

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE  
ARNICA (*Lychnophora ericoides* Less.)**

**LUCIANA QUEIROZ DE MELO**

**ORIENTADOR: PROF. JEAN KLEBER DE ABREU MATTOS**

**CO-ORIENTADOR: DR. ROBETO FONTES VIEIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PUBLICAÇÃO: (234/2006)**

**BRASÍLIA/DF**

**AGOSTO 2006**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**ESTRATÉGIAS PARA CONSERVAÇÃO *EX SITU* DE ARNICA (*Lychnophora  
ericoides* Less.)**

**LUCIANA QUEIROZ DE MELO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE  
AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE  
BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE  
CONCENTRAÇÃO DE PRODUÇÃO VEGETAL.**

---

**ROBERTO FONTES VIEIRA, PhD (Embrapa-Cenargen)  
(CO-ORIENTADOR) CPF: 381.546.926-00 E-mail: rfvieira@cenargen.embrapa.br**

**APROVADA POR:**

---

**JEAN KLEBER DE ABREU MATTOS, Dr. (Universidade de Brasília)  
(ORIENTADOR) CPF: 002.288.181-68 E-mail: kleber@unb.br**

---

**JOSÉ RICARDO PEIXOTO, Dr. (Universidade de Brasília)  
(EXAMINADOR INTERNO) CPF:354.356.236-34 E-mail: peixoto@unb.br**

---

**LINDA STYER CALDAS, PhD (Rede Sementes)  
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF: 059.437.361-15 E-mail: lcaldas@unb.br**

**BRASÍLIA/DF, 04 de agosto de 2006**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Melo, Luciana Queiroz

Estratégias Para Conservação *ex situ* de Arnica (*Lychnophora ericoides* Less.). / Luciana Queiroz de Melo; orientação de Jean Kleber de Abreu Mattos. – Brasília, 2006.

78p.: il

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2006-06-20

1. Arnica. 2. Análise genética. 3. Germinação. 4. Conservação *ex situ*. 5. Planta Medicinal. I Mattos, J.K. II. Título.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

MELO, L. Q. **Estratégias para Conservação *ex situ* de Arnica (*Lychnophora ericoides* Less).** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006, 75 p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Luciana Queiroz de Melo

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Estratégias para Conservação *ex situ* de arnica (*Lychnophora ericoides* Less.).

GRAU: Mestre

ANO: 2006

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósito acadêmico e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

## Dedicatória

Dedico este trabalho à DEUS; aos meus pais, Paulo e Rosangela, pelo amor e apoio e dedicação; aos meus irmãos Fábio e Thiago.

## **Agradecimentos**

Ao Dr. Roberto Fontes Vieira pela oportunidade oferecida, pelo apoio e incentivo à atividade de pesquisa, sendo o maior responsável pela bagagem de conhecimento acumulado durante toda minha formação acadêmica.

Ao prof. Jean Kleber por mais uma vez me orientar.

À Ana Ciampi, Antonieta Salomão e Dijalma Barbosa, pela oportunidade de aprendizado nos laboratórios, paciência e atenção. Pessoas extremamente importantes no aprendizado e amadurecimento durante a realização deste trabalho.

À Zilneide P.S. Amaral e Aécio A. dos Santos pelo auxílio durante as atividades de laboratório e coleta de material em campo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade de Brasília

Aos meus colegas do mestrado pelo apoio ao longo deste trabalho.

Aos amigos da Embrapa, Julcéia Camilo, Lígia Adjuto, Rosa Mundim, Izulmé e Terezinha pela amizade e companheirismo desde os tempos de faculdade.

Ao Fundo Nacional do Meio Ambiente (FNMA) e à EMBRAPA pela bolsa de pesquisa concedida;

Aos gerentes do Parque Nacional de Brasília, IBAMA/DF e da Fazenda Água Limpa, UnB, Brasília, DF, pela permissão na coleta de amostras para estudo.

Aos meus pais e irmãos pelo o amor, carinho e apoio que sempre me deram.

Ao meu namorado Raoni, pelo apoio e confiança nesta etapa da minha vida.

## INDICE

INTRODUÇÃO GERAL.....	02
OBJETIVOS.....	04
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	05
<b>CAPÍTULO 1</b>	
ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ARNICA ( <i>Lychnophora ericoides</i> Less.) USANDO MARCADORES RAPDs.....	06
RESUMO.....	06
ABSTRACT.....	07
INTRODUÇÃO.....	08
FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	11
Recursos Genéticos.....	11
Uso de Marcadores Moleculares.....	12
Marcadores Moleculares baseados em PCR.....	13
Análise Genética com marcadores RAPD.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
Coleta.....	17
Extração do DNA.....	17
Quantificação do DNA.....	18
Seleção de iniciadores e amplificação do DNA.....	18
Análise Genética.....	19
RESULTADOS E DICUSSÃO.....	20
CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICASL.....	25

## **CAPÍTULO 2**

ESTUDO DO COMPORTAMENTO GERMINATIVO DE SEMENTES DE *Lychnophora ericoides* (Less) PARA FINS DE CONSERVAÇÃO DE AQUÊNIOS.....40

RESUMO.....40

ABSTRACT.....41

INTRODUÇÃO.....42

FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....45

    Germinação de sementes.....45

    Tratamentos pré-germinativos.....45

    Protocolo para conservação de aquênios conservação.....48

MATERIAL E MÉTODOS.....51

    Coleta, beneficiamento e seleção de aquênios.....51

    Determinação da umidade.....51

    Teste de germinação.....51

    Estabelecimento de protocolo de conservação.....53

RESULTADO E DISCUSSÃO.....54

    Determinação da umidade.....54

    Teste de germinação.....54

    Estabelecimento de protocolo de conservação.....57

CONCLUSÕES.....60

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....61

## INDICE DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1.1. Relação de locais de coleta de Arnica ( <i>Lychnophora ericoides</i> ) coletadas para estudos de diversidade genética.....	30
Tabela 1.2. Componentes do tampão de extração CTAB 2%.....	31
Tabela 1.3. Componentes do tampão TBE 5X.....	31
Tabela 1.4. Relação de iniciadores utilizados na seleção prévia em amostras de indivíduos de arnica ( <i>L. ericoides</i> ) de diferentes populações do Distrito Federal.....	33
Tabela 1.5. Relação de iniciadores utilizados nas reações RAPDs com respectivas seqüências de bases e número de bandas polimórficas.....	34

### Capítulo 2

Tabela 2.1. Dinâmica do lote de aquênios da Fazenda Água Limpa quanto ao número de aquênios selecionados e não selecionados pelo teste densimétrico e seus respectivos valores de germinação após 21 dias.....	65
Tabela 2.2. Análise de variância dos dados de germinação de aquênios de arnica em 9 temperaturas e 3 tratamentos pré-germinativos.....	66
Tabela 2.3. Teste de Tukey dos dados de germinabilidade do parâmetro temperatura do experimento de germinação de aquênios de arnica ( <i>L. ericoides</i> ). Valores em arco seno....	66
Tabela 2.4. Teste de Tukey dos dados de germinação em arranjo fatorial entre 9 temperaturas de três tratamentos pré-germinativos. Valores em arco seno.....	67
Tabela 2.5. Germinação total final de aquênios de arnica em diferentes temperaturas e tratamentos após 67 dias de contagem. Valores em porcentagem.....	68
Tabela 2.6. Tempo médio de germinação de <i>L. ericoides</i> em diferentes temperaturas e tratamentos pré-germinativos.....	69
Tabela 2.7. Análise de variância dos dados de conservação de aquênios de arnica selecionados densimétrico.....	70
Tabela 2.8. Análise de variância dos dados de conservação de aquênios de arnica ao submetidos ao teste densimétrico.....	70



Tabela 2.9. Teste de Tukey dos dados de germinabilidade do parâmetro período do experimento de conservação de aquênios de arnica ( <i>L. ericoides</i> ) selecionados pelo teste densimétrico. Valores em arco seno.....	71
Tabela 2.10. Teste de Tukey dos dados de germinabilidade do parâmetro período do experimento de conservação de aquênios de arnica ( <i>L. ericoides</i> ) não submetidos ao teste densimétrico. Valores em arco seno.....	71
Tabela 2.11. Porcentagem média de germinação de arnica aos 28 dias em 6 períodos de conservação sob temperatura ambiente, 10°C, -20°C e nitrogênio líquido (NL). Aquênios selecionados pelo teste densimétrico.....	72
Tabela 2.12. Porcentagem média de germinação de arnica aos 28 dias em 6 períodos de conservação sob temperatura ambiente, 10°C, -20°C e nitrogênio líquido (NL). Aquênios não selecionados pelo teste densimétrico.....	73

## INDICE DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1.1. (a) População de Arnica em área rupestre; (b e c) flor em detalhe de *L. ericoides* com presença de formigas e borboleta; (d) plântula de Arnica.....35
- Figura 1.2. Mapa ilustrando locais de coleta de *L. ericoides* na região do Distrito Federal.36
- Figura 1.3. Gel ilustrando reações de RAPD em géis de eletroforese de 2 populações de *L. ericoides* no Parque Nacional de Brasília usando o iniciador OPX 04. As setas indicam as bandas polimórficas.....37
- Figura 1.4 Gel ilustrando reações de RAPD em géis de eletroforese de 2 populações de *L. ericoides* usando o iniciador OPX 04. A seta indica a banda polimórfica identificada (JBB = Jardim Botânico de Brasília).....38
- Figura 1.5. Dendograma ilustrando a dissimilaridade genética entre 4 populações de Arnica (*L. ericoides*).....39

### Capítulo 2

- Figura 2.1. Detalhe da inflorescência (tipo capítulo) de arnica *L. ericoides* em diferentes estágios de maturação.....75
- Figura 2.2. Quatro estágios de germinação de aquênios de arnica. Detalhe evidenciando curvatura inicial da radícula.....76
- Figura 2.3. Efeito de temperaturas constantes e alternadas e de tratamentos pré-germinativos sobre a porcentagem final de germinação de sementes de *Lychnophora ericoides*.....76
- Figura 2.4. Efeito de temperaturas constantes e alternadas e de tratamentos pré-germinativos sobre a germinação acumulada de sementes de *Lychnophora ericoides*.....77
- Figura 2.5. Efeito de diferentes condições de armazenamento num período de doze meses sobre as sementes de *Lychnophora ericoides* não selecionadas (A) e selecionadas (B) pelo teste densimétrico.....78

## RESUMO GERAL

A arnica (*Lychnophora ericoides* Less) tem uso medicinal e toda a planta em infusão no álcool é usada externamente em machucados ou contusões, como anestésico e cicatrizante. São também produzidas pomadas para os mesmos sintomas. Trabalhos científicos citam que a espécie *L. ericoides* apresenta um poder antiinflamatório surpreendente. Empresas de cosméticos têm fabricado sabonete de arnica, indicando-o para eliminar asperezas, rachaduras e suavizar hematomas e contusões. Sua exploração é feita por extrativismo. Apresenta baixa germinação de sementes e seu cultivo não é praticado.

Devido ao uso intensivo da espécie *L. ericoides*, torna-se importante e urgente a obtenção de informações sobre o comportamento germinativo de suas sementes para fins de conservação a longo prazo, visando o manejo da espécie. A importância da conservação é reforçada pela identificação de populações de arnica com diferenças de porte da planta e aroma característico da espécie.

O estudo da conservação do germoplasma, através da análise do comportamento germinativo de aquênios em diferentes temperaturas e pré-tratamentos, associado ao estudo da variabilidade genética de *L. ericoides*, poderá fornecer subsídios para a conservação *ex situ* de aquênios a longo prazo e o manejo sustentado da espécie.

Os objetivos deste trabalho foram: (1) analisar e quantificar a variabilidade genética entre as populações de arnica por meio de marcadores RAPD; (2) definir quais as melhores condições para a germinação de arnica bem como avaliar as possibilidades de sua conservação a longo prazo sob temperaturas ambiente a baixas temperaturas (10°C, -20°C e -196°C).

Foram amostradas quatro populações na região geoeconômica do Distrito Federal: Parque Nacional de Brasília (duas populações, uma aromática-APA e outra não aromática-APN), Fazenda Água Limpa - UnB (uma população aromática-FAL) e Jardim Botânico de Brasília (uma população com indivíduos de menor porte e não aromática-JBB). Folhas de 24 indivíduos de cada região foram coletadas. Os DNAs foram extraídos de acordo com o protocolo CTAB 2%. De um total de 147 iniciadores testados foram selecionados 15,

totalizando 60 bandas polimórficas. Marcadores RAPDs selecionados foram analisados com a utilização dos programas NTSYS e Amova. O dendrograma obtido pelo método UPGMA e o coeficiente de dissimilaridade Dice evidenciaram quatro agrupamentos consistentes. A análise de AMOVA mostrou uma percentagem variabilidade genética entre populações de 35,7% e dentro de populações de 64,3%, evidenciando uma alta variação entre e dentro de populações, sendo um importante resultado para definição de uma estratégia de conservação da espécie que se encontra em situação vulnerável à extinção.

No experimento sobre a germinação foram avaliados os efeitos de nove temperaturas e três tratamentos pré-germinativos sobre a germinação que aquênios selecionados pelo teste densimétrico em água destilada: temperaturas constantes de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C e alternada de 20-30°C em presença de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>), ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e H<sub>2</sub>O (testemunha). As maiores porcentagens de germinação foram obtidas a 20°C na presença de água e a 20-30°C em presença de KNO<sub>3</sub>, 76,5% e 81,5%, respectivamente, não havendo diferença significativa entre estes.

A germinação dos aquênios selecionados e dos não selecionados pelo teste densimétrico foi avaliado no experimento de conservação a longo prazo, armazenados a -196°C, -20°C, 10°C e temperatura ambiente durante o período de um ano, com avaliação bimestral. Os dados mostraram que os aquênios de arnica não sofreram redução da germinabilidade quando submetidos às baixas temperaturas nos períodos analisados, demonstrando que as sementes de arnica são ortodoxas.

O material selecionado apresentou uma percentagem média de germinação variando entre 55,5% e 73,5% e uma uniformidade germinativa em todas as condições do experimento. Já os aquênios não selecionados apresentaram uma percentagem média de germinação, entre 12% e 30,5%, além de um comportamento germinativo desuniforme quando comparado ao material selecionado. O teste densimétrico promoveu uma efetiva seleção de aquênios, aumentando a quantidade de aquênios germinados.

Palavras chaves: Arnica, análise genética, germinação, conservação ex situ, planta medicinal.

