes, somente dos embriões. Deste modo, foi incluída no segundo ensaio a desinfestação prévia da semente com fungicida e hipoclorito de sódio.

b) Ensaio 2 - Utilização do meio MS para germinação

Para quase todos os acessos, o tempo de 48 horas para embebição das sementes foi suficiente, exceto para as sementes do acesso de Montes Claros, as quais tiveram que permanecer por mais seis horas imersas em água, visto que,

após 48 horas, os cotilédones ainda estavam aderidos ao galactomanano, dificultando a retirada de embriões íntegros.

Os acessos oriundos do Tocantins, do Maranhão, Montes Claros, Lontra, Brasília de Minas e *D. wilsonii* tiveram 3,7; 50,0; 0,0; 9,0; 11,0 e 26,0 % dos embriões contaminados, respectivamente. Observou-se que a contaminação foi proveniente do embrião com cotilédone e não do meio ou do frasco.

O único acesso, cujos resultados foram positivos, foi oriundo de Brasília de Minas, MG, no qual dois embriões germinaram, emitindo somente parte aérea, outro embrião aumentou três vezes em relação ao tamanho inicial, mas cessou o crescimento aos 40 dias após inoculação e, em quatro embriões, houve abertura dos cotilédones, mas sem desenvolvimento dos mesmos. Na germinação em casa de vegetação, as sementes oriundas de Brasília de Minas tiveram valores mais altos de germinação comparados com os dos demais acessos, concordando com o obtido *in vitro*.

Após 40 dias, não houve mais sinais de contaminação e nem de desenvolvimento de embriões, a não ser as duas primeiras plântulas que chegaram a 8,0 cm de altura *in vitro*. Fez-se então um teste de viabilidade dos embriões, pelo método do tetrazólio, e todos estavam mortos e as sementes colocadas no teste, como padrão de viabilidade, estavam viáveis, exceto as de Lontra, com apenas pontuações rosa-claras, demonstrando, assim, uma baixa viabilidade. O meio no qual estavam os embriões deste acesso ficou claro, demonstrando ausência de atividade bioquímica. Já os meios com os demais embriões ficaram amarelo-amarronzados, demonstrando liberação de substâncias.

Provavelmente, o tempo de exposição ou a concentração do hipoclorito de sódio inviabilizaram o desenvolvimento dos embriões, apesar de terem sido eficazes na assepsia, uma vez que a maior porcentagem de contaminação foi de 50 %.

Dependendo da espécie, o meio MS completo é o ideal para germinação *in vitro* de algumas espécies arbóreas, tais como, ipê amarelo, cagaiteira e mogno (Couto et al., 2004; Martinoto et al., 2007; Nery et al., 2008;), mas, para outras espécies, tais como mangabeira, murici e sucupira, o meio MS deve ser a  $\frac{1}{2}$  ou  $\frac{1}{4}$  da força (Coelho et al., 2001; Nogueira et al., 2004; Soares, 2005;). A concentração de sais em meio de cultura pode ser elevada ou não, dependendo

da espécie. Quanto maior a pressão osmótica menor será a disponibilidade de água para a embebição das sementes, e elevadas pressões osmóticas reduzem o crescimento e afetam o metabolismo celular (Taiz e Zeiger, 2004).

c) Ensaio 3. Tempo de desinfestação, concentrações de sais e fonte de carbono no meio de cultura WPM

A partir dos resultados do segundo ensaio, optou-se por trabalhar com o meio WPM (*Wood Plant Medium*), por ser muito utilizado em trabalhos de cultivo *in vitro* de plantas arbóreas e menos concentrado do que o meio MS (Tabela 1).

Os embriões inoculados em meio WPM com sacarose tiveram menor índice de contaminação e, sem suplementação com sacarose, não houve contaminação. Todos os tratamentos com WPM/4 resultaram em 100% de contaminação (Tabela 1).

A sacarose é uma das fontes de carboidrato utilizada na cultura de tecidos, contudo, às vezes, é dispensável para germinação de sementes *in vitro*. Além disso, contribui para o desenvolvimento de patógenos, aumentando a contaminação. Na germinação de embriões zigóticos de *Astrocaryum* spp., observou-se que embriões provenientes de frutos imaturos necessitaram de concentrações maiores de sacarose, enquanto, nos embriões em estágio maduro, a necessidade não foi superior a 15 g.L<sup>-1</sup> de sacarose no meio de cultura para as melhores taxas de germinação (Pereira et al., 2006).

O tratamento com embriões expostos à solução de hipoclorito por 10 minutos e inoculados em meio WPM, com adição de 20 g L<sup>-1</sup> de sacarose, obteve o melhor resultado, com germinação de 20 % dos embriões, porém os demais embriões ficaram escuros (oxidados) e contaminados (Tabela 1).

Os embriões de *D. gardneriana* Tul. foram sensíveis à exposição, durante 20 minutos, em solução de hipoclorito de sódio, e germinaram melhor em meio WPM com adição de sacarose (Tabela 1), porém com maiores chances de contaminação.

Tabela 1. Características qualitativas observadas em oito tratamentos, variando o tempo de desinfestação, com adição de sacarose e concentração dos sais minerais do meio WPM na germinação *in vitro* de *Dimorphandra gardneriana* Tul.

Tratamento	Contaminação %	Desenvolvimento do embrião %	Oxidação do embrião %	Posição do cotilédone %
10 min; 0 <sup>2/</sup> sac; WPM	0	100 M <sup>1/</sup>	70 E; 30 C	100 A
20 min; 0 sac; WPM	0	10 M	100 E	60 F; 30 SA; 10 A
10 min; 20 sac; WPM	80	20 G, 80 P	80 E; 20 C	60 F; 20 SA; 20 AF;
20 min; 20 sac; WPM	100	100 P	100 E	60 F; 40 SA
10 min; 0 sac; WPM/4	100	100 M	100 E	10 F; 90 A
20 min; 0 sac; WPM/4	100	100 P	100 E	56 F; 22 SA E 22 A
10 min; 20 sac; WPM/4	100	100 P	100 E	40 F; 40 A; 20 SA
20 min; 20 sac; WPM/4	100	100 P	100 E	100 F

<sup>1/</sup> Desenvolvimento do embrião (P= pequeno; M= médio; G= germinado); cor do cotilédone (E= escuro; C= claro, normal); abertura do cotilédone (F= fechado; SA= semiaberto; A= aberto; AF= aberto e com folhas).

<sup>2/</sup> Concentração de sacarose em g L<sup>-1</sup>.

#### d) Ensaio 4. Teste do Meio Ágar-água

Devido à discrepância dos resultados obtidos nos ensaios preliminares, elevada taxa de contaminação e presença de grande quantidade de reserva nos cotilédones das sementes, resolveu-se testar a germinação das sementes em meio ágar-água.

O meio de cultura ágar-água permitiu uma taxa de 100% de germinação dos embriões. Em apenas três dias, a maioria apresentou desenvolvimento embrionário. Aos seis dias após inoculação, foi realizada a primeira avaliação, medindo-se o comprimento e o diâmetro do embrião. O comprimento médio do embrião foi de 10,40 mm com valores oscilando entre 1,5 e 25,42 mm. Para o diâmetro, foi encontrado o valor médio de 3,46 com valores mínimo e máximo de 2,25 e 4,41 mm, respectivamente. Houve má formação em 5 % dos embriões, provavelmente devido a problemas de endogamia, danos mecânicos ao embrião ou até mesmo danos químicos causados pela desinfestação.

Golle et al. (2009), estudando três substratos alternativos na germinação *in vitro* de *Pinus taeda* L., verificaram que os melhores percentuais de germinação foram obtidos com papel filtro e ágar-água. Porém, este último teve maior índice de contaminação.

Souza et al. (2003) testaram o meio ágar-água com diferentes concentrações do meio MS para a germinação *in vitro* de *Lychnophora pinaster*. Segundo os autores, quanto menor a quantidade de sais, maior a germinação.

#### e) Ensaio 5. Adição de sacarose e carvão ativado no meio WPM

Após a germinação das sementes em meio ágar-água, no ensaio anterior, as plântulas foram transferidas para novos meios de cultura.

Pelo teste de médias Duncan, houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos para as características comprimento da parte aérea e comprimento de raiz. O tratamento com carvão ativado e com sacarose foi significativamente superior ao tratamento sem estas substâncias. Os tratamentos com sacarose ficaram com verde intenso, enquanto os sem sacarose ficaram verde amarelado. O comprimento das raízes foi maior nos tratamentos com sacarose. A emissão de raízes secundárias foi consideravelmente maior nos tratamentos com sacarose, ambos com 50 % de plântulas com raízes secundárias, enquanto os tratamentos sem sacarose tiveram apenas 10 % das

plantas com raízes secundárias. A presença de raízes secundárias pode indicar um aumento das chances de sobrevivência quando as mudas forem transferidas para o campo/aclimatização (Tabela 1; Figura 2).