## ABSTRACT

Arnica (*Lychnophora ericoides*), is a shrub up to 3m height, which is associated with high altitudes (900-1800m) and rocky soils in the Cerrado biome, mainly in the states of Minas Gerais, Goiás and the Federal District. In traditional medicine, arnica leaves are used in alcoholic infusion beverages and extracts as anti-inflammatory and to treat contusions. Also they are produced cosmetic for the same symptoms. Scientific works cite that species *L. ericoides* presents a surprising antiinflammatory power. Cosmetic companies have manufactured soap of arnica, indicating it to eliminate cracks and to alleviate hematomas and bruises. Its exploration is made by extrativismo. It presents low germination of seeds and its culture is not practised.

Had ericoides the intensive use of species *L.*, the attainment of information becomes in the long run important and urgent on the germinative behavior of its seeds for conservation ends, aiming at the handling of the species. The importance of the conservation is strengthened by the identification of populations of arnica with differences of transport of the plant and characteristic aroma of the species.

Arnica biology and ecology are scarce studied. Considering *L. ericoides* intensive use, information on the germinative behaviour of *L. ericoides* achenes became very important for germplasm conservation.

The main objectives of this work were (1) to analyse and quantify the genetic variability among Arnica populations using RAPD markers; and (2) to evaluate the temperatures and pre-germinative treatments on arnica achenes germination, and the effect of several temperatures on achenes viability.

For the genetic studies, leaves from four populations from the Federal District, Brazil were sampled, based on their geographic distance and organoleptic characteristics: Parque Nacional de Brasília - (2 populations, one scented - APA, and other non-scented - APN), Fazenda Água Limpa - UnB (1 scented population), and Jardim Botânico de Brasília (1 population lower height and non-scented). Scored RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA) were analysed using NTSYS and AMOVA software. The results indicate a high dissimilarity among populations, with an index of 67%. The dendogram

obtained by UPGMA method and Dice's coefficient showed four consistent cluster. An AMOVA analysis presented 35,7% variation among populations, and 64,3% within populations, showing a high variation among populations.

For the germination studies, achenes selected based on densimetric method, were used constant temperatures of 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C and alternating 20-30°C in the presence of potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>), gibberelic acid (GA<sub>3</sub>) and H<sub>2</sub>O. After the determination of the best germination condition, samples from selected and non selected achenes by densimetric method were stored at -196°C, -20°C, 10°C and environment temperature during one year. Germinability was evaluated every two months. The highest germination percentages were obtained at incubation temperatures of highest 20°C, in the presence of H<sub>2</sub>O (76.5%) and 20-30°C, in the presence of KNO<sub>3</sub> (81.5%), with no statistical significant difference between these two values. Arnica achenes did not have reduced their germinability when stored at low temperatures, during the experiment time, showing that arnica seeds can be considered orthodox. Selected achenes presented a germination average percentage varying between 55.5% and 73.5%, and a germinative uniformity in all experimental conditions. Non selected achenes showed a germination average percentage between 12% and 30.5%, besides the desuniform germinative behaviour when compared to the selected achenes. Densimetric test promote an effective selection of achenes, increasing the number of seeds germinated.

This is an important result for conservation strategy for such species considered vulnerable to extinction. Also, it indicates that seed collection must consider a large number of populations sampled, preserving a higher genetic diversity of this species from different locations.

Key words: arnica, genetic analysis, germination, conservation, medicinal plants

## INTRODUÇÃO GERAL

O Cerrado ocupa uma área de aproximadamente 2 milhões de km<sup>2</sup>, representando cerca de 23% do território brasileiro, possui uma alta biodiversidade, com cerca de 160.000 espécies descritas, incluindo plantas, animais e fungos. O número de arbustos e árvores no cerrado *sensu stricto* pode exceder a 800 espécies, das quais aproximadamente 40% são endêmicas. O Cerrado é considerado um dos ecossistemas mais ameaçados do Brasil, ao lado da Floresta Atlântica, principalmente devido à expansão da fronteira agrícola.

O Cerrado contém uma flora medicinal riquíssima. Estudos realizados pelo Projeto PROBIO em 2005 (Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira) relatam cerca de 700 espécies utilizadas na medicina popular. Porém a grande maioria destas espécies requer estudos básicos que viabilizem sua conservação.

Apesar da riqueza florística existente no Cerrado e da grande importância de seu uso medicinal pela população, as estimativas mais otimistas citam que menos de 1% deste potencial já foi quimicamente estudado (Gottlieb 1981 apud Plottikin 1991). Gottlieb & Kaplan (1990) advertem que, considerando o potencial taxonômico disponível e a enorme velocidade de extinção de espécies pela destruição dos seus ecossistemas, é provável que nem 5% destas sejam adicionadas ao conhecimento disponível antes que sejam extintas. Da flora do cerrado, é provável que menos de 3% já tenham sido estudado cientificamente.

Nos últimos anos a flora do Cerrado tem despertado interesse de muitos setores da indústria, em particular do ramo farmacêutico. A descoberta de novos e importantes princípios bioativos no Cerrado tem provocado um aumento no extrativismo das plantas ditas medicinais, e com isso acelerando o processo de extinção de muitas destas espécies. Este fato vem chamando a atenção para a necessidade de estudos preconizando-se alternativas de recuperação e conservação dos recursos naturais, antes que muitas destas espécies desapareçam sem terem sido estudadas.

Em uma avaliação da situação das plantas nativas do Cerrado com potencial econômico, Barros (1997) constatou que: (a) a vegetação do Cerrado abriga uma grande riqueza de espécies úteis ao homem; (b) parte do conhecimento destas espécies está nas mãos de leigos, como mateiros e raizeiros, que muitas vezes usam as plantas de maneira

predatória, arrancando as estruturas férteis; (c) o desmatamento aleatório causado pela ação antrópica (instalação de núcleos urbanos) vem dizimando rapidamente a flora nativa, causando desequilíbrio ecológico entre as plantas e a fauna dependente; (d) há falta de dados sobre o “status” de conservação das plantas, pelo fato de não existirem planos de manejo adequados; (e) finalmente, há pouco interesse por parte dos órgãos governamentais no sentido de criar programas experimentais de manejo e de fiscalização do uso das espécies vegetais para a garantia de sua preservação e legado às gerações futuras.

A conservação de plantas medicinais do Cerrado é fundamental como estratégia para garantir a sobrevivência da sua variabilidade genética, possibilitando futuros trabalhos de prospecção gênica e de metabólitos secundários.

Várias espécies da flora do Distrito Federal podem ser consideradas “ameaçadas de extinção”, pelo número reduzido de indivíduos, por serem alvo de extrativismo predatório ou por predominarem em ambientes ou locais muito vulneráveis à ação antrópica. Este elenco inclui, entre outras, a *Lychnophora ericoides* (Vieira *et al*, 1994; Filgueiras & Pereira, 1994), presente inclusive na Lista Oficial de Espécies Ameaçadas de Extinção - IBAMA (Sociedade Botânica do Brasil, 1992), que a colocou na categoria das espécies vulneráveis, i. e., pertencente aos “taxa” cujas populações encontram-se em declínio em consequência de sua exploração excessiva, destruição dos *habitats* ou outra alteração ambiental e cuja sobrevivência definitiva ainda não tenha sido assegurada, o que poderá levar a espécie à extinção.

A velocidade de extinção das espécies no Brasil causará não somente a perda de substâncias terapêuticas valiosas, mas também de genes que codificam enzimas com uso potencial no melhoramento vegetal e estudos biossintéticos de novos produtos naturais. Dessa forma, o estudo da variabilidade genética das espécies presentes nesse tipo de ambiente é de suma importância para avaliar a probabilidade de persistência das espécies nos remanescentes de Cerrado.

Muitas das espécies da família Asteraceae estão entre as plantas medicinais brasileiras utilizadas popularmente. Análises fitoquímicas de espécies desta família encontraram, entre as substâncias produzidas, lactonas sesquiterpênicas, diterpenos,



flavonóides e oliacetatos. Em testes biológicos, lactonas demonstraram pronunciada atividade citotóxica, antiinflamatória, antifúngica e flavonóides, atividade citotóxica, antimicrobiana, diurética, antioxidante e alelopática (Paron, 2002).

Uma das espécies mais comuns é a *L. ericoides*, muito utilizada popularmente devido suas propriedades. Estudos de atividade biológica revelaram efeitos antiinflamatório do extrato polar (Rizzo, 1981). O extrato bruto liofilizado das folhas foi testado quanto à atividade analgésica em ratos, com resultados semelhantes aos da dipirona.

Os estudos sobre a ecologia e a biologia de arnica (*L. ericoides*) são escassos. Devido ao uso intensivo, torna-se importante e urgente a obtenção de informações científicas visando futuramente o manejo racional da espécie, evitando o seu desaparecimento.

#### OBJETIVO GERAL

Conhecer e avaliar a variabilidade genética entre e dentro de 4 populações de arnica (*Lychnophora ericoides*) e gerar conhecimentos baseados em ensaios de germinação e conservação de sementes, contribuindo com informações relevantes para a conservação *ex situ* da espécie.

#### **Objetivos Específicos:**

1. Analisar e quantificar a variabilidade genética entre as populações de arnica por meio de marcadores RAPD e esclarecer se as diferenças de porte e presença ou ausência do aroma característico da espécie reflete em diferenças genéticas entre as populações analisadas.
2. Definir quais as melhores condições para a germinação de arnica bem como avaliar as possibilidade de sua conservação a longo prazo sob temperaturas ambiente a baixas temperaturas (10°C, -20°C e -196°C).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, M.A.G. Avaliação da ação antrópica sobre as plantas do Cerrado com potencial econômico. In: Leite, L.L.; Saito, C.H., org. **Contribuição ao Conhecimento Ecológico do Cerrado**. UnB. Brasília, DF. p.257-261, 1997.

DIAS, B.F.S. Cerrado: uma caracterização. In: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais/Fundação Pró-Natura. **Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos renováveis**. Brasília, DF. p.11-34,1992.

FILGUEIRAS, T.S.; PEREIRA, B.A.S. Vegetação do Cerrado. In: Pinto, M.N., org. **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. 2ª ed. UnB / SEMATEC. Brasília, DF. p.345-404, 1994.

GOTTLIEB, O.R., M.A.C. KAPLAN. Amazônia: Tesouro químico a preservar. **Ciência Hoje**, 11(61):17-20, 1990.

VIEIRA, R.F.; SKORUPA, L.A.; SILVA, O.A.; WALTER, B.M.T.; MARTINS, M.V.. Contribuição ao estudo das espécies medicinais do cerrado. Levantamento Preliminar I. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 13., Fortaleza, CE. **Resumo de temas livres**. Fortaleza, CE. 209p. 1994.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v.3, n.1, p. 13-36, 2000.

## CAPITULO 1

### ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE ARNICA (*Lychnophora ericoides* Less.) USANDO MARCADORES RAPDs

#### RESUMO

A arnica (*Lychnophora ericoides* Less.) é um arbusto de até 3,0 m que ocorre em locais íngremes e rochosos em áreas elevadas entre 950 a 1800 m no bioma Cerrado, particularmente nos Estados de Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal. Na medicina popular, as folhas de arnica são usadas em forma de garrafadas e tinturas como cicatrizante para tratar contusões. O objetivo deste trabalho é analisar e quantificar a variabilidade genética entre e dentro de populações de arnica por meio de uso de marcadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA). Foram usadas folhas expandidas e sadias de quatro populações no Distrito Federal, baseado em sua distância geográfica e características organolépticas: Parque Nacional de Brasília (2 populações, uma aromática e outra não aromática), Fazenda Água Limpa - UnB (1 população aromática), e Jardim Botânico de Brasília (1 população de menor porte e não aromática). Marcadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) scoreados foram analisados com a utilização do programa NTSYS e AMOVA. Os resultados indicam uma alta dissimilaridade entre populações, com um índice de 67%. O dendrograma obtido pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade Dice evidenciou quatro agrupamentos consistentes. A análise de AMOVA mostrou uma variabilidade genética entre populações de 35,7% e dentro de populações de 64,3%, evidenciando uma alta variação entre populações. Este é um importante resultado para definição de estratégias de conservação da espécie que se encontra em situação vulnerável à extinção, indicando que a conservação de sementes deve considerar um grande número de populações, no sentido de salvaguardar maior diversidade genética da espécie existente nos diferentes locais de ocorrência.

Palavras-chaves: arnica, análise genética, recursos genéticos, marcador molecular

## ABSTRACT

*Arnica* (*Lychnophora ericoides*), is a shrub up to 3m height, which is associated with high altitudes (900-1800m) and rocky soils in the Cerrado biome, mainly in the states of Minas Gerais, Goiás e the Federal District. In the traditional medicine, arnica leaves are used in in alcoholic infusion beverages and extracts as anti-inflammatory and to treat contusions. The main objective of this work was to analyse and quantify the genetic variability among arnica populations using RAPD markers. Leaves from four populations from Federal District, Brazil area were sampled: Parque Nacional de Brasília - (2 populations, one scented, and other non-scented), Fazenda Água Limpa - UnB (1 scented population), e Jardim Botânico de Brasília (1 population lower height and non-scented). Scored RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA) were analysed using NTSYS and AMOVA software. The results indicate a high dissimilarity among populations, with an index of 67%. The dendogram obtained by UPGMA method and Dice's coefficient showed four consistent cluster. An AMOVA analysis presented 35,7% variation among populations, and 64,3% within populations, showing a high variation among populations. This is an important result for conservation strategy for such species considered vulnerable to extinction. Also, it indicates that seed collection must consider a large number of populations sampled, preserving a higher genetic diversity of this species from different locations.

Key words: arnica, genetic analysis, genetic resources, molecular marker.

## INTRODUÇÃO

O Cerrado (*latu sensu*) ocupa uma área de aproximadamente 2 milhões de km<sup>2</sup>, representando cerca de 23% do território brasileiro, distribuído principalmente no Planalto Central (Furley & Ratter, 1988). Este Bioma consiste de uma vegetação heterogênea, desde floresta mesofítica até uma vegetação savânica, com arbustos e árvores de pequeno porte (cerrado *sensu stricto*) e campos, que podem ou não apresentar árvores e arbustos esparsos. Muitos fatores podem afetar a distribuição das espécies de plantas no Cerrado, como o clima, fertilidade e pH do solo, disponibilidade de água, geomorfologia e topografia, latitude, frequência de fogo e fatores antrópicos, além da interação complexa entre estes fatores (Furley & Ratter, 1988). O Cerrado possui uma alta biodiversidade, com cerca de 160.000 espécies descritas, incluindo plantas, animais e fungos. O número de arbustos e árvores no cerrado *sensu stricto* pode exceder a 800 espécies, das quais aproximadamente 40% são endêmicas (Ratter *et al.*, 1997).

O Cerrado é considerado um dos ecossistemas mais ameaçados do Brasil, ao lado da Floresta Atlântica, principalmente pela expansão da fronteira agrícola, e praticamente nada se sabe a respeito da diversidade genética das espécies e como ela está organizada espacialmente nesse bioma. Atualmente, cerca de 47 milhões de hectares do Cerrado estão ocupados com áreas agrícolas, como pastagens cultivadas, culturas anuais e perenes, o que corresponde a 23% do território do Cerrado. Estima-se uma área potencial de 89 milhões de hectares para uso agrícola futuro, que irá resultar em 136 milhões de hectares de ocupação agrícola do cerrado, ou 66% de todo o Cerrado (Ratter *et al.*, 1997), provocando uma maior fragmentação do ecossistema original.