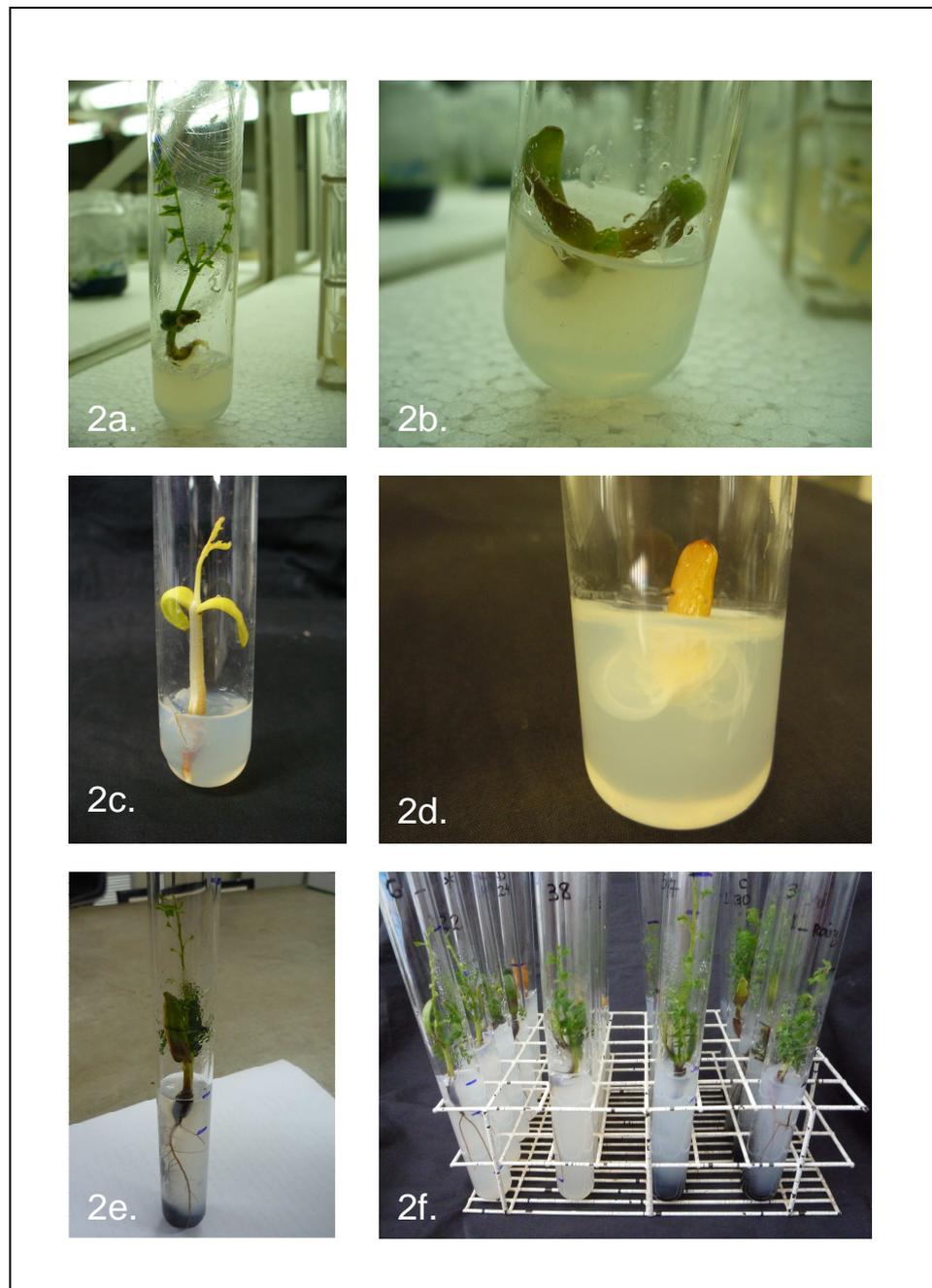


Figura 2. Resultados parciais obtidos nos ensaios *in vitro*. (Figuras: 2a. e 2b.) Plântulas oriundas da germinação *in vitro* de embriões zigóticos de *Dimorphandra gardneriana* Tul. em meio MS; 2c) Plântula de *D. gardneriana* Tull. em meio WPM suplementado com 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 10 minutos de desinfestação do embrião em hipoclorito de sódio a 0,2%; 2d.) Embrião com cotilédone contaminado; 2e. e 2f. germinação de embriões zigóticos com cotilédone em meio ágar-água com e sem carvão ativado).

## Micropropagação

### a) Ensaio 1. Cultivo de segmentos de caule, raiz e folha

Não houve resposta morfogênica nos explantes obtidos a partir de segmentos de raízes e de folhas. Cada segmento nodal formou cerca de seis a 12 novas brotações (Tabela 2, Figura 3).

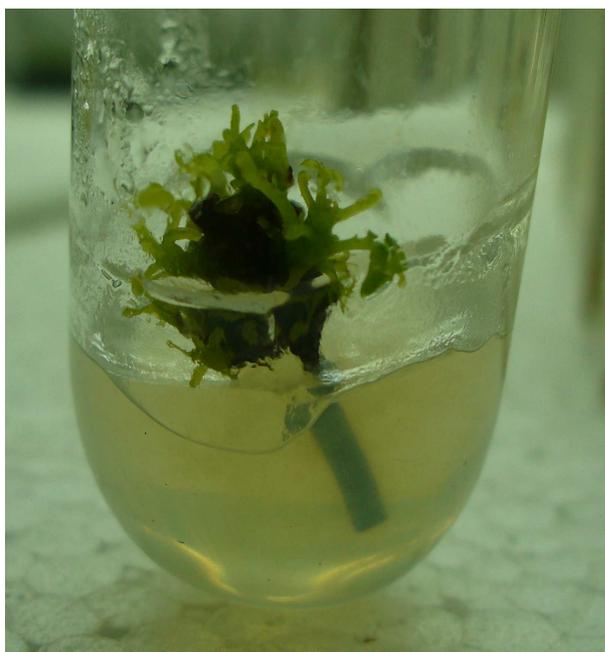


Figura 3. Formação de brotações em segmento nodal de *D. gardneriana* Tul.

### b) Ensaio 2. Cultivo de segmentos nodais de planta

A desinfestação dos segmentos de ramos foi eficiente, uma vez que a espécie *D. wilsonii* Rizz. é pubescente, provavelmente contendo papilas e tricomas na epiderme, como a espécie *D. mollis* Benth. (Dôres, 2007), o que dificulta a desinfestação.

O número de segmentos nodais contaminados foi similar nos dois tratamentos: 28 % em plantas estioladas e 32 % em plantas não estioladas; contudo, a quantidade de brotações foi maior nas plantas estioladas, as quais formaram 22 brotações, enquanto as não estioladas formaram apenas 14 brotações.

Com relação à posição das gemas ao longo do ramo, os segmentos nodais intermediários apresentaram menor contaminação e maior formação de brotações (Tabela 3).

Tabela 2. Alturas das mudas de *Dimorphandra wilsonii* Rizz. em cm, para avaliação do estiolamento

Planta	Altura (cm)			
	05/08/09	12/08/09	26/08/09	$\Delta x$ (cm)
01	10,2	10,9	14,4	4,2
02	9,3	11,1	12,11	2,81
03	8,9	10,2	11,3	2,4
04	8,5	9,6	10,5	2,0
05	7,4	8,3	10,7	3,3
06	8,4	9,5	11,4	3,0
07	9,4	9,6	9,9	0,5
08	10,6	11,2	11,2	0,6
09	9,1	10,4	10,4	1,3
10	8,1	9,6	10,8	2,7

Tabela 3. Contaminação e número de brotações formadas em *Dimorphandra wilsonii* Rizz.

Planta	Contaminação (%)	Número de brotações
01 <sup>1/</sup>	0	8
02	40	4
03	20	3
04	60	3
05	29	4
06	40	1
07	40	2
08	20	5
09	40	1
10	0	5

<sup>1/</sup> 1 a 5 – plantas estioladas; 6 a 10 – plantas não estioladas.

## CONCLUSÕES

### Germinação *in vitro*

O tempo de 48 horas de embebição com água desionizada estéril foi suficiente para retirada de embriões íntegros;

A semente deve ser desinfestada com hipoclorito de sódio a 0,5 % por 15 minutos;

A desinfestação do embrião com cotilédone deve ser feita na concentração de 0,2 % de hipoclorito de sódio por 10 minutos;

O meio ágar-água foi o mais eficiente para germinação *in vitro* de *Dimorphandra wilsonii*.

A adição de sacarose permitiu a produção de plantas mais verdes e com maior número de raízes secundárias.

Para conclusões mais definitivas sobre a comparação com a germinação em casa de vegetação, faz-se necessária a realização de experimentos com um número maior de repetições, utilizando meio ágar-água.

### Micropropagação

Segmentos nodais podem ser utilizados para multiplicação *in vitro* de germoplasma de *Dimorphandra mollis* Benth e de *Dimorphandra wilsonii*, sendo necessários ajustes quanto à composição do meio de cultura para maximizar o número de brotações e a produção de novas plantas.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo final, ou seja, a conservação de germoplasma de fava-d'anta *in vitro* só será alcançada após a definição de protocolos eficientes para multiplicação *in vitro* e, posteriormente, a manutenção dessas espécies em cultivo mínimo. Os resultados alcançados, até o momento, definiram os procedimentos básicos a serem adotados no estabelecimento de explantes constituídos por embriões zigóticos e segmentos nodais *in vitro* com relação à desinfestação e aos meios de cultura básicos e também definiram os tipos de explantes a serem utilizados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIQUIF, 2009. [www.abiquif.org.br/mercado/mercado.pdf](http://www.abiquif.org.br/mercado/mercado.pdf).
- ABIQUIM, 2010. <http://www.abiquim.org.br>. Disponível em 09 de fevereiro de 2010.
- Angel, F., Barney, V., Josepht, Roca, W.M. (1996) Stability of cassava plants at the DNA level after retrieval from 10 years of *in vitro* storage. *Euphitica*, 90:307-313.
- Arizio, C.M., Hompanera, N., Suarez, E.Y., Manifesto, M.M. (2006) Genotypic identification and diversity evaluation of a sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) collection using microsatellites. *Plant Genetic Resources, Characterization and Utilization* 7: 135–138.
- Bizerril, M.X.A., Rodrigues, F.H.G., Hass, A. (2005) Fruit consumption and seed dispersal of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) by the lowland tapir in the Cerrado of Central Brazil. *Braz. J. Biol.*, 65: 407-413.
- Coelho, M.C.F., Pinto, J.E.B.P., Morais, A.R., Cid, L.P.B., Lameira, O.A. (2001) Germinação de sementes de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth] *in vitro* e *ex vitro*. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, 25: 38-48.
- Couto, J.M.F., Otoni, W.C., Pinheiro, A.L., Fonseca, E.P. (2004) Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). *R. Árvore* 28: 633-642.
- Cruz, C. D. (2006) *Programa Genes: análise multivariada e simulação*. Viçosa: ed. UFV. 175p.
- Dôres, R.G.R. (2007) *Análise morfológica e fitoquímica da fava-d'anta (Dimorphandra mollis Benth.)*. Viçosa: UFV. 375p (Tese de doutorado).
- Giuliano, I., Silva, T.G.M., Napoleão, R., Gutiérrez, A.H., Siqueira, C.S. (2005) Identificação de fungos em sementes de *Dimorphandra mollis* e efeito de diferentes tratamentos. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 553-553.
- Golle, D.P. et al. (2009) Water supply offered by alternative substrates used *in vitro* *Pinus taeda* L. germination. *Cienc. Rural*, 39: 2218-2221.
- Guimarães Júnior, P.R., Galetti, M., Jordano, P. (2008) Seed Dispersal Anachronisms: Rethinking the Fruits Extinct Megafauna. *Ate. PLoS ONE*, 3: e1745.

- Janzen, D.H., Martin, P.S. (1982) Neotropical anachronisms: the fruits the Gomphotheres ate. *Science*, 215: 19–27.
- Lloyd, G.; McCown, B. 1981. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 30: 421-327.
- Lopes, J.C., Matheus, M.T. (2008) Morfologia de sementes de *Dimorphandra wilsonii* Rizz. *Revista Brasileira de Sementes*, 30: 96-101.
- Lourenço, M.V., Biondo, R., França, S.C. (2001) Flavonoids in *Dimorphandra mollis* cell cultures. In: *IV ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL*, Goiânia. REDBIO. p. 111.
- Manganaris, G.A., Economou, A.S., Boubourakas, I.N., Katis, N.I. (2003) Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Rep* 22:195–200
- Martinotto, C., Paiva, R., Santos, B.R., Soares, F.P., Nogueira, R.C., Silva, A.A.N. (2007) Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*eugenia dysenterica* dc.). *Ciênc. agrotec.*, 31: 1668-1671.
- Mendes, A.D.R. (2005) Produção de biomassa e flavonóides totais por fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) sob diferentes níveis de fósforo em solução nutritiva. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 7: 7-11.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Nery, M.C., Carvalho, M.L.M., Oliveira, L.M., Nery, F.C., Silva, D.G. (2008) Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. *Cerne*, 14: 1-8.
- Nogueira, R.C., Paiva, R., Castro, A.H., Vieira, C.V., Abbade, L.C., Alvarenga, A.A. (2004) Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Ciênc. Agrotec.*, 28: 1053-1059.
- Pereira, A.M.S., Biondo, R., Lourenço, M.V., Duarte, I.B., Bertoni, B.W., França, S.C. (2001) Micropropagation of *Dimorphandra mollis* (faveiro). In: *IV Latin American Meeting on Plant Biotechnology – REDBIO 2001*, Goiânia 1:113-113.
- Pereira, J.E.S., Maciel, T.M.S., Costa, F.H.S., Pereira, M.A.A. (2006) Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*) *Ciênc. Agrotec.*, 30: 251-256.

- Soares, F. P. (2005) Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – UFLA: Lavras, 137 p.
- Souza, A.V., Pinto, J.E.B.P., Bertolucci, S.K.V., Corrêa, R.M., Castro, E.M. (2003) Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *lychnophora pinaster* Mart. *Ciênc. Agrotec.* Edição Especial, p.1532-1538.
- Souza, G.A., Martins, E.R. (2004) Análise de risco de erosão genética de populações de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) no Norte de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Plantas medicinais* 6: 42-47.
- Souza, H.A.V., Ribeiro, R.A., Fernandes, F.M., Lovato, M.B. (2009) Estrutura genética espacial do faveiro de Wilson (*Dimorphandra wilsonii* - Leguminosae), espécie criticamente ameaçada de extinção, e estratégias para sua conservação e manejo. Resumos do 55<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Genética.
- Stein, V.C., Paiva, R., Soares, F.P., Nogueira, R.C., Silva, L.C., Emrich, E. (2007) Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *inga vera* willd. subsp. *affinis* (dc.) t.d. penn. *Ciênc. Agrotec.*, 31: 1702-1708.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2004) *Fisiologia Vegetal*. 3a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719 p.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