Várias espécies da flora do Distrito Federal podem ser consideradas “ameaçadas de extinção”, pelo número reduzido de indivíduos, por serem alvo de extrativismo predatório ou por predominarem em ambientes ou locais muito vulneráveis à ação antrópica. Este elenco inclui, entre outras, a *Lychnophora ericoides* Less (Vieira *et al.*, 1994; Filgueiras & Pereira, 1994), presente inclusive na Lista Oficial de Espécies Ameaçadas de Extinção – Ibama – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. A Sociedade

Botânica do Brasil (1992) a colocou-a na categoria das espécies vulneráveis, isto é, pertencente aos “taxa” cujas populações encontram-se em declínio em consequência de sua exploração excessiva, destruição dos habitats ou outra alteração ambiental e cuja sobrevivência definitiva ainda não tenha sido assegurada, o que poderá levar a espécie à extinção. Em uma avaliação da situação das plantas nativas do Cerrado com potencial econômico, Barros (1997) constatou que: (a) a vegetação do Cerrado abriga uma grande riqueza de espécies úteis ao homem; (b) parte do conhecimento destas espécies está nas mãos de leigos, como mateiros e raizeiros, que muitas vezes usam as plantas de maneira predatória, arrancando as estruturas férteis; (c) o desmatamento aleatório causado pela ação antrópica (instalação de núcleos urbanos) vem dizimando rapidamente a flora nativa, causando desequilíbrio ecológico entre as plantas e a fauna dependente; (d) há falta de dados sobre o “status” de conservação das plantas, pelo fato de não existirem planos de manejo adequados; (e) finalmente, há pouco interesse por parte dos órgãos governamentais no sentido de criar programas experimentais de manejo e de fiscalização do uso das espécies vegetais para a garantia de sua preservação e legado às gerações futuras.

A conservação de plantas medicinais do Cerrado é fundamental como estratégia para garantir a sobrevivência da sua variabilidade genética, possibilitando futuros trabalhos de prospecção de metabólitos secundários. O cerrado contém uma flora medicinal riquíssima, com cerca de 700 espécies utilizadas na medicina popular (Plantas do Futuro, 2006), porém a grande maioria destas espécies requer de estudos básicos que viabilizem sua conservação.

Dessa forma, o estudo da variabilidade genética das espécies presentes nesse tipo de ambiente é de suma importância para avaliar a probabilidade de persistência das espécies nos remanescentes de Cerrado.

Arnica (*Lychnophora ericoides* Less - Asteraceae), é também conhecida como arnica de goiás, arnica do campo, candeia, candieiro, pau de candeia, veludinho. *Lychnophora ericoides* é marcadamente endêmica; habita o Cerrado geralmente associada a campos rupestres ou a solos rasos e pedregosos. A arnica é uma espécie arbustiva, de até 3 m de altura; com fruto do tipo aquênio, possui folhas lineares e estreitas (1-3 mm de largura) e

inflorescências formadas por glomérulos contendo capítulos de 3-5 flores violáceas (Figura 1.1).

A arnica é utilizada tradicionalmente na forma de tintura para o tratamento de hematomas, contusões, dores musculares, varizes e também como anti-inflamatório. Estudos realizados na Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto, USP, já identificaram mais de 50 padrões de compostos químicos nos diferentes extratos de *L. ericoides*, destacando-se lactonas sesquiterpênicas, flavonoides e esteroides. Em *L. salicifolia* foi recentemente detectada ação antiinflamatória (Miguel *et al.*, 1996). Além disso, descobriu-se que as raízes e as folhas de *L. ericoides* produzem as substâncias anti-inflamatórias, enquanto os analgésicos estão apenas na raiz e o caule não produz substâncias de interesse farmacológico (Lopes, 2001).

Substâncias presentes como goiasensolido e centraterina, lactonas sesquiterpênicas, são inibidores do mensageiro celular responsável pelo início da inflamação, evitando a formação das proteínas que desencadeiam o processo inflamatório (Paron, 2002).

A obtenção e análise de dados genotípicos discretos, a partir de marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é uma técnica relativamente barata frente à quantidade de informações obtidas, pode ser aplicada a qualquer espécie, envolve amostragens não-destrutivas e gera informações interpretáveis geneticamente atendendo de forma rápida às demandas existentes em programas de conservação de espécies ameaçadas. (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

O objetivo deste estudo é a caracterização genética de populações de arnica (*Lychnophora ericoides*) visando conhecer e avaliar a sua variabilidade genética, sendo uma ferramenta importante para a elaboração de estratégias de conservação para a espécie.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### Recursos Genéticos

De acordo com a Convenção sobre a Diversidade Biológica, entende-se por recurso genético o material genético de valor real ou potencial para o ser humano. Material genético significa todo material de origem vegetal, animal ou microbiana, ou outra que contenha unidades funcionais de hereditariedade. Recursos biológicos compreendem recursos genéticos, organismos ou parte destes, populações, ou qualquer outro componente biótico de ecossistema de real ou potencial utilidade ou valor para a humanidade. Então, para ser considerada “recurso”, uma espécie deve ter alguma utilidade ou interesse mundial, regional ou local de ter valor real ou potencial para a humanidade (Walter, 2000).

No caso específico dos recursos fitogenéticos, ao qual fazem parte as espécies vegetais mais importantes para o homem, estão incluídas: plantas cultivadas e seus parentes silvestres; e espécies silvestres, ainda não cultivadas, que possuam importância atual ou potencial, seja ela econômica ou social, e que seja, utilizadas pela pesquisa (Hoyt, 1992).

A conservação dos recursos genéticos de plantas cultivadas e silvestres é uma das questões mais importantes e controversas para a humanidade. Algumas variáveis podem provocar uma modificação na agricultura, como o crescimento populacional acelerado e cada vez mais intenso e alterações climáticas que podem perturbar o ambiente. A conservação dos recursos genéticos é essencial para torna-los disponíveis para uso futuro de utilidade para o homem como o melhoramento genético, o qual encontra sua principal ferramenta nos materiais silvestres (Hoyt, 1992).

Para a conservação de germoplasma, termo definido como todo o material hereditário de uma espécie, ou ainda, todo o patrimônio genético de uma espécie, têm-se usado diversos métodos, divididos em duas categorias: (a) conservação *ex situ*, que significa que as plantas são conservadas fora do seu habitat natural onde são utilizadas sementes, plantas, parte de plantas, tecidos ou células que são conservados em ambiente artificial, contando com três métodos de conservação: bancos de sementes; bancos de germoplasma *in vivo*; e cultura de tecidos; (b) conservação *in situ*, que significa que as



plantas são conservadas dentro de seus *habitats* naturais em reservas e áreas protegidas (Biodiversidade Brasileira, 2002).

Muitas espécies vegetais possuem sementes que podem ter seu teor de umidade reduzido e armazenadas em baixas temperaturas sem perder a viabilidade. Sob condições de armazenamento recomendadas para os bancos de sementes, algumas delas podem sobreviver por até cem anos, porém é necessário um controle regular para constatar a viabilidade e possíveis danos. As amostras devem ser regeneradas antes que comece a se deteriorar, de modo que se possa obter uma nova geração de sementes para continuar o armazenamento (Hoyt, 1992).

As espécies que não produzem sementes com facilidade e aquelas com sementes que não podem se desidratadas sem provocar danos às mesmas têm sido conservadas em bancos de germoplasma *in vivo*, que são áreas onde se reúne coleções de plantas vivas, em jardins botânicos, arboretos ou outras plantações. Geralmente os bancos de germoplasma *in vivo* são estabelecidos para manter coleções de trabalho de plantas vivas com fins experimentais (Hoyt, 1992).

### **Uso de marcadores moleculares**

Marcadores moleculares são características do DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente. O uso desta ferramenta facilitou o trabalho de melhoramento genético de plantas, pois fornece um número ilimitado de polimorfismos com base no DNA além de serem independentes dos efeitos ambientais e do estágio fenológico da planta. Permitem a identificação precoce e precisa de indivíduos com uma melhor combinação de alelos favoráveis (Lanza *et al.*, 2000).

Até a década de 60 utilizava-se em estudos genéticos os marcadores morfológicos, geralmente fenótipos de fácil identificação (nanismo, deficiência clorótica, cor de pétalas, ou morfologia foliar), porém traziam a desvantagem de serem muito trabalhosos e facilmente afetados por genes que controlam outros caracteres. Além disso, a disponibilidade de marcadores morfológicos era restrita às poucas espécies de plantas utilizadas como modelo para o estudo da genética, como milho, tomate e ervilha. Foi a

partir da década de 70 que surgiram então os marcadores moleculares, que são isoenzimas ou fragmentos de DNA que podem caracterizar o genótipo de um indivíduo a partir de amostras de células ou tecidos, com a vantagem de poderem ser utilizados em qualquer estágio de crescimento do indivíduo e a aplicabilidade da técnica passou a incluir potencialmente todas as espécies de plantas.

A partir da década de 80 novas formas de marcadores moleculares foram sendo utilizados, primeiramente o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) com a utilização de enzimas de restrição permitindo análise de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição de DNA. Em seguida o surgimento dos minissatélites (VNTR – Variable Number of Tandem Repeats), com o uso de diversas classes de seqüência repetitivas de DNA e os PCR (Polymerase Chain Reaction) com processo de amplificação em cadeia utilizando uma DNA polimerase. O grande avanço na área ocorreu em 1990 com a idéia de se utilizar *Primers*, ou iniciadores, que são seqüências curtas de DNA, que parecia com o DNA-molde e servem de iniciadores para a síntese *in vitro* de uma nova fita de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998; Lanza *et al.*, 2000), eliminando assim o conhecimento prévio da seqüência. Esta técnica recebeu o nome de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ou DNA polimórfico amplificado ao acaso, tem sido usado em áreas nunca antes contempladas. Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998) envolve basicamente quatro aplicações:

- 1) obtenção de *fingerprints* (impressão digital) genômico de indivíduos, variedades e populações;
- 2) análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, populações de melhoramento e bancos de germoplasma;
- 3) estabelecimento de relacionamentos filogenéticos entre diferentes espécies;
- 4) a construção de mapas genéticos de alta cobertura genômica e a localização de genes de interesse econômico.

### **Marcadores moleculares baseados em PCR**

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (“PCR- Polymerase Chain

Reaction”) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80. Por ser fácil, rápida e versátil, a PCR tornou-se uma técnica poderosa para estudos genéticos moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo, substituindo os métodos tradicionais de clonagem, sequenciamento e análise de polimorfismo de DNA. Uma das variações da PCR é a tecnologia RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) ou DNA polimórfico amplificado ao acaso, que envolve a amplificação simultânea de vários locos anônimos do genoma utilizando iniciadores de seqüência arbitrária (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

A técnica PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima *Taq* polimerase. A reação PCR se baseia em 3 etapas: desnaturação, anelamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA de fita simples) utilizados como iniciadores (“primers”) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. A reação de PCR é iniciada pela separação das fitas duplas de DNA alvo pela elevação da temperatura para 92°C a 95°C (desnaturação). A temperatura é então reduzida para 35 a 60°C para que ocorra o anelamento dos *primers* com o DNA alvo e posteriormente elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase possa atuar extendendo um novo fragmento a partir de cada extremidade 3’ dos *primers*. Inicialmente, a enzima utilizada para a reação de PCR era a DNA polimerase de *Escherichia coli* que, por ser termolábil, era adicionada a cada ciclo de reação, pois era destruída toda vez que a temperatura era elevada para 95°C no processo de desnaturação. Atualmente, é utilizada a DNA polimerase isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus*, chamada de *Taq* polimerase, possibilitando a completa automatização da reação (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O fragmento produzido na reação anterior serve também como molde para a reação seguinte, assim, a amplificação do DNA segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, é produzida mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo. Com esta escala de amplificação é possível iniciar com quantidades mínimas de DNA, da ordem de alguns picogramas ou nanogramas. Em função da grande

quantidade de DNA produzido, o segmento amplificado pode ser visualizado diretamente sob a forma de uma banda num gel de eletroforese, sendo esta conduzida em gel de agarose com a visualização feita com brometo de etídio em luz ultravioleta (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Apesar de alta tecnologia, a PCR é muito sensível às alterações nas condições de amplificação, impurezas no DNA e qualidade dos reagentes.

### **Análise genética com marcadores RAPD**

A técnica RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), DNA polimórfico amplificado ao acaso, foi desenvolvida em 1990 a partir do PCR pela utilização de iniciadores mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando a necessidade do conhecimento prévio de seqüência.

A técnica RAPD permite gerar uma grande quantidade de polimorfismo de segmentos de DNA, distribuídos por todo o genoma do organismo e ainda oferece a possibilidade de amostrar regiões de DNA repetitivo, uma vez que os iniciadores utilizados para detecção da variação ao nível de DNA são arbitrários. Além disso, oferece uma técnica alternativa de clonagem de segmentos genômicos, extremamente simples e eficiente. A detecção do polimorfismo se dá pela visualização de forma direta das bandas no gel. Esses segmentos RAPD uma vez amplificados e separados por eletroforese podem ser facilmente isolados do gel, mantidos na forma de uma biblioteca genômica “in vitro” sem a necessidade de vetores, e amplificados via PCR quando necessário. O custo da técnica RAPD é mais baixo e exige um menor número de reagentes do que a técnica RFLP (Ferreira & Grattapaglia 1998).

O uso da técnica RAPD não exige experiência aprofundada em biologia molecular e nem tampouco instalações sofisticadas de laboratório. Experimentos típicos de programas de melhoramento, análise de diversidade genética em populações naturais e caracterização de bancos de germoplasma envolvem tipicamente centenas ou milhares de indivíduos. Neste contexto, a técnica RAPD é uma das poucas ferramentas disponíveis hoje que efetivamente permite a análise genética detalhadas para um grande número de marcadores.

O fato de o polimorfismo RAPD ter natureza binária (presença ou ausência da banda), se por um lado não permite a distinção de heterozigotos, é uma característica mais adequada hoje para uma automatização do processo de aquisição de dados dentro da sistemática binária de ambientes computacionais (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O baixo conteúdo de informação genética por loco é a principal limitação dos marcadores RAPD. Genótipos heterozigotos e homozigotos não podem ser diretamente discriminados pela técnica RAPD, limitação esta descrita como “dominância” dos marcadores RAPD.