O gênero *Dimorphandra* é importante por possuir duas espécies economicamente exploradas para extração de flavonoides pela indústria farmacológica (*D. mollis* Benth. e *D. gardneriana* Tull.); ter espécies endêmicas do Brasil, tais como, a *D. jorgei* Silva e *D. wilsonii* Rizz., além de ter esta última espécie na categoria criticamente ameaçada de extinção. O extrativismo, a falta de proteção de habitats e a propensão a incêndios constituem os fatores de maior risco de erosão genética deste gênero. Portanto, este requer ações voltadas para conservação da variabilidade genética. Este estudo teve como principais objetivos: coletar; caracterizar e estimar a divergência fenotípica entre acessos de *Dimorphandra* spp. provenientes de diferentes localidades do Brasil, com base em descritores vegetativos e de frutos; avaliar a variabilidade por meio de marcadores moleculares RAPD; implantar uma coleção *ex situ* de germoplasma, por meio de manutenção de indivíduos no campo e via sementes; estabelecer uma lista de descritores mínimos para caracterização morfológica dos acessos; definir protocolos para a germinação de sementes *in vitro* e micropropagação.

Em função dos resultados, pôde-se concluir que:

- 1- O número de plantas amostradas, aproximadamente cinco indivíduos por acesso, foi eficiente para caracterizar e estudar a divergência fenotípica dos acessos trabalhados.

- 2- São necessárias mais coletas, nas respectivas áreas, para aumentar o número efetivo populacional e garantir, com maior precisão, o mínimo de erosão genética.
- 3- Houve variabilidade fenotípica entre os acessos estudados, com base em descritores morfológicos de fruto, e a formação dos grupos foi concordante com a origem e a espécie.
- 4- É possível manter acessos de *Dimorphandra* spp. em condições de campo fora do bioma cerrado.
- 5- Os 26 descritores propostos foram eficientes na discriminação dos acessos.
- 6- O estudo da divergência (fenotípica e genotípica), com base em descritores quantitativos de parte vegetativa e marcadores moleculares RAPD, demonstraram que há variabilidade entre os acessos estudados.
- 7- Para a germinação *in vitro*, o tempo de 48 horas de embebição das sementes, com água desionizada estéril, foi suficiente para retirada de embriões íntegros.
- 8- O tempo de desinfestação da semente com hipoclorito de sódio a 0,5 %, por 15 minutos, foi o mais eficiente.
- 9- O tempo de desinfestação do embrião com cotilédone teve melhor resultado quando na concentração de 0,2 % de hipoclorito de sódio por 10 minutos.
- 10- O meio ágar-água foi o mais eficiente para germinação *in vitro* de *D. wilsonii* Rizz.
- 11- A adição de sacarose no meio de cultura WPM permitiu a produção de plantas mais verdes e com maior número de raízes secundárias.
- 12- Para os ensaios utilizando micropropagação, os segmentos nodais podem ser utilizados para multiplicação *in vitro* de germoplasma de *D. mollis* e de *D. wilsonii*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIF (2009) [www.abiquif.org.br/mercado/mercado.pdf](http://www.abiquif.org.br/mercado/mercado.pdf)

ABIQUIM 2010 <http://www.abiquim.org.br>. Disponível em 09 de fevereiro de 2010.

Abreu, C.R., Barros, M.A.G., Ribeiro, M.F. (2002) Formação e crescimento dos tubos polínicos de *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae), Brasília DF; In: *Resumos do 53º Congresso Nacional de Botânica*. p273; 53º Congresso Nacional de Botânica.

Allard, M.O. (1971) *Princípios do melhoramento genético das plantas*. Rio de Janeiro: Edgard Blucher, 381p.

Almeida, S.P., Proença, C.E.B., Sano, S.M., Ribeiro, J.F. (1998) *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Planaltina: EMBRAPA. 464p.

Angel, F., Barney, V.E., Tohme, J., Roca, W.M. (1996) Stability of cassava plants at the DNA level after retrieval from 10 years of *in vitro* storage. *Euphytica*, 90:307-313.

Aras, S., Duran, A., Yenilmez, G. (2003) Isolation of DNA for RAPD Analysis from Dry Leaf Material of Some *Hesperis* L. Specimens. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21: 461a–461f.

- Araújo, I. (2002) *Identificação de QTL associados ao teor de manteiga na amêndoa de cacau (Theobroma cacao L.) via marcadores AFLP*. Campos dos Goytacazes. UENF. 52 p. Tese de Mestrado.
- Arizio, C.M., Hompanera, N., Suarez, E.Y., Manifesto, M.M. (2006) Genotypic identification and diversity evaluation of a sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) collection using microsatellites. *Plant Genetic Resources, Characterization and Utilization*, 7: 135–138.
- Baldoni, A.B., Teixeira, F.F., Santos, J.B. (2002) Controle genético de alguns caracteres relacionados à cor da semente de feijão no cruzamento Rosinha x Esal 693. *Acta Scientiarum*, 24: 1427-1431.
- Bandel, G. (1974) Chromosome numbers and evolution in the Leguminosae. *Caryologia*, 27:17-32.
- Bastos, C.N., Albuquerque, P.S.B., Dias, J.C. (1999) Conservação, caracterização, avaliação e utilização de germoplasma de cacau (*Theobroma cacao*) silvestre da Amazônia. In: Seminário de apresentação de resultados do subprograma de ciência e tecnologia do Programa Piloto para Proteção das Florestas Tropicais do Brasil. Manaus – AM. *Anais PPG-7 PP*. Rio de Janeiro, p.6-10.
- Biondo, E., Miotto, S.T.S., Scifino-Wittman, M.T. (2005) Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae – Leguminosae do sul do Brasil. *Ciência Florestal*, 15: 241-248.
- Bizerril, M.X.A., Rodrigues, F.H.G., Hass, A. (2005) Fruit consumption and seed dispersal of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) by the lowland tapir in the Cerrado of Central Brazil. *Braz. J. Biol.*, 65: 407-413.