A possibilidade de se obter um grande número de marcadores genéticos sem qualquer informação prévia sobre a genética do organismo, a rapidez e simplicidade na aquisição dos dados, o baixo custo e acessibilidade desta tecnologia foram os fatores levados em consideração para a escolha do RAPD na realização deste trabalho.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta

Foram coletadas amostras de folhas expandidas e sadias de indivíduos procedentes de 4 populações da região do Distrito Federal: Parque Nacional de Brasília, DF (2 populações, uma aromática (APA) e outra não aromática (APN), Fazenda Água Limpa (FAL), UnB, DF (1 população aromática), e Jardim Botânico de Brasília (JBB), DF (1 população não aromática com indivíduos de menor porte) (Tabela 1.1., Figura 1.2.) Amostras de cada população foram coletadas e depositadas no herbário da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN). Foi extraído DNA de folhas de 24 indivíduos por população e preservados sob refrigeração.

### Extração do DNA

Para extração do DNA, foram utilizados aproximadamente 150mg a 200mg de tecido vegetal com 2 repetições da cada acesso. O tecido vegetal foi colocado em tubo eppendorf e macerado com nitrogênio líquido até a formação de um pó fino. Utilizou-se 700µl do tampão CTAB com 2µl/ml de 2-mercaptoetanol, adicionado imediatamente antes da extração (Tabela 1.2.). Após homogeneização, o material permaneceu por 45 minutos em banho-maria a 65° C, sendo agitado a cada 10 minutos. Após resfriamento, foi adicionado 600µl de CIA 24:1 (clorofórmio álcool isoamílico), agitado por inversão durante 5 minutos e centrifugado à 10000 rpm por 10 min. A fase aquosa superior foi transferida para novos tubos e identificados, adicionando-se a seguir 300µl de isopropanol frio e invertendo os tubos delicadamente para precipitação dos ácidos nucleicos. Os tubos foram resfriados em freezer (-20°C) por 2 horas, centrifugados 10000 rpm por 10 min, descartando-se o sobrenadante. O *pellet* foi lavado 2 vezes com etanol a 70% e uma vez a 95%, evaporando-se o etanol completamente a temperatura ambiente ou por centrifugação a vácuo por 10 minutos. Adicionou-se TE-RNase de acordo com o tamanho do *pellet* para a degradação do RNA. Após dissolvido o *pellet*, os tubos contendo o DNA foram mantidos no freezer a -20°C, sendo descongelados, mantidos ainda resfriados em gelo, apenas antes do uso.

### **Quantificação do DNA**

Alíquotas de 2µl de cada amostra de DNA foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose (TBE 1,0%) homogeneizadas com 2µl de tampão de carregamento. Quantidades conhecidas de DNA de *phago*; 50, 100, 200 e 400 ng, foram dispostas nos primeiros poços do gel de agarose para estimar a quantidade de DNA de cada indivíduo. O gel foi transferido para uma cuba e encoberto com tampão TBE 1X (Tabela 1.3.) e submetido a uma corrente de 72 V, 38 mA por aproximadamente 1 hora, ou o tempo necessário para o arraste de 3 cm do DNA para o polo positivo do sistema. O DNA foi fotografado para a quantificação e soluções estoque de 300µl (2,5ng/µl) de cada amostra foram preparadas a partir da concentração de cada indivíduo e armazenadas em freezer – 20°C.

### **Seleção de iniciadores e amplificação do DNA**

A seleção de iniciadores foi realizado usando 8 acessos de populações diferentes em cada reação de amplificação testando 12 primers (Operon Technologies).

Amplificações foram realizadas usando uma solução de 13µl contendo para cada reação: 3,42µl de água destilada; 1,04 µl de dNTP; 1,04µl de BSA, 0,2µl de *Taq* polimerase, e 3µl de primer, totalizando 10µl. A quantidade de DNA utilizada foi de 3µl em cada reação na concentração de 2,5 ng/µl. Foi preparado um coquetel para 96 reações.

As reações de amplificação foram realizadas em placas semi-flexíveis contendo 96 poços. Primeiro foi feita a distribuição do DNA com pipetas de precisão, utilizando uma ponteira para cada acesso, que corresponde a um poço da placa.

Em seguida, 10µl do coquetel foi distribuído em cada um dos 96 poços usando uma pipeta de repetição. Foram adicionados ainda, 10 ul de óleo mineral em cada poço para prevenir a evaporação da solução aquosa da reação. As amplificações foram realizadas em termociclador (PTC –100, MJ Research, Inc) com 40 ciclos de denaturação por 60 min a 92°C, anelamento do primer por 60 min a 35 °C, e extensão pela *Taq* polimerase e

incorporação de nucleotídeos por 2 min a 72°C, com duração total de 4 a 5 horas.

Terminada a reação de RAPD foram adicionados 2µl de tampão de carregamento em cada poço misturando-se com a fase aquosa da reação conferindo uma coloração azul. As placas contendo o DNA já amplificado foram mantidas na geladeira por alguns dias quando não foi possível a análise imediata em gel de eletroforese.

Os produtos amplificados (fragmentos de DNA) foram separados por eletroforese em gel de agarose (TBE 1,5%), previamente adicionado de brometo de etila, a 120 V, por 4 - 5 horas. Os 96 acessos foram carregados em um único gel, contendo 2 pentes com 50 poços cada um. No primeiro e no 26º poços foram adicionados 12µl de padrão de fragmentos de peso molecular Ladder 1Kb para estimar o tamanho das bandas em pares de bases. Dessa forma, antes de cada população, que contém 24 indivíduos, está um padrão, ficando as populações separadas, facilitando a identificação das bandas polimórficas.

### **Análise Genética**

Em cada reação, as bandas polimórficas foram identificadas de acordo com o iniciador e tamanho em pares de bases, e escoreadas como presença ou ausência do fragmento polimórfico para cada um dos 72 indivíduos.

Os dados obtidos foram utilizados na geração de uma matriz de valores binários. O coeficiente de Dice foi utilizado para a estimar dissimilaridade genética entre as populações de arnica, sendo obtido o dendrograma pelo método da média aritmética não ponderada para agrupamento aos pares (UPGMA-*Unweighted Pair Group Arithmetic Average*), utilizando-se o programa NTSYS 2.0 – *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Systems* (Rohlf, 1992). A estabilidade dos agrupamentos foi testada pela reamostragem pelo procedimento de 10.000 bootstrap, utilizando o programa BooP (Coelho, 2002). Análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada usando o programa Arlequin (Excoffier, 1992).



## RESULTADOS E DICUSSÃO

As populações de *L. ericoides* existentes no DF apresentam um alto grau de exploração extrativista, o que exige uma atenção a curto prazo, desenvolvendo estratégias para conservação de seu germoplasma. Dentre as populações selecionadas para este estudo, as duas populações existentes na área do Parque Nacional de Brasília apresentam diferenças quanto ao seu aroma, sendo uma predominantemente aromática (APA), assim como os indivíduos da população da Fazenda Água Limpa (FAL), e a outra não apresentando aroma característico (APN), o que já foi evidenciado em análise dos óleos essenciais. Assim, é importante que estas diferenças sejam consideradas no trabalho de preservação da espécie, uma vez que podem estar relacionadas às propriedades medicinais.

Outra população que merece destaque pelas suas características é a da reserva do Jardim Botânico de Brasília (JBB), que apresenta indivíduos adultos de porte reduzido, não ultrapassando 30 cm de altura, em contraste com as demais populações que possuem hábito arbustivo com 1,0 a 3,0 m de altura.

Para a análise da variabilidade genética, foi testado um total de 147 iniciadores (Tabela 1.4) sendo selecionados 15, gerando um total de 60 bandas polimórficas. Os iniciadores selecionados, apresentando uma média de 4 bandas/iniciador (Tabela. 1.5), foram utilizados em reações com os 96 indivíduos totais.

O material de arnica apresentou baixo rendimento na extração de DNA se comparado ao rendimento de outras espécies. Foram necessárias duas extrações de cada indivíduo para aumentar o rendimento.

Os indivíduos que apresentaram baixa qualidade do DNA e/ou baixo rendimento nas reações com bandas pouco nítidas que prejudicariam o resultado final foram excluídos da análise, totalizando ao final 72 indivíduos analisados: 15 indivíduos aromáticos do Parque Nacional de Brasília (APA), 18 indivíduos não aromáticos do Parque Nacional de Brasília (APN), 19 indivíduos Fazenda Água Limpa (FAL) e 20 indivíduos Jardim Botânico de Brasília (JBB). As Figura 1.4 e 1.5 ilustram uma reação RAPD com as 4 populações de arnica.

O tamanho das bandas variou entre 450 e 2036 pares de bases nos diferentes

primers. Com um total de 60 bandas polimórficas foi possível separação das 4 populações.

Muito embora diversas espécies medicinais já tenham sido estudadas com RAPD, é difícil estabelecer uma comparação quanto ao rendimento e qualidade de DNA entre estas, uma vez que pertencem a diferentes grupos taxonômicos. Entretanto, observa-se que em outras espécies medicinais, tais como Ginseng (*Panax spp.*) e Echinacea (*Echinacea spp.*), foi obtida uma boa discriminação dos acessos com um número reduzido de iniciadores que permitiam uma boa contagem de bandas polimórficas (Wolf *et al.*, 1999; Bai, 1997). O número de iniciadores testados inicialmente varia bastante com a espécie estudada. No caso de *L. ericoides*, até então, não havia nenhum histórico de seleção de iniciadores. Em outras espécies como *Hypericum perforatum*, *Echinacea sp.* e *Digitalis obscura*, foram testados, respectivamente, 44, 57 e 6 primers.

De acordo com Lacerda *et al.* (2002), os marcadores RAPD são extremamente valiosos para estimar de parâmetros genéticos em curto prazo, especialmente em espécies desconhecida geneticamente, como no caso de *L. ericoides*.

A análise dos dados evidenciou a separação das amostras de arnica em três grupos distintos: o primeiro formado por indivíduos não aromáticos do Parque Nacional (APN); o segundo contendo os indivíduos aromáticos das populações do Parque Nacional (APA) e da Fazenda Água Limpa (FAL); e o terceiro constituído pelos indivíduos do Jardim Botânico de Brasília (JBB).

A Figura 1.6 ilustra o agrupamento das populações com alto grau de consistência dos agrupamentos, com clara separação das populações. As populações aromáticas do Parque Nacional de Brasília (APA) e da Fazenda Água Limpa (FAL) apresentaram a menor dissimilaridade de Dice (62%), com a consistência do agrupamento de 67,5%. Esta informação coincide com a presença de aroma em folhas de ambas as populações, evidenciando uma maior proximidade genética entre populações com esta característica. Contraditoriamente, a população do Parque Nacional de Brasília que não apresentou característica aromática (APN), mostrou-se geneticamente mais dissimilar quando comparada às duas anteriores (66,5%), com a consistência do agrupamento de 72,5%. Este fato tem importância quando se pretende amostrar sementes de populações para

conservação, devendo considerar uma amostragem para cada população separadamente.

A população do Jardim Botânico de Brasília (JBB) formou um agrupamento isolado dos demais, apresentando a maior dissimilaridade em relação às demais populações (71%), com 100% de consistência do agrupamento, estimado pela reamostragem de 10.000 *bootstrap*.

A análise de AMOVA realizada evidenciou uma percentagem de variação de 35,7% entre populações e de 64,3% dentro populações, o que demonstra uma alta divergência entre populações, confirmando o dendograma gerado na análise de dissimilaridade. De uma maneira geral espécies nativas tropicais apresentam maior variabilidade dentro do que entre populações (Lacerda *et al.*, 2001; Goulart *et al.*, 2005).

Na análise de AMOVA entre locais de coleta dois a dois (Tabela 1.6), verificou-se que as populações APN e JBB apresentaram os maiores valores quanto a percentagem de variação genética (48%). A população JBB foi a que se mostrou mais distante das demais, com 35,9% e 39% de variação genética, em relação as populações do APA e FAL, respectivamente. Este resultado confirma a dissimilaridade genética apresentada no dendograma, e era esperado, uma vez que esta população apresenta hábito diferente das demais. A menor variação genética foi apresentada entre as populações APA e FAL, com 17,1%. Ambas populações apresentam como característica similar a presença de óleos essenciais, embora mais distantes geograficamente. As populações do Parque Nacional (APA e APN), ambas distando apenas 10km uma da outra, apresentaram uma distância genética de 25,2%.

O fato das populações de arnica serem basicamente isoladas e agregadas pode justificar o fato dos altos valores de variação genética dentro das populações. Os dados de dissimilaridade e AMOVA nos levam a concluir que uma coleta para conservação de sementes de arnica deve considerar um maior número possível de populações a serem amostradas, assim como um número elevado de indivíduos amostrados dentro da população, de maneira a representar o máximo de variação genética existente.

Este é o primeiro relato de uso de algum tipo de marcador molecular para arnica (*Lychnophora ericoides*), demonstrando que a técnica foi eficiente em separar as

populações observadas, contribuindo para uma abordagem de conservação mais apropriada. Obviamente, estudos mais detalhados e com maior número de primers, bem como o uso de outras técnicas, permitirão uma melhor discriminação das populações estudadas, e uma relação com a presença ou ausência de aroma.

## CONCLUSÃO

- Os resultados obtidos com a técnica RAPD demonstram a clara separação genética entre as populações de arnica *L. ericoides* estudadas.
- Os resultados sugerem que a coleta para conservação de sementes deve considerar o maior número de populações amostradas, assim como um número elevado de indivíduos, de maneira a representar o máximo de variabilidade existente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1998. 464p.

BARROS, M.A.G.. Avaliação da ação antrópica sobre as plantas do Cerrado com potencial econômico. In: Leite, L.L.; Saito, C.H., org. **Contribuição ao Conhecimento Ecológico do Cerrado**. UnB. Brasília, DF. p.257-261, 1997

BASTOS, M.; CERQUEIRA, S.; SOUZA, J.T.; AMADO JR., R.; PEIXOTO, A.B.F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica). **Ciência e Cultura**. v.39, n.5/6, p.551-553, 1987.

BERTONI, B.W. **Micropropagação de *Lychnophora ericoides*: uma planta medicinal com atividade analgésica e tripanomicida**. In: Anais do XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil. Recife (PE). p.71, 2000.

BIODIVERSIDADE BRASILEIRA. **Avaliação e Identificação de Áreas e Ações Prioritárias para Conservação, Utilização Sustentável e Repartição de Benefícios da Biodiversidade Brasileira**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, DF, 2002.

BIOTECNOLOGIA C&T. Entendendo a biotecnologia. Banco de dados da Revista Biotecnologia. In: **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br> Acesso em: 15/06/05

BITTENCOURT, J.V.M. **Variabilidade Genética em populações naturais de *Maytenus ilicifolia* por meio de marcadores RAPD**. Dissertação - Mestrado em Agronomia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 58p, 2000.

BOEHM, C. L.; HARRISON, H. C.; JUNG, G.; NIENHUIS, J. Organization of American and Asian ginseng germplasm using Randomly Amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** v.124(3), p. 252-256, 1999.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C; ROBINSON, H. ; KING, R.M. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. **Phytochemistry**, v.19, n.11, p. 2381-2385, 1980.

BUSSAB, W.O.; MAGALI, E.; ANDRADE, D.F. Introdução à análise de agrupamento. In: VENCOVSKY, R.; COELHO, A.S.G. **Biometria de marcadores genéticos**. Piracicaba (SP). Apostila de curso. 19p, 2000.

CABRAL A.C.S Terpenoides do tronco de *Lychnophora ericoide* Mart. In: **Anais do XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil**. Recife. 134p., 2000.

CHIARI, E; RASLAN, D.S.; BOAVENTURA, M.A.D.; DUARTE, D.S.; SAÚDE, D.A.;

SILVA, K.P.P.; OLIVEIRA, A.B. Atividade tripanossomicida de sesquiterpenos de espécies do gênero *Lychnophora* (Asteraceae). In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 13., Fortaleza, CE. **Resumo de temas livres**. Fortaleza, CE. 128p., 1994.

COELHO, A.S.; BOOD, P. **Avaliação dos erros associados a estimativas de distância/similaridades através do procedimento de bootstrap com número de variáveis de marcadores (software)**. Goiânia UFG. Instituto de Ciências Biológicas. Laboratório de Genética vegetal. 2002.

COYLE, N.C. & S.B. JONES. *Lychnophora* (Compositae; Vernoniae), a genus endemic to the Brazilian planalto. **Brittonia**, v.33 n.4, p.528-542, 1981

Cruz, G.L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Edit. Civilização Brasileira S.A., 599 p. Bibliografia: P. 101 – 102, 1979.

DAPEN B.; BRANDLE, J.; REELEDER, R. Genetic diversity in North American ginseng (*Panax quinquelifolius* L.) grown in Ontario detected by RAPD analysis. **Genome** v. 40, p.-111-115, 1997.

DIAS, B.F.S.. Cerrado: uma caracterização. In: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais / Fundação Pró-Natura. **Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos renováveis**. Brasília, DF. p.11-34. 1992

DOYLE, J. J. AND DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, **12**, 13-15, 1987.

EIRA, M.T.S. Classificação de sementes em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias. In: PUIGNAU, J.P. E R. CUNHA. DIÁLOGO XLV. **Conservacion de germoplasma vegetal**. IICA. Montevideo, p. 119-122, 1996.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E. AND QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131, 479-491, 1992.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3a ed. Brasília Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

FILGUEIRAS, T.S.; PEREIRA, B.A.S. Vegetação do Cerrado. In: Pinto, M.N., org. **Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas**. 2ª ed. UnB / SEMATEC. Brasília, DF. p.345-404, 1994.

FRANKEL. O. Evaluation and utilization – Introductory remarks. In: FRANKEL, O. H. & BENNETT, E. (eds). **Genetic Resources Plants-Scientific Publications**, p. 395-401, 1970.

FURLEY, P.A.; RATTER, J.A. Soil resource and plant communities of the central Brazilian cerrado and their development. **Journal of Biogeography** 15:97-108,1988.

GAMA, M.I.C.S. Identificação de Plantas Transgênicas por PCR. **Manual de Transformação Genética de Plantas**, Embrapa. Brasília, DF, p.179-189,1998.

GOULART,M.F.; RIBEIRO, S.P.; LOVATO, M.B. Genetic, morphological and spatial characterization of two populations of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), in different successional stages. **Braz. arch. biol. technol.**vol.48 n<sup>o</sup>.2 Curitiba 2005.

HOYT, E. **Conservação dos parentes silvestres das plantas cultivadas**. Wilmington, Delaware: Addison-Wesley Iberoamericana. 52p. 1992 (traduzido por L. Coradin).

LACERDA, D. R., ACEDO, M. D. P., LEMOS FILHO, J. P. AND LOVATO, M. B. A técnica de RAPD: uma ferramenta molecular em estudos de conservação de plantas. **Lundiana**, 3 : (2), 87-92, 2002.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.; FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado, **Mol Ecol**. 10(5):1143-52. 2001.

LANZA, M.A.;GUIMARÃES, C.T.;SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Revista Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.21, n. 204, p. 97 - 106, 2000.

LEITÃO FILHO, H.F.; SEMIR, J.. Revisão do gênero *Lychnophora* Mart. (Compositae-Vernoniae). In: Congresso Nacional de Botânica, 30., Campo Grande, MS. **Resumos**. Sociedade Botânica do Brasil. Campo Grande, MS. p.88-89, 1979a.

LEITÃO FILHO, H.F.; SEMIR, J.. Uma nova combinação para o gênero *Vernonia* Schreb. (Compositae): *Vernonia damazoi* (Beauverd). **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, SP. v.2, p.113-116, 1979b

LEITE, M.N., DEL-VECHIO, G. Contribuição para o estudo farmacognóstico da *Lychnophora ericoides*. In: **Anais do XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil**. Recife (PE), 185p, 2000.

LOPES, N. P. A essência da arnica. **Pesquisa Fapesp**, n. 64, p. 42-44, 2001.

Paron, M.E. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em *Lychnophora ericoides* Mart. (Arnica-da-Serra), efeitos da inoculação e estudos de propagação**. Tese de Doutorado em Microbiologia. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 99p. 2002.



RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany** **80**, 223-230, 1997.

RIZZO, J.A. Plantas Medicinais Tóxicas. In: Congresso Nacional de Botânica, 32., Teresina, PI. **Resumos**. Sociedade Botânica do Brasil. Teresina, PI. p.1-2, 1981.

ROHLF, F.J. **NTSYS: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.0**. Applied Biostatistics Inc. 2000.

ROMANO, E. Extração de DNA de Tecidos Vegetais. **Manual de Transformação Genética de Plantas**, Embrapa. Brasília, DF, p.163-177, 1998.

SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 556p. 3 – 42; 89 – 153, 1998.

SANTOS, M. D. ET AL. Estudo fitoquímico do extrato polar das raízes de *Lychnophora ericoides*. In: **Anais do XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil**. Recife (PE), p. 184, 2000.

SAÚDE, D.A.; RASLAN, D.S.; DE OLIVEIRA, A.B. Teste de atividade antitumoral e anti-HIV de lactonas sesquiterpênicas de *Lychnophora trichocarpa* Spreng. (Asteraceae). In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 13., Fortaleza, CE. **Resumo de temas livres**. Fortaleza, CE. 129p, 1994.

SEMIR J. **Revisão taxonomica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae – Compositae)**. Tese – Doutorado em Biologia Vegetal. Unicamp. Campinas, SP. 515p., 1991.

SEMIR, J. **Revisão taxonomica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae – Compositae)**, Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. **515p.** 1991.

SILVA, S.M.P. 1994. **Aspectos da fenologia a da reprodução sexuada da arnica (*Lychnophora pinaster* Mart) – Asteraceae**. Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal. UFLA. Lavras, MG. 45p. 1994.

SILVA, S.M.P. Arnica de campo rupestre *Lychnophora pinaster* Mart. Asteraceae-Aspectos da fenologia e da germinação de aquênios. **Plantas Medicinais Aromáticas e Condimentares – Avanços na Pesquisa Agronômica**, Universidade Estadual Paulista – Botucatu – SP, v2. 1998.

SOCIEDADE BOTÂNICA DO BRASIL - **Centuria Plantarum Brasiliensium Exstintionis Minimata**. Sociedade Botânica do Brasil. Brasília, DF. 167p. 1992.

SOUZA, M.P.; MATOS, F.J.A.; MATOS, M.E.D.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.

(1991). Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras - UFC-LPN, Fortaleza.  
VIEIRA, R. F., MARTINS, M. V. M. Recursos Genéticos de Plantas Medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu-SP, v.3, n.1, p.13-15, 2000.

VALOIS, A. C. C., SALOMÃO, A. N., ALLEM, A. N. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Serviço de Produção de Informação. Documentos, 22. 62p. 1996.

VIEIRA, R.F.; GOLDSBROUGH, P.; SIMON, J.E. Genetic of diversity of Basil (*Ocimum spp.*) based on RAPD markers. **Journal of American Horticultural Society** v.128(1), p. 252-256, 1999.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. Botucatu, v.3, n.1, p. 13-36, 2000.

VIEIRA, R.F.; SKORUPA, L.A.; SILVA, O.A.; WALTER, B.M.T.; MARTINS, M.V.. Contribuição ao estudo das espécies medicinais do cerrado. Levantamento Preliminar I. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 13., Fortaleza, CE. **Resumo de temas livres**. Fortaleza, CE. 209p. 1994.

WALTER, B. M. T. **Biodiversidade e Recursos Genéticos: Questões e Conceitos**. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos, 46. 48p. 2000.

WOLF, H.; ZUNDORF I.; WINCKLER T.; BAUER, R.; DINGERMANN, T. Characterization o *Echinaceae* species and detection of possible adulterations by RAPD analisys. **Planta Medica** v. 65, p. 773-774, 1999.

Tabela 1.1 Locais de coleta de amostras de folhas de arnica (*Lychnophora ericoides*) para estudos de diversidade genética

Local	n <sup>o</sup> de indivíduos	latitude	longitude
Fazenda Água Limpa (FAL), UnB, DF <sup>1</sup>	24	15°58'29"	47°56'55"
Jardim Botânico de Brasília (JBB) DF <sup>2</sup>	24	15°57'11"	47°51'48"
Parque Nacional de Brasília (APA e APN), DF <sup>3</sup>	48	15°39'39"	47°56'28"

<sup>1</sup> população de indivíduos com folhas aromáticas

<sup>2</sup> população com indivíduos de porte reduzido e características folhas não aromáticas

<sup>3</sup> amostras coletadas de duas populações distantes cerca de 8km, uma com folhas aromáticas e outra não aromáticas

Tabela 1.2. Componentes do tampão de extração CTAB 2%, utilizado na extração de DNA de folhas de arnica (*L. ericoides*)

Produto	Quantidade para 100ml
CTAB 2%	2,0 g
NaCl 1,4M	8,12 g
EDTA pH 8,0 - 0,5M	4,0 ml
Tris HCl pH 8,0 - 1M	10,0 ml
Polyvinylpyrrolidone 1,0% (PVP-40)	1,0 g
2-mercaptoetanol	2ul/ml de tampão

Tabela 1.3. Componentes do tampão TBE 5X

	Quantidade para 1000 ml
Tris base	54,0 g
Ácido bórico	27,5 g
EDTA pH 8,0 - 0,5M	20 ml



Tabela 1.4. Relação de iniciadores (Operon Technologies) utilizados na seleção prévia em amostras de indivíduos de arnica (*L. ericoides*) de diferentes populações do Distrito Federal

1. OPA-03	26. OPE-18	51. OPL-11	76. OPN-14	101. OPS-11	126. OPW-14
2. OPA-06	27. OPF-19	52. OPL-12	77. OPN-15	102. OPS-12	127. OPW-16
3. OPA-12	28. OPG-01	53. OPL-15	78. OPN-16	103. OPS-13	128. OPX-01
4. OPB-03	29. OPG-04	54. OPL-17	79. OPN-17	104. OPS-15	129. OPX-02
5. OPB-10	30. OPG-05	55. OPL-19	80. OPN-18	105. OPS-19	130. OPX-04
6. OPB-13	31. OPG-07	56. OPM-01	81. OPN-19	106. OPS-20	131. OPX-06
7. OPB-14	32. OPG-12	57. OPM-02	82. OPN-20	107. OPT-08	132. OPX-10
8. OPB-18	33. OPG-13	58. OPM-03	83. OPO-08	108. OPT-12	133. OPX-14
9. OPC-02	34. OPG-14	59. OPM-04	84. OPO-11	109. OPU-07	134. OPX-16
10. OPC-10	35. OPG-15	60. OPM-06	85. OPO-19	110. OPU-09	135. OPZ-01
11. OPC-14	36. OPG-17	61. OPM-07	86. OPP-08	111. OPU-11	136. OPZ-02
12. OPD-03	37. OPG-20	62. OPM-08	87. OPP-18	112. OPU-12	137. OPZ-03
13. OPD-09	38. OPI-20	63. OPN-01	88. OPQ-01	113. OPU-14	138. OPZ-06
14. OPD-11	39. OPJ-10	64. OPN-02	89. OPQ-02	114. OPU-17	139. OPZ-07
15. OPE-01	40. OPJ-16	65. OPN-03	90. OPQ-05	115. OPV-04	140. OPZ-09
16. OPE-02	41. OPJ-16	66. OPN-04	91. OPQ-13	116. OPV-09	141. OPZ-11
17. OPE-03	42. OPK-04	67. OPN-05	92. OPR-12	117. OPV-11	142. OPZ-12
18. OPE-04	43. OPK-07	68. OPN-06	93. OPR-19	118. OPV-15	143. OPZ-14
19. OPE-05	44. OPK-17	69. OPN-07	94. OPR-20	119. OPV-15	144. OPZ-15
20. OPE-06	45. OPL-01	70. OPN-08	95. OPS-04	120. OPV-16	145. OPZ-16
21. OPE-11	46. OPL-02	71. OPN-09	96. OPS-05	121. OPV-18	146. OPZ-18
22. OPE-12	47. OPL-05	72. OPN-10	97. OPS-06	122. OPV-20	147. OPZ-19
23. OPE-14	48. OPL-07	73. OPN-11	98. OPS-07	123. OPW-01	
24. OPE-15	49. OPL-08	74. OPN-12	99. OPS-08	124. OPW-02	
25. OPE-16	50. OPL-09	75. OPN-13	100. OPS-09	125. OPW-05	

Tabela 1.5. Relação de iniciadores utilizados nas reações RAPDs com respectivas seqüências de bases e número de bandas polimórficas

Iniciador	Seqüência de bases (5' → 3')	Nº de bandas polimórficas
OPB-10	CTGCTGGGAC	3
OPL-05	ACGCAGGCAC	3
OPL-19	GAGTGGTGAC	4
OPN-02	ACCAGGGGCA	6
OPN-06	GAGACGCACA	2
OPN-08	ACCTCAGCTC	3
OPN-12	CACAGACACC	4
OPN-18	GGTGAGGTCA	4
OPN-19	GTCCGTA CTG	3
OPN-20	GGTGCTCCGT	3
OPO-19	GGTGCACGTT	5
OPV-15	CAGTGCCGGT	5
OPV-20	CAGCATGGTC	5
OPX-04	CCGCTACCGA	5
OPX-06	ACGCCAGAGG	5
Total		60

Tabela 1.6. Distribuição de variabilidade em quatro populações de *Lychnophora ericoides*, obtida por análise da variância molecular com os dados de RAPD.