- Caixeta, E.T., Oliveira, A.C.B., Brito, G.G., Sakyama, N.S. (2006) Tipos de marcadores moleculares. In: Borém, A., Caixeta, E.T. Marcadores moleculares. Viçosa, MG. Cap. 1. 9-78.
- Castro, H.G., Ferreira, F.A. Silva, D.J.H. (2001) *Contribuição ao estudo das plantas medicinais: metabolismo secundário*. Viçosa: UFV. 104p.
- Chaves, M. M. F., Usberti, R. (2003) Previsão da Longevidade de Sementes de Faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth. *Revista Brasileira de Botânica*, 26(4): 557-564.
- Coelho, M.C.F., Pinto, J.E.B.P., Morais, A.R., Cid, L.P.B., Lameira, O.A. (2001) Germinação de sementes de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth] *in vitro* e *ex vitro*. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, 25: 38-48.
- Couto, J.M.F., Otoni, W.C., Pinheiro, A.L., Fonseca, E.P. (2004) Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macrophylla* King). *R. Árvore* 28: 633-642.
- Costa, C. A., Alves, D. S., Fernández, L. A., Martins, E. R., Souza, I. G. B., Sampaio, R. A., Lopes, P. S. do N. (2007) Nutrição mineral de fava-d'anta. *Horticultura Brasileira*, 25(1): 24-28.
- Cruz, C. D. (2006) *Programa Genes: análise multivariada e simulação*. Viçosa: Editora UFV, 175p.
- CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. (2003) *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético*. Viçosa: Editora UFV, 579p.
- Cunha, P.L.R., Feitosa, J.P.A. (2009) Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Quim. Nova* 32: 649-660.

- Cunha, P.L.R., Vieira, I.G.P., Arriaga, A.M.C., Paula, R.C.M., Feitosa, J.P.A. (2009) Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. *Food hydrocolloids*. 23: 880-885.
- Daher, R.F., Pereira, M.G., Pereira, A.V., Amaral Junior, A.T. (2002) Genetic divergence among elephantgrass cultivars assessed by RAPD markers in composit samples. *Scientia Agricola*, 59: 623-627.
- Dôres, R.G.R. (2007) *Análise morfológica e fitoquímica da fava-d'anta* (*Dimorphandra mollis* Benth.). (Tese de doutorado). Viçosa: UFV. 375p.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Falconer, D.S. (1987) *Introdução à genética quantitativa*. Tradução de M.A. Silva e J.C. Silva. Viçosa: Imprensa Universitária, 279p.
- Faleiro, F. G.; Araújo, I. S.; Bahia, R.C.S.; Santos, R.F.; Yamada, M. M.; Anher, D. (2002) Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. *Agrotrópica*, Ilhéus.
- Faleiro, F. G.; Faleiro, A. S. G.; Cordeiro, N. C. R.; Karia, C. T. (2003) Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado visando a análises moleculares. Comunicado Técnico 92. Planaltina, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 5p.
- Faria, R. R.; Pacheco, M. L. A. F.; Leighez Júnior, E.; Laura, V.A.; Cunha-Laura, A.L. (2005<sup>a</sup>) Efeito do tempo de armazenamento na germinabilidade e no vigor fisiológico de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth. (LEGUMINOSAE – CAESALPINIOIDEAE) ocorrente no Campus da UFMS em Campo Grande-MS. In: 56<sup>o</sup> Congresso Nacional de Botânica.

- Faria, R.R., Cunha-Laura, A.L., Laura, V.A. (2005b) Germinação, fenologia e estudo cromossômico de *Dimorphandra mollis* Benth. ocorrente em área remanescente de cerrado da UFMS (Campo Grande-MS). In: Anais do IV Encontro de Pesquisa e Iniciação Científica do Estado e da Região do Pantanal. Campo Grande: Editora UNIDERP, p.263-273.
- Fernandes, F.M., Fonseca, A.G., Kaechele, K., Goulart, M.F., Marinho, W., Souza, H.A.V., Queiroz, A.R., Giorni, V., Oliveira, G., Rodrigues, M.J., Bacelar, M., Lovato, M.B. (2007) Tentando evitar mais uma extinção: o caso do "Faveiro de Wilson" (*Dimorphandra wilsonii* Rizzini) *Matéria* 3: 87-98.
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. (1995) *Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética*. 1. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p.
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3.ed. Brasília: Embrapa/CENARGEN. 220p.
- Ferreira, R.A., Botelho, S.A., Davide, A.C., Malavasi, M.M. (2001) Morfologia de frutos, sementes, plântulas e plantas jovens de *Dimorphandra mollis* Benth. - faveira (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Revista Brasileira Botânica*, 24: 303-309.
- Freitas, V.L.O., Alves, T.H.S., Lopes, R.M.F., Lemos Filho, J.P. (2009) Biometria de frutos e sementes e germinação de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth. e *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (Fabaceae – Caesalpinioideae) *Scientia Forestalis*, 37: 027-035.
- Filho D.W.; Silva E.L. E Boveris A. (2001) Flavonóides, antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. São Paulo: Universitária. p. 317.

- Freitas, V.L.O. (2001) *Variabilidade genética em Vanillosmopsis erythropappa Schultz Bip. (Asteraceae) em áreas de Candeial e de Mata*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas. UFMG.
- Freitas, L. B.; Bered, F. (2003) *Genética e evolução vegetal*. Porto Alegre: UFRGS. 463p.
- Gepts, P. (1988) Phaseolin as an evolutionary marker. p. 215-241. In: Gepts, P. Genetic resources of *Phaseolus* beans. Kluwer, Dordrecht. Netherlands.
- Giacometti, D.C. (1988) Descritores para caracterização e avaliação de germoplasma, *Anais do Encontro sobre Recursos Genéticos*, Jaboticabal, SP, Brasil. p.129-130.
- Giuliano, I., Silva, T.G.M., Napoleão, R., Gutiérrez, A.H., Siqueira, C.S. (2005) Identificação de fungos em sementes de *Dimorphandra mollis* e efeito de diferentes tratamentos. *Fitopatologia Brasileira*, 30: 553-553.
- Golle, D.P. et al. (2009) Water supply offered by alternative substrates used *in vitro* *Pinus taeda* L. germination. *Cienc. Rural*, 39: 2218-2221.
- Gomes, L. J. 1998. *Extrativismo e comercialização da fava-d'anta (Dimorphandra sp): um estudo de caso na região de cerrado de Minas Gerais*. Lavras: UFLA, 158p. Dissertação de mestrado.
- Gonçalves, A. C. 2007. *Estrutura genética em populações naturais de Dimorphandra mollis Benth. (Fabaceae)*. Lavras: UFLA, 83p. Dissertação de mestrado.
- Guimarães Júnior, P.R., Galetti, M., Jordano, P. (2008) Seed Dispersal Anachronisms: Rethinking the Fruits Extinct Megafauna. *Ate. PLoS ONE*, 3: e1745.