Fonte de Variação	% de Variabilidade	P
Dentro de cada População	64,3	0,00000±0,00000
Entre 4 Populações	35,7	0,00000±0,00000
Entre Pop APN x APA	25,2	0,00000±0,00000
Entre Pop APN x JBB	48	0,00000±0,00000
Entre Pop APN x FAL	34,9	0,00000±0,00000
Entre Pop APA x JBB	35,9	0,00000±0,00000
Entre Pop APA x FAL	17,1	0,00000±0,00000
Entre Pop FAL x JBB	39	0,00000±0,00000



Figura 1.1 (a) População de arnica em área rupestre; (b e c) inflorescência em detalhe de *L. ericoides* e com presença de borboleta; (d) plântula de arnica



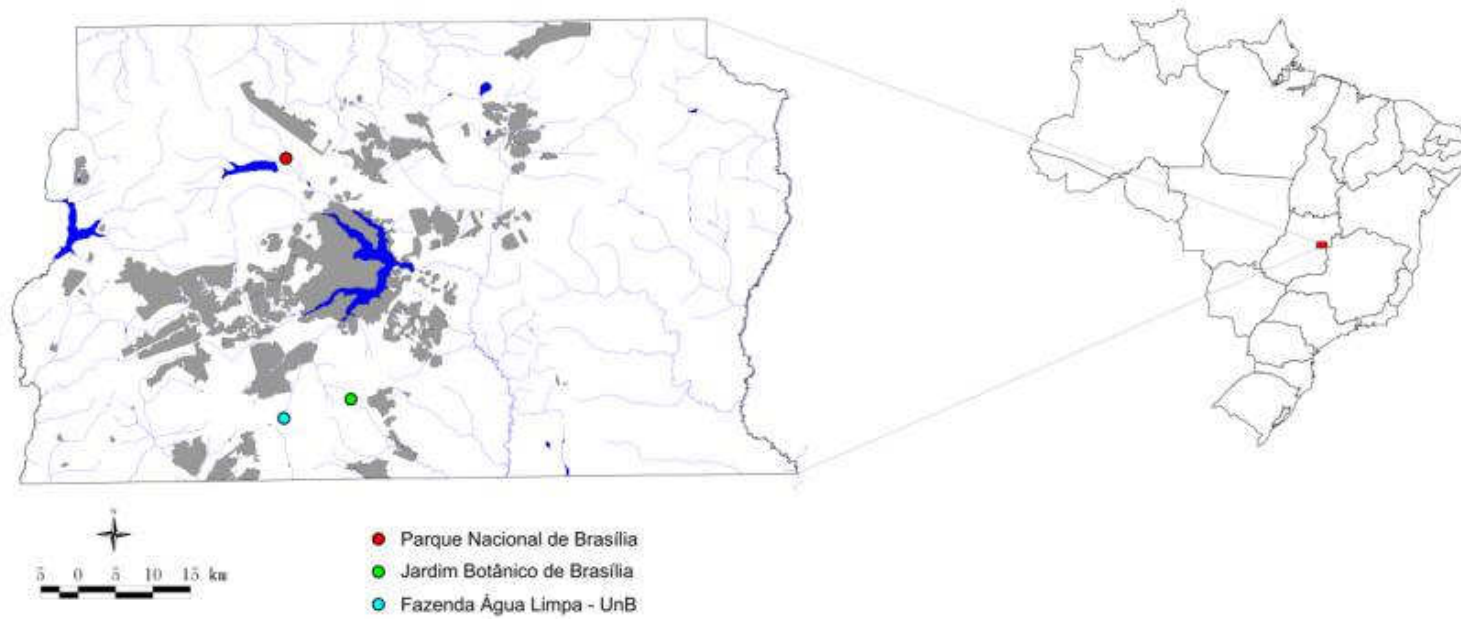


Figura 1.2 Mapa ilustrando os locais de coleta de *L. ericoides* na região do Distrito Federal

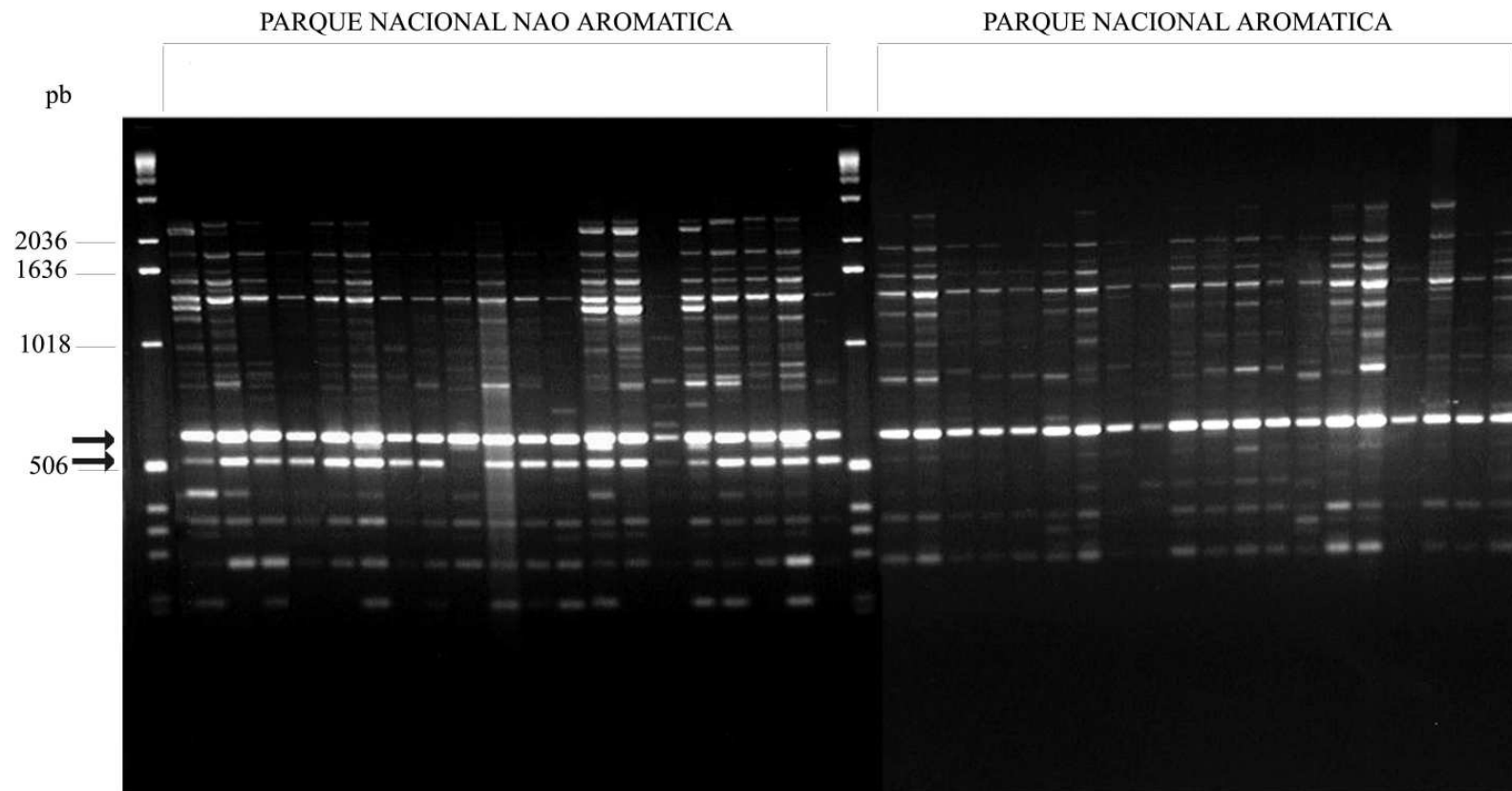


Figura 1.3. Gel ilustrando reações de RAPD em géis de eletroforese de 2 populações de *L. ericoides* no Parque Nacional de Brasília usando o iniciador OPX 04. As setas indicam as bandas polimórficas.

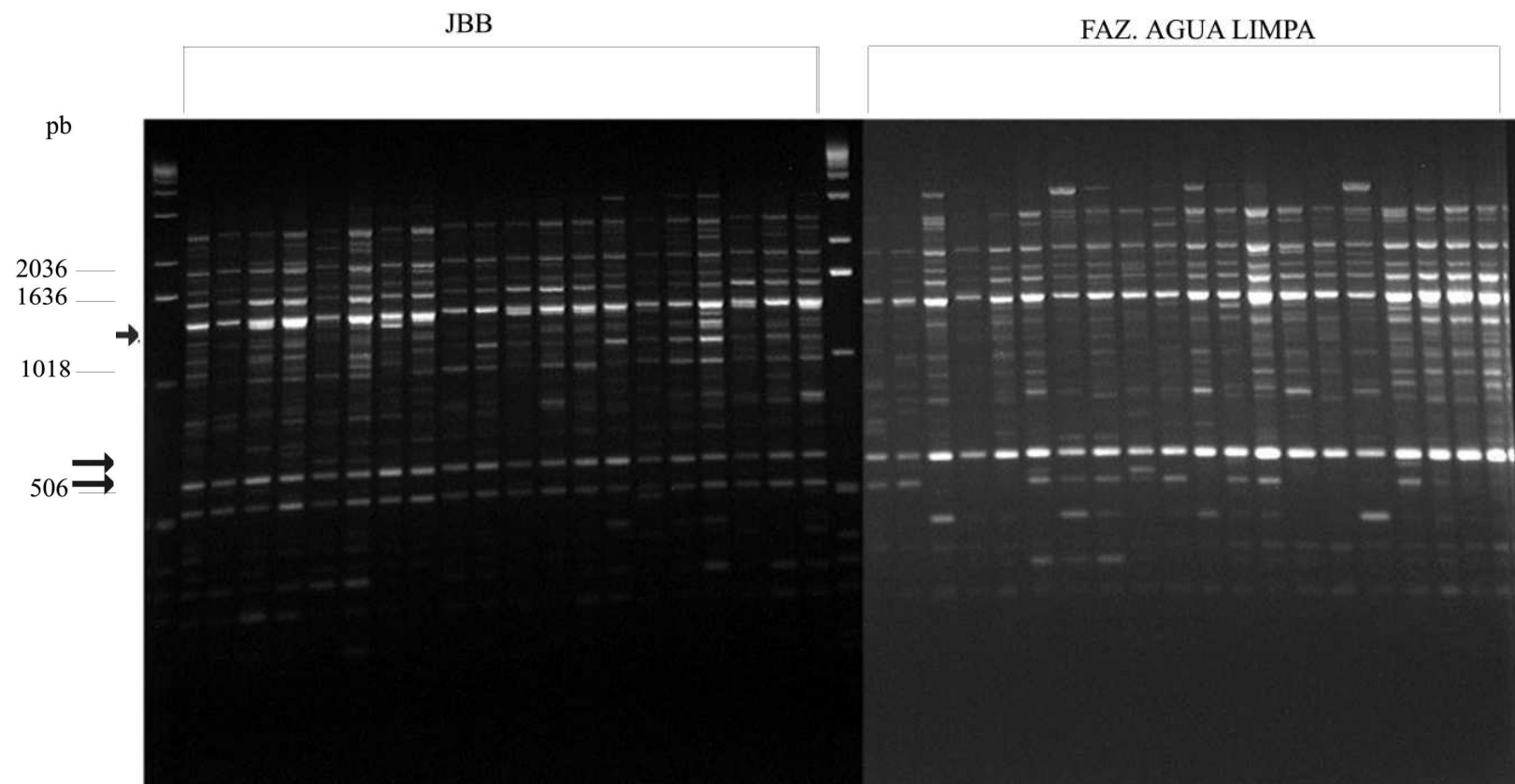


Figura 1.4. Gel ilustrando reações de RAPD em géis de eletroforese de 2 populações de *L. ericoides* usando o iniciador OPX 04. A seta indica a banda polimórfica identificada (JBB = Jardim Botânico de Brasília).

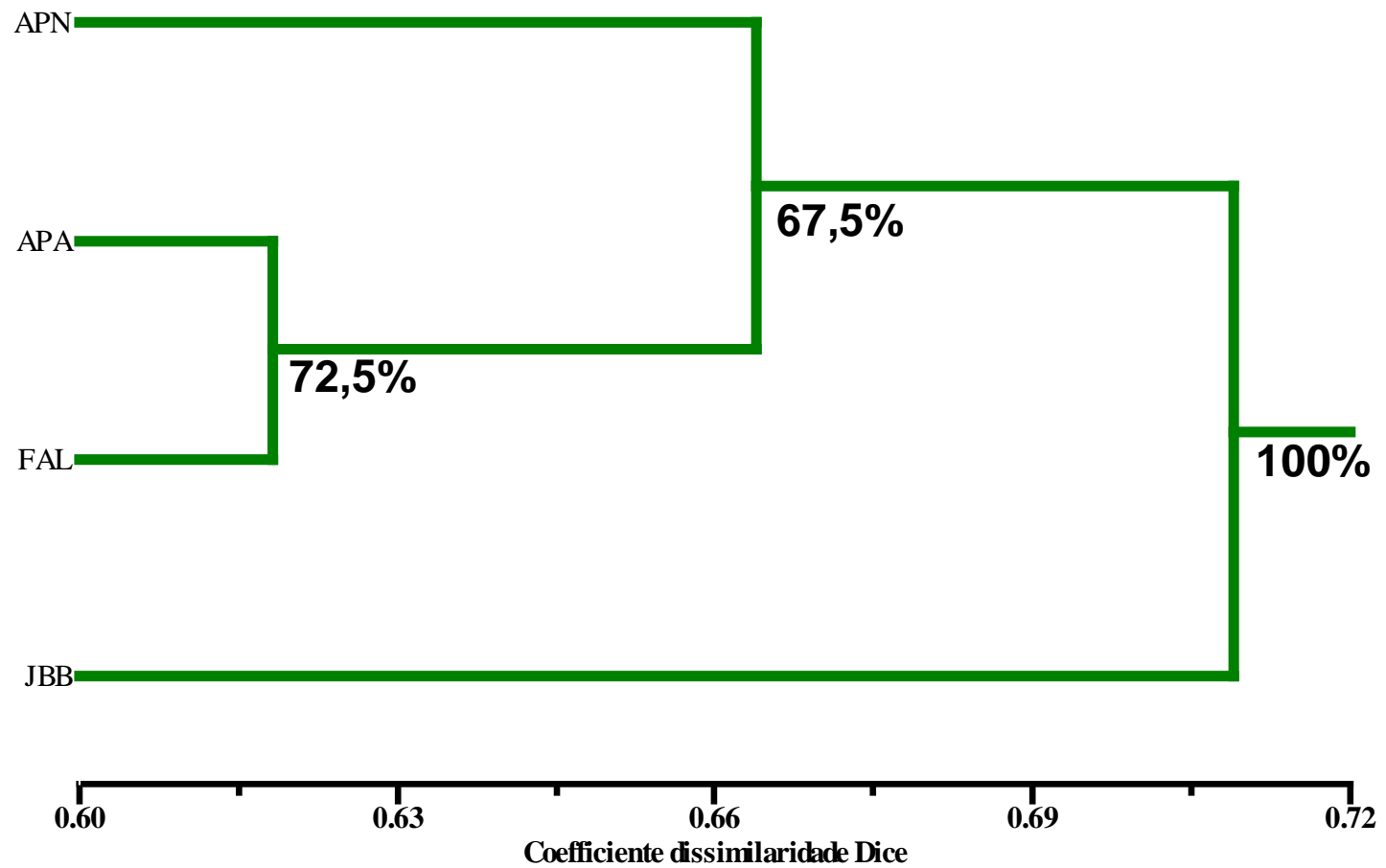


Figura 1.5. Dendrograma gerado pelo critério de agrupamento UPGMA representando a dissimilaridade de Dice entre quatro populações de Arnica (APN e JBB não aromáticas; FAL e APA aromáticas) analisadas com 60 locos RAPD.

## CAPÍTULO 2

### ESTUDO DO COMPORTAMENTO GERMINATIVO DE SEMENTES DE *Lychnophora ericoides* (Less) PARA FINS DE CONSERVAÇÃO.

#### RESUMO

Os estudos sobre a ecologia e a biologia de *Lychnophora ericoides* são escassos. Devido ao uso intensivo da espécie, torna-se importante e urgente a obtenção de informações sobre o comportamento germinativo de suas sementes para fins de conservação a longo prazo, visando o manejo da espécie. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de temperaturas de incubação e de tratamentos pré-germinativos sobre a germinação de aquênios de arnica e o efeito de distintas temperaturas sobre a viabilidade de aquênios, visando sua conservação a longo prazo. Em aquênios selecionados pelo teste densimétrico, foram utilizadas as temperaturas constantes de 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C e alternadas de 20-30°C em presença de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>), ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) e H<sub>2</sub>O (testemunha). Após a determinação das melhores condições de germinação, amostras de aquênios selecionados e de aquênios não submetidos ao teste densimétrico foram armazenadas a -196°C, -20°C, 10°C e temperatura ambiente durante o período de um ano, avaliando-se sua germinabilidade a cada dois meses. As maiores porcentagens de germinação foram obtidas às temperaturas de incubação de 20°C, em presença de água (76,5%), e de 20-30°C, em presença de KNO<sub>3</sub> (81,5%), não havendo diferença significativa entre estes valores. Os aquênios de arnica não sofreram redução da germinabilidade quando armazenados em condições de baixas temperaturas, nos períodos analisados no experimento de conservação, demonstrando que as sementes de arnica são ortodoxas. O material selecionado apresentou uma porcentagem média de germinação variando entre 55,5% e 73,5% e uma uniformidade germinativa em todas as condições do experimento de conservação. Já os aquênios não selecionados apresentaram uma porcentagem média de germinação entre 12% e 30,5%, além de um comportamento germinativo desuniforme quando comparado ao material selecionado. O teste densimétrico promoveu uma efetiva seleção de aquênios, aumentando o volume de aquênios germinados.

Palavras-chaves: arnica, germinação, plantas medicinais do Cerrado, conservação *ex situ*

#### ABSTRACT

*Arnica* (*Lychnophora ericoides*) biology and ecology are poorly studied. Considering *L. ericoides* intensive use, information on the germinative behaviour of *L. ericoides* achenes became very important for germplasm conservation.

The objective of this work was to evaluate the temperatures and pre-germinative treatments on the *Arnica* achenes germination, and the effect of several temperatures on achenes viability. For selected achenes based on densimetric method, were used constant temperatures of 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C and alternating 20-30°C in the presence of Potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>), gibberelic acid (GA<sub>3</sub>) and H<sub>2</sub>O (testimony).

After the determination of the best germination condition, samples from selected and non selected achenes by densimetric method were stored at -196°C, -20°C, 10°C and environment temperature during one year. Germinability was evaluated every two months. The highest germination percentages were obtained at incubation temperatures of 20°C, in the presence of H<sub>2</sub>O (76.5%), and 20-30°C, in the presence of KNO<sub>3</sub> (81.5%), with no statistical significant difference between these two values. *Arnica* achenes did not have reduced their germinability when stored at low temperatures, during the experiment time, showing that *Arnica* seeds can be considered orthodox. Selected achenes presented a germination average percentage varying between 55.5% and 73.5%, and a germinative uniformity in all experimental conditions. Non selected achenes showed a germination average percentage between 12% and 30.5%, besides the desuniform germinative behaviour when compared to the selected achenes. Densimetric test promote an effective selection of achenes, increasing the number of seeds germinated.

Key words: arnica, germination, , medicinal plants of Cerrado, conservation *ex situ*.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, cerca de 47 milhões de hectares do Cerrado estão ocupados com áreas agrícolas, como pastagens cultivadas, culturas anuais e perenes. O crescimento populacional e a demanda por mais alimentos, associados às condições edafo-climáticas favoráveis do Cerrado, transformaram esta região em importante área para atividades agropecuárias. O ritmo acelerado desta ação antrópica nas últimas décadas tem levado a perdas de material genético vegetal praticamente desconhecido do ponto de vista científico. Estima-se uma área potencial de 89 milhões de hectares para uso agrícola futuro, que irá resultar em 136 milhões de hectares de ocupação agrícola do cerrado, ou 66% de todo o Cerrado, provocando uma maior fragmentação do ecossistema original (Ratter *et al.*, 1997).

Apesar da riqueza florística existente em toda zona tropical e da grande importância de seu uso medicinal pela população, as estimativas mais otimistas citam que menos de 1% deste potencial já foi quimicamente estudado. Gottlieb & Kaplan (1990) advertem que, considerando o potencial taxonômico disponível e a enorme velocidade de extinção de espécies pela destruição dos seus *habitats*, é provável que nem 5% destas sejam adicionadas ao conhecimento disponível antes que sejam extintas. Da flora medicinal do cerrado, é provável que menos de 3% já tenha sido estudado (Vieira e Martins, 2000).

Várias espécies da flora do Distrito Federal podem ser consideradas “ameaçadas de extinção”, pelo número reduzido de indivíduos, por serem alvo de extrativismo predatório ou por predominarem em ambientes ou locais muito vulneráveis à ação antrópica. *Lychnophora ericoides* é classificada na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção do IBAMA (Portaria nº. 37N, de 3 de abril de 1992) como espécie vulnerável, i.e., pertencente aos *taxa* cujas populações encontram-se em declínio, em consequência de sua exploração excessiva, alteração ou destruição dos *habitats* e que sua sobrevivência definitiva ainda não tenha sido assegurada, o que poderá levar a espécie à extinção.

O gênero *Lychnophora* (Asteraceae), exclusivo do Cerrado, possui cerca de 25 espécies ocorrendo nos estados da Bahia, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo (Leitão Filho & Semir, 1979a). São arbustos endêmicos, característicos das fisionomias

campestres como campo rupestre, campo limpo e campo cerrado, com adaptações a ambientes com clima sazonal com eventos periódicos de fogo, e possivelmente polinizadas por abelhas. As espécies apresentam distribuição geográfica restrita à Serra do Espinhaço em Minas Gerais e Bahia e em habitats similares em Goiás e Distrito Federal (Coyle & Jones, 1981). Em seus *habitats*, apresentam distribuição agregada formando populações bem definidas espacialmente.

*Lychnophora ericoides* pertence à família Compositae (*Asteraceae*) e ocorre em Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal em elevações de 950 a 1800 m. Cresce em depósitos de minérios de ferro-mangânês, afloramentos rochosos de arenito e quartzito, precipícios, rampas rochosas e planaltos de campo rupestre, e campos de pastejo e cerrado (Almeida *et al.* 1998).

Este arbusto apresenta folhas e flores aromáticas. Devido a estas características, possui também uso potencial artesanal. Como medicinal, as folhas da planta em infusão no álcool (extrato alcoólico) são usadas externamente em machucados ou contusões, como anestésico e cicatrizante. São também produzidas pomadas para os mesmos sintomas, bem como soluções aquosas, para serem administradas por via oral. Rizzo (1981) cita que, em trabalho preliminar realizado pelo Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Goiás, a espécie *L. ericoides* apresentou um poder antiinflamatório surpreendente. Empresas de cosméticos têm fabricado sabonete de arnica, indicando-o para eliminar asperezas, rachaduras e suavizar hematomas e contusões (Almeida *et al.* 1998).

Estudos fitoquímicos do gênero *Lychnophora* indicam a presença de triterpenos, lactonas, derivados de cariofileno, lactonas sesquiterpênicas e flavonóides (Bohlmann *et al.*, 1980, 1981, 1982, 1983; Borella *et al.*, 1992; Costa *et al.*, 1993; Cunha *et al.*, 1995; Vichewski *et al.*, 1980). Estudos farmacológicos mostram que estas plantas possuem atividades antinociceptiva, antiinflamatória e antitumoral (Bastos *et al.*, 1987; Saúde *et al.*, 1994), e efeitos antimicrobianos (Miguel *et al.*, 1996). Chiari *et al.* (1994) relatam que há atividade tripanossomicida de sesquiterpenos de algumas espécies do gênero *Lychnophora*.

Estudos preliminares com *L. ericoides* têm demonstrado uma grande variabilidade de comportamento germinativo de suas sementes devido principalmente à heterogeneidade



quanto ao grau de maturação, à formação de sementes anormais e à predação. A germinação de arnica é lenta e desuniforme, embora sementes de algumas procedências iniciem erráticamente a germinação a partir do 7º dia após semeio. O estágio de maturação das sementes pode, possivelmente, influenciar o processo germinativo (Paron, 2002).

O estudo do comportamento germinativo associado à definição das melhores condições para a conservação do germoplasma da espécie fornecerá subsídios para seu manejo sustentado e seu melhor aproveitamento.

## FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### **Germinação de sementes**

A germinação é um evento fisiológico que depende da qualidade da semente e das condições de germinação, como o suprimento de água e oxigênio e adequação de temperatura, luz e substrato. Estas condições de germinação ou requerimentos básicos para germinação variam entre as espécies de plantas. As qualidades física, fisiológica e sanitária da semente são avaliadas por parâmetros de peso, pureza, germinabilidade, conteúdo de umidade e viabilidade e esses parâmetros podem variar entre lotes de semente de uma mesma espécie (Salomão *et al.*, 2003).

As informações sobre germinação de sementes de espécies do Cerrado, em condições laboratoriais, encontram-se dispersas. O caráter destas informações, muitas vezes, não é aprofundado devido à ausência de padronização de procedimentos e às variações de comportamento e disponibilidade das sementes. As espécies do Cerrado respondem favoravelmente à temperatura de incubação de 25°C, como landim, (*Calophyllum brasiliense*) e mata-pasto (*Chamaecrista desvauxii*), ou de 30°C, como jenipapo (*Genipa americana*), ou alternada de 20-30°C, como paineira-do-cerrado (*Eriotheca pubescens*) e pau-de-jangada (*Apeiba tibourbou*) (Salomão *et al.*, 2003). Para espécies não incluídas nas Regras para Análise de Sementes e conseqüentemente sem regras normatizadas para germinação, são realizadas pesquisas para testar substratos e regimes de temperaturas adequados para a máxima expressão da viabilidade das sementes (Faiad *et al.* 2001).

A maioria das espécies do Cerrado germina bem em ausência de luz, mas, para algumas delas, a luz estimula a germinação. Neste caso, são utilizados fotoperíodo de 16h luz/8h escuro ou de 12h luz/12h escuro e um substrato que permite a exposição à luz, como papel ou vermiculita em caixas de Gerbox (Salomão *et al.*, 2003).

A germinação pode ser considerada como a total reativação metabólica/retomada de crescimento do embrião resultando em uma plântula com as estruturas essenciais para seu desenvolvimento em uma planta normal e vigorosa. Por meio do teste de germinação, avalia-se o poder germinativo das sementes do lote. Esta avaliação é feita inicialmente,

após os tratamentos pré-germinativos e novamente após o armazenamento. Informações sobre a capacidade germinativa das sementes são importantes a em programação de atividades de comercialização, plantio, conservação dentre outros.

De acordo com o critério botânico de germinação, considera-se semente germinada quando há protrusão/extrusão de qualquer parte do embrião, notadamente a radícula. Se o critério botânico for adotado, deve-se observar se a radícula tem curvatura geotrópica positiva e consistência firme. Isto porque sementes mortas podem emitir radícula devido à força mecânica exercida pela água em seu interior. Pelo critério tecnológico de germinação a semente germinada é aquela que apresenta a emergência de uma plântula normal, apresentando as partes aérea e radicular vigorosas (Salomão *et al.*, 2003).

Nos testes de germinação, deve-se fazer a contagem diária de sementes germinadas. Quando se conhece o padrão germinativo da espécie, as contagens podem ser feitas em intervalos maiores, a cada cinco ou sete dias, por exemplo.

Durante o teste de germinação, alguns fatores podem afetar o comportamento germinativo das sementes, com destaque para o substrato e a temperatura (Faiad *et al.*, 2001). Os tipos de substratos mais utilizados em testes de germinação são: papel, pano, areia e solo. Deve-se levar em consideração, para a escolha do substrato, o tamanho da semente, sua exigência com relação à quantidade de água, sensibilidade à luz e, a facilidade que o mesmo oferece para realização das contagens e avaliações.

A temperatura ótima e a duração do teste variam segundo a espécie. Algumas sementes podem não germinar mesmo oferecendo condições ideais para seu desenvolvimento, devido a processos de dormência que ocorrem em algumas espécies vegetais (Faiad *et al.*, 2001).

Os experimentos realizados por Silva (1994) e Paron (2002), utilizaram diferentes substratos e temperaturas na germinação de aquênios de arnica. Silva (1994) analisou a germinação de aquênios de arnica (*L. pinaster*) sob as temperaturas de 25°C, 30°C e temperaturas alternadas de 20-30°C, nos seguintes substratos: sobre areia, sobre solo e entre papel. O melhor resultado foi obtido nas temperaturas alternadas de 20-30°C com o uso do substrato entre papel, apresentando 79% de germinação.

No trabalho realizado por Paron (2002), o resultado mais promissor foi conseguido usando-se como substrato a vermiculita em casa de vegetação com temperaturas médias de 30°C dia e 22°C noite. Os aquênios foram armazenados por períodos de 30, 60 e 90 dias sob refrigeração (5°C e 13% de umidade relativa). As porcentagens de germinação foram de 98%, 96% e 95%, respectivamente. No entanto, no substrato entre papel com o uso de KNO<sub>3</sub> sob temperaturas alternadas de 20-30° C a porcentagem de germinação foi de apenas 14%.

Em ambos os trabalhos, os aquênios de arnica foram selecionados pelo teste densimétrico.