Hawtin, G., Iwanaga, M., Hodgkin, T. (1996). Genetic resources in breeding for adaptation. *Euphytica*, 92: 255-266.

HERBÁRIO DO IAC. 2007.

Holsinger, K. E. 2003. *Conservation of Genetic Resources*. Notes about of course on Conservation Biology, University Connecticut, Connecticut, p.10.

Huang, Y., Yang, M., Zhang, H., Zhuang, X., Wu, X., Xie, W. (2009) Genetic Diversity and Genetic Structure Analysis of the Natural Populations of *Lilium brownii* from Guangdong, China. *Biochem Genet* , 47:503–510.

INPI. (2007) The International Names Plant Index. ([www.inpi.org](http://www.inpi.org)). Disponível em 12 de agosto de 2007.

Janzen, D.H., Martin, P.S. (1982) Neotropical anachronisms: the fruits the Gomphotheres ate. *Science*, 215: 19–27.

Jobes, D. V., Hurley, D.L. E Thien, L.B. (1995) Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Táxon*, 44:379-386.

Kirkby, E.A.; Römheld, V. (2007) Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. *Informações agronômicas* 118: 1-24.

Lacerda, D.R.; Lemos Filho, J.P.; Acedo, M.D.P.; Lovato, M.B. (2002) Molecular differentiation of two vicariant neotropical tree species, *Plathymeria foliosa* and *P. reticulata* (Mimosoidae), infred using RAPD markers. *Plant Systematics and Evolution*, 235: 67-77.

Lanza, M.A. (2000) Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético vegetal. In: Informe Agropecuário, Biotecnologia, Belo Horizonte, v21. n. 204, p. 97-108.

- Lopes, J.C.; Matheus, M.T. (2008) Caracterização morfológica de sementes, plântulas e da germinação de *Dimorphandra wilsonii* Rizz. - faveiro-de-Wilson (fabaceae-caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Sementes*, 30: 96-101.
- Lorenzi, H. (2002) *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 368p. v.1.
- Lourenço, M.V., Biondo, R., França, S.C. (2001) Flavonoids in *Dimorphandra mollis* cell cultures. In: *IV ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL*, Goiânia. REDBIO. p. 111.
- Macedo, E. A., S., et al. (2004) Influência da época de colheita, procedimento de secagem e parte do fruto no teor de flavonóides em fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 7, n. 1, p. 1-5.
- MADEIRA (2003) Boletim Informativo do CETEC.
- Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, A.S. (1997) *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. Piracicaba: POTAFOS, 319p.
- Manganaris, G.A., Economou, A.S., Boubourakas, I.N., Katis, N.I. (2003) Elimination of PPV and PNRSV through thermotherapy and meristem-tip culture in nectarine. *Plant Cell Rep* 22:195–200
- Martinotto, C., Paiva, R., Santos, B.R., Soares, F.P., Nogueira, R.C., Silva, A.A.N. (2007) Efeito da escarificação e luminosidade na germinação *in vitro* de sementes de cagaiteira (*eugenia dysenterica* dc.). *Ciênc. agrotec.*, 31: 1668-1671.
- Mendes, A. D. R. (2005) Produção de biomassa e flavonóides totais por fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth) sob diferentes níveis de fósforo em solução nutritiva. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 7, n. 2, p. 7-11.

- Milach, S. C. K. (1998) *Marcadores de DNA em plantas*. UFRGS. Porto Alegre, RS. 141p.
- Moreira-Coneglian, I. R.; Oliveira, D. M. T. (2006) Anatomia comparada dos limbos cotiledonares e eofilares de dez espécies de Caesalpinioideae (Fabaceae). São Paulo: *Revista Brasileira de Botânica*, 29(2): 193-197.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Namkoong, G., Koshi, M.P. (2001) Application of genetic markers to forest tree species. [www.biovertyinternational.org](http://www.biovertyinternational.org).
- NASS, L.L. (2001) Utilização de recursos genéticos vegetais no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S. de; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). *Recursos genéticos e melhoramento de plantas*. Rondonópolis: Fundação MT, p.30-55.
- Nery, M.C., Carvalho, M.L.M., Oliveira, L.M., Nery, F.C., Silva, D.G. (2008) Germinação *in vitro* e *ex vitro* de embriões/sementes de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich. *Cerne*, 14: 1-8.
- Nogueira, R.C., Paiva, R., Castro, A.H., Vieira, C.V., Abbade, L.C., Alvarenga, A.A. (2004) Germinação *in vitro* de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.). *Ciênc. agrotec.*, 28: 1053-1059.
- Noroozi, M.; Agerson, W. J.; Lean, M. E. (1998) Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 67(6): 1210-1218.
- Oliveira, D.A., Paula, M.F.B., Pimenta, M.A.S., Braga, R.F., Ferreira, M.F.M., Rodrigues, L.A. (2008) Variabilidade genética de populações de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis*) da região norte do Estado de Minas Gerais. *Rev. Árvore*, 32: 355-363.

- Oliveira, M. C. de, Scolforo, J. R. S., Mello, J. M. de, Oliveira, A. D. de, Acerbi Júnior, F. W. (2006) Avaliação de diferentes níveis de intervenção florística, diversidade e similaridade de uma área de cerrado *stricto sensu*. Lavras: *Cerne*, v.12, n.4, p. 342-349.
- Oliveira, L.S., Paludo, A., França, L.V., Vilela, M.F., Duboc, E. (2008) Distribuição geográfica de espécies nativas do cerrado: resultados preliminares. In: IX Simpósio Nacional Cerrado, Brasília.
- Pamidiamarri, D.V.N.S., Pandya, N., Reddy, M.P., Radhakrishnan, T. (2009) Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP. *Mol Biol Rep*, 36: 901–907.
- Panegassi, V.R., Serra, G.E., Buckeridge, M.S. (2000) Potencial tecnológico do galactomanano de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis*) para uso na indústria de alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20: 3
- Paula, M.F.B. de, Braga, R.F., Moreira, P. de A., Rodrigues, L.A., Pimenta, M. A.S.; Oliveira, D.A. (2006). *Caracterização de acessos de fava-d'anta (Dimorphandra mollis Benth.) por meio de marcadores RAPD*. In: 57 Congresso Brasileiro de Botânica e 17 Encontro Estadual de Botânica. Gramado-RS. Anais do 57 Congresso Brasileiro de Botânica.
- Perrier, X., Flori, A., Bonnot, F. (2003) Data analysis methods, pp 43–76 in *Genetic Diversity of Cultivated Tropical Plants*, edited by P. HAMON, M. SEGUIN, X. PERRIER and J. C. GLASZMANN. CIRAD/Science, Montpellier, France.
- Pereira, A.M.S., Biondo, R., Lourenço, M.V., Duarte, I.B., Bertoni, B.W., França, S.C. (2001) Micropropagation of *Dimorphandra mollis* (faveiro). In: IV Latin American Meeting on Plant Biotechnology – REDBIO 2001, Goiânia 1:113-113.

- Pereira, J.E.S., Maciel, T.M.S., Costa, F.H.S., Pereira, M.A.A. (2006) Germinação *in vitro* de embriões zigóticos de murmuru (*Astrocaryum ulei*) *Ciênc. agrotec.*, 30: 251-256.
- Ramos, S.R.R.; Queiroz, M.A.; Pereira, T.N.S. (2007) Recursos Genéticos Vegetais: Manejo e uso. *Magistra*, 19: 265-272.
- Richards, E.J. (1997) Preparation of plant DNA using CTAB. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds) Short Protocols in Molecular Biology (3rd ed). *John Wiley e Sons*, 2.10–2.11.
- Rodrigues, D.A., Franco, B.D.G. de M., Landgraf, M., Destro, M.T. (2003) Avaliação da eficiência de três ágaros seletivos no isolamento de *Listeria monocytogenes*. Campinas: *Ciênc. Tecnol. Aliment.* v. 23, supl.
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425.
- Santos, E.A.M., Mendes, A.D.R., Queiroz, J.M.R., Martins, E.R. (2004) Influência da época de colheita, procedimento de secagem e parte do fruto no teor de flavonóides em fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 7: 1-5.
- Silva, G.P., Blini, R.C.B., Teraoka, P.Y., Viegas, M.P., Ribeiro, M.G., Ferreira, M.A.M.M. (2001) Determinação do número de cromossomos de *Dimorphandra mollis* Benth. In: 47º Congresso Nacional de Genética – SBG, Águas de Lindóia – SP, CD ROM.
- SISBIO. 2009. <http://www.icmbio.gov.br/sisbio/> Disponível em 02 de novembro de 2009.
- Soares, F. P. (2005) Aspectos do cultivo *in vitro* da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – UFLA: Lavras, 137 p.

- Souza, M. P. (1991) Constituintes químicos de plantas medicinais. Fortaleza: EUFC. 461p.
- Souza, G.A., Martins, E.R. (2004) Análise de risco de erosão genética de populações de fava-d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth.) no Norte de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Plantas medicinais* 6: 42-47.
- Souza, G.A., Queiroz, J.M.R, Anjos, O.F., Santos, E.A.M., Martins, E.R., Fernandes, L.A., Costa, C.A. (2008) Levantamento ecogeográfico de *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae) no Norte de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Plantas medicinais* 10: 51-62.
- Souza, H.A.V. (2008) Análise comparativa da diversidade genética em duas espécies de faveiro: *Dimorphandra wilsonii*, ameaçada de extinção, e *D. mollis*. Implicações para conservação e manejo. Belo Horizonte: UFMG, 36p. Dissertação de mestrado.
- Souza, H.A.V., Ribeiro, R.A., Fernandes, F.M., Lovato, M.B. (2009) Estrutura genética espacial do faveiro de Wilson (*Dimorphandra wilsonii* - Leguminosae), espécie criticamente ameaçada de extinção, e estratégias para sua conservação e manejo. Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética.
- Souza, A.V., Pinto, J.E.B.P., Bertolucci, S.K.V., Corrêa, R.M., Castro, E.M. (2003) Germinação de embriões e multiplicação *in vitro* de *lychnophora pinaster* Mart. *Ciênc. Agrotec.* Edição Especial, p.1532-1538.
- Stein, V.C., Paiva, R., Soares, F.P., Nogueira, R.C., Silva, L.C., Emrich, E. (2007) Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *inga vera* willd. subsp. *affinis* (dc.) t.d. penn. *Ciênc. Agrotec.*, 31: 1702-1708.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2004) Fisiologia Vegetal. 3a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 719 p.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599.
- Vencovsky, R. (1987) Tamanho Efetivo Populacional na Coleta e Preservação de Germoplasmas de Espécies Alógamas. *IPEF* 35: 79-84.
- Vilas Boas, T., Sangalli A., Vieira, M.C., Mussury, R.M. Caracterização anatômica de plântulas de *Dimorphandra mollis* Benth. (faveiro).
- Valls, J.F.M. (2007). Caracterização de Recursos Genéticos Vegetais. In: NASS, L.L. (Org.). *Recursos Genéticos Vegetais*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 281-305.
- Walter e Cavalcanti (2005). *Magistra*, 19(4): 265-273, out./dez., 2007.