Dentre as formas de medir a germinação, a germinabilidade (%G) talvez seja a mais simples, representando a porcentagem de sementes germinadas em relação ao número de sementes dispostas a germinar sob determinadas condições de experimentos. A germinabilidade informa o número total de sementes germinadas, entretanto, não reflete quanto tempo foi necessário para que as sementes atingissem tal porcentagem de germinação (Ferreira & Borghetti, 2004).

Os tempos e a distribuição da germinação podem variar nas diferentes condições nas quais as sementes são submetidas, assim como nos diferentes lotes de sementes. Para mensurar essas variações existem medidas que quantificam a germinação sob um ponto de vista cinético, que informa quanto tempo foi necessário para determinado lote de semente germinar em determinada condição do experimento. Os parâmetros mais usados são o tempo médio de germinação e a velocidade média de germinação (Ferreira & Borghetti, 2004).

### **Tratamentos pré-germinativos**

A dormência das sementes pode ter diversas causas. Assim, antes da tomada de decisão quanto ao método a ser adotado para a quebra da dormência, deve-se identificar suas causas. Além disso, é necessário considerar a existência de ciclos de sensibilidade das sementes aos processos de superação de dormência, o que pode provocar maior ou menor sucesso da aplicação dos métodos. Para cada tipo de dormência e para cada condição na

qual as sementes estão inseridas haverá um ou mais métodos mais adequados e eficientes (Ferreira & Borghetti, 2004).

A quebra de dormência envolve tanto a redução da concentração de inibidores nos tecidos embrionários, como o ácido abscísico (ABA), quanto a síntese de fitormônios promotores da germinação. Estudos mostram que o ABA tanto induz a dormência durante a maturação quanto bloqueia a germinação durante a embebição.

Entre os principais fitormônios envolvidos na quebra de dormência de sementes se encontram as giberelinas (GAs), geralmente o ácido giberélico ( $GA_3$ ) e o etileno. Ambos modulam o metabolismo celular de maneira a promover o alongamento celular. As GAs promovem a síntese de enzimas envolvidas no enfraquecimento dos tegumentos e/ou hidrólises de reservas. Agem tanto na quebra da dormência como na progressão do alongamento embrionário por promover a síntese de enzimas envolvidas na mobilização de reservas (Ferreira & Borghetti, 2004).

O ABA também inibe a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na degradação de reservas, cuja síntese é promovida pelo ácido giberélico. As giberelinas constituem o grupo de reguladores de crescimento que tem mais amplo espectro de ação em relação à quebra de dormência em sementes (Ferreira & Borghetti, 2004).

A imersão de sementes em hipoclorito de sódio ( $NaClO_3$ ), ácido nítrico ( $HNO_3$ ), nitrato de potássio ( $KNO_3$ ) água oxigenada ( $H_2O_2$ ) é uma prática comum para superar a dormência. Esses agentes químicos podem atuar em vários processos metabólicos das sementes, como nos processos oxidativos, no ciclo das pentoses e na respiração. Apesar do uso consagrado do  $KNO_3$  como promotor de germinação, seu modo de ação ainda é discutido. Acredita-se que em contato com substâncias existentes no pericarpo, ocorra o amolecimento deste, facilitando as trocas gasosas (Paron, 2002).

### **Protocolo para conservação de aquênios**

O aumento da ação antrópica e o avanço desordenado da fronteira agrícola vêm colocando em risco de extinção muitas espécies vegetais, por isso, esforços contínuos devem ser desenvolvidos para que o máximo de material genético de valor real ou potencial

seja conservado (Faiad *et al.*, 2001).

A conservação visa manter a integridade fisiológica e sanitária das sementes por distintos períodos de tempo, com o objetivo de se conservar genótipos para uso em programas de melhoramento de plantas e processos biotecnológicos. Para atender esta necessidade são implantados Bancos de Germoplasma semente, que possuem os seguintes objetivos: conservar fontes genéticas para uso futuro em melhoramento e estudos em genética; manter coleções de diferentes genótipos devidamente caracterizados e avaliados para utilização em programas de melhoramento; prevenir e evitar perdas de valiosos recursos genéticos (Eira, 1996).

Além disso, atualmente as coleções de germoplasma têm permitido a conservação de espécies raras, endêmicas e em ameaça de extinção.

Dois fatores são decisivos e influenciam na longevidade das sementes durante o armazenamento: conteúdo de água e temperatura de exposição. Sementes ortodoxas são aquelas que podem ser desidratadas a baixos graus de umidade e armazenadas em temperaturas subzero, podendo ser conservadas a longo prazo. Sementes recalcitrantes são aquelas que não toleram nem o dessecamento nem a exposição às temperaturas subzero, perdendo a viabilidade rapidamente nestas condições. As sementes consideradas intermediárias toleram o dessecamento parcial e perdem a viabilidade quando expostas às temperaturas subzero, podem ser desidratadas a conteúdos de água relativamente baixos, mas ainda assim apresentam longevidade relativamente curta. A classificação das sementes em ortodoxa, recalcitrante ou intermediária é muito importante para a definição da estratégia de conservação (Eira, 1996).

Entretanto, o fator mais crítico é a quantidade de água com a qual a semente é armazenada. Se a umidade for muito alta, observa-se a sua morte instantânea durante o processo de congelamento e/ou descongelamento (Cunha, 1996). Geralmente, o conteúdo de umidade é reduzido para valores  $\leq 8\%$  durante a desidratação de sementes ortodoxas. Sementes de comportamento intermediário e algumas de comportamento recalcitrante podem ser parcialmente desidratadas, sem que haja perda significativa da capacidade de germinação. Para estas, o processo de dessecamento deve ser cuidadosamente conduzido

(Salomão *et al.*, 2003).

O método padrão para determinar a umidade de sementes é o método de estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  que consiste na secagem de sementes inteiras por um período de 24 horas. As amostras são pesadas antes da desidratação, obtendo-se o peso fresco inicial e após a desidratação, determinando-se o peso seco. O período de exposição à temperatura de  $105^{\circ}\text{C}$  pode variar de 17 a 72 horas, no entanto, para sementes de espécies do Cerrado tem sido adotado o período de 24 horas de permanência na estufa (Salomão *et al.*, 2003).

A técnica de criopreservação, armazenamento em nitrogênio líquido, proporciona o potencial para uma preservação sem limites de tempo, com a redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é virtualmente paralisada (Kartha, 1985 citado por Wetzel *et al.*, 2004). Esta técnica apresenta as vantagens de oferecer maior segurança quanto à perda de viabilidade e do baixo custo de armazenamento, uma vez que não exige sistemas de refrigeração e de eletricidade (Cunha, 1996).

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Coleta, beneficiamento e seleção de aquênios**

Os aquênios usados nos testes de germinação, umidade e conservação foram coletados em uma população localizada na Fazenda Água Limpa, da Universidade de Brasília (15°58'29"S 47°56'55"W) no dia 03 de agosto de 2004, período de seca, quando se dá a dispersão dos frutos. A coleta foi feita manualmente com a retirada completa da inflorescência de vários indivíduos em estágio de maturação e dispersão de sementes, selecionados de forma aleatória (Figura 2.1).

Os aquênios foram retirados das inflorescências manualmente, processados em soprador para eliminar o máximo possível das impurezas presentes, como pedaços de folhas, caule e palha e armazenados em temperatura ambiente.

Para o teste de germinação, os aquênios foram selecionados pelo método densimétrico em água destilada (Hammerton *et al.*, 1989 citado por Silva, 1998; Paron, 2002) que consistiu em colocá-los em um béquer de 5 litros contendo 3 litros de água destilada e agitando com um bastão de vidro por 3 minutos, com descanso de 10 minutos. Após esse período, foi feita a separação entre os aquênios sobrenadantes ou chochos daqueles que se depositaram no fundo do béquer, sendo estes utilizados para o experimento de germinação.

### **Determinação da umidade**

A umidade inicial foi determinada pelo método de estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de acordo com “Regras para Análise de Sementes” (Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 1992) usando 4 amostras de 100 sementes do lote inicial coletado.

A umidade dos aquênios submetidos ao teste densimétrico foi também determinada pelo método de estufa a  $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, sendo medida em quatro períodos de repouso (1, 8, 24 e 48 horas) sobre papel toalha após o teste densimétrico. Foi usada uma amostra de 100 aquênios para cada período.

### **Testes de germinação**

O poder germinativo do lote de aquênios coletado e o seu poder germinativo foi previamente após o teste densimétrico utilizando quatro repetições de 500 aquênios. Cada



amostra teve seus aquênios separados, sobrenadantes e aqueles que afundaram, e germinados separadamente em substrato entre papel, em temperaturas alternadas de 20-30°C e fotoperíodo de 12 horas. A duração do teste foi de 21 dias. Os valores obtidos nestas avaliações prévias serviram para estimar a quantidade necessária de aquênios para a realização dos experimentos de germinação e conservação.

Para avaliar o comportamento germinativo da arnica adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado montado em esquema fatorial 9x3 com quatro repetições de 50 aquênios. Foi avaliado o efeito de oito temperaturas constantes (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°C) e as temperaturas alternadas de 20-30°C, sobre a germinação, usando três tratamentos pré-germinativos (KNO<sub>3</sub>, GA<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O), em germinadores da marca Percival, com variações de temperatura de ± 2°C e fotoperíodo de 12 horas.

Os aquênios selecionados pelo teste densimétrico foram contados e separados em três lotes de 1.800 aquênios, correspondendo aos três tratamentos pré-germinativos. Cada lote recebeu um dos tratamentos: (1) submersão em KNO<sub>3</sub> (0,1% p/v) por 24 horas; (2) submersão em GA<sub>3</sub> por 24 horas; e (3) substrato umedecido com água (testemunha).

Cada lote amostrado foi subdividido em nove sub-lotes de 200 aquênios, correspondente a uma das nove temperaturas avaliadas.

O experimento foi conduzido em substrato germtest, cujos rolos foram acondicionados em sacos plásticos fechados e colocados nos germinadores nas temperaturas correspondentes.

Durante o período de nove semanas foram feitas avaliações diárias da germinação. O parâmetro usado para a germinação foi a protrusão da radícula, sendo considerada germinada toda a semente com emergência e curvatura inicial da radícula (Figura 2.2).

Os dados de germinabilidade foram convertidos para arco seno já que os valores encontrados estão distantes do valor médio da distribuição (p=50%) (Santana & Ranal, 2004) e submetidos à análise variância (teste F), utilizando o programa PRISM, e ao teste de Tukey com significância de 5% , utilizando o programa SANET.

O tempo médio de germinação (t) e a velocidade média de germinação (v) foram calculados, segundo Labouriau (1983):

onde: 
$$T = \sum n_i \cdot t_i / \sum n_i \text{ (dias)}$$

T = tempo médio de germinação

$n_i$  = número de sementes germinadas num intervalo de tempo

$t_i$  = intervalo de tempo de germinação

### **Estabelecimento de protocolos para conservação**

Aquênios selecionados pelo método de densidade em água e aquênios não submetidos ao teste densimétrico foram usados no experimento de conservação. O material foi armazenado por 2, 4, 6, 8, 10 e 12 meses à temperatura ambiente, a 10 °C (em geladeira), a -20 °C (em freezer) e a -196 °C (em nitrogênio líquido). As sementes armazenadas nestas condições de temperatura foram avaliadas a cada dois meses até o período final de armazenamento. Foram usadas quatro repetições de 50 aquênios nas avaliações de germinabilidade.

O material submetido ao teste densimétrico foi seco com folha de papel absorvente e ficou em repouso sobre a bancada, em temperatura ambiente, por 48 horas, antes do armazenamento.

Os aquênios foram acondicionados em envelopes aluminizados trifoliados (polietileno-alumínio-polietileno) selado com fita crepe e etiquetado com informações da temperatura de conservação, tempo de conservação e origem dos aquênios. Em cada envelope foram acondicionados 200 aquênios.

O material submetido à conservação foi germinado a temperatura de 20°C, em papel Germtest embebido em água. A temperatura de regeneração foi determinada de acordo com os dados obtidos no teste de germinação.

A avaliação da germinação após a conservação foi feita semanalmente por um período de quatro semanas. Os valores finais de germinabilidade foram usados na análise dos dados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### **Determinação da umidade**

A determinação da umidade inicial dos aquênios originalmente coletados a campo apresentou um valor médio de 8,0%  $\pm$ 0,08 de umidade. Este valor de umidade mostrou-se apropriado para o experimento de armazenamento nas distintas temperaturas adotadas, não sendo necessário expô-los ao processo de dessecação.

A umidade dos aquênios submetidos ao teste densimétrico, após quatro períodos de repouso sobre papel toalha, foram os seguintes: 12,4% (1 hora); 9,5% (8 horas); 9,4% (24 horas) e 8,5% (48 horas).

Nota-se que houve um aumento significativo do teor de umidades dos aquênios durante o teste densimétrico em água. No entanto, após 48 horas de repouso sobre o papel toalha, em temperatura ambiente (26 a 28 °C) o teor de umidade dos aquênios praticamente voltou ao valor inicial do lote (8,0%  $\pm$ 0,08 de umidade).

### **Testes de germinação**

O lote de aquênios provenientes da Fazenda Água Limpa, UnB, apresentou média de 25% de aquênios selecionados pelo teste densimétrico, com uma germinabilidade de 40,5% à temperatura de 20-30 °C. Em contrapartida, os demais 75,0% de aquênios sobrenadantes ou chochos, apresentaram uma baixa germinabilidade, 1,0%. Considerando a avaliação do lote total dos aquênios, foi verificado uma de germinabilidade 11,0%. Os dados sobre a dinâmica inicial do lote de aquênio se encontram na Tabela 2.1.

O método de seleção prévia de aquênio mostrou-se muito eficiente no trabalho realizado por Paron (2002), com *L.ericoides*. Apenas 7% de aquênios de *L.ericoides* foram selecionados pelo teste densimétrico, e estes apresentaram uma germinabilidade entre 95 e 98% em vermiculita em casa de vegetação com temperaturas médias de 30° C dia e 22° C noite, usando períodos de 30, 60 e 90 dias de armazenamento a 5° C e umidade de 13%. No trabalho realizado por Silva (1994), com *Lychnophora pinaster*, a melhor condição apresentada para germinação foi o uso de substrato entre papel em temperatura alternada de 20-30° C com germinabilidade de 79,18%.

O teste densimétrico promoveu uma efetiva seleção de aquênios viáveis, o que aumentou a quantidade de aquênios germinados, tanto nos testes de germinação quanto no experimento de conservação.

Foi avaliada a porcentagem de germinação de aquênios de arnica a partir do material submetido ao teste densimétrico. A análise estatística dos dados (Tabela 2.2) mostrou que o efeito dos tratamentos utilizados não foi significativo na germinação de aquênios de arnica, com valores de  $P = 0,4492$  e porcentagem total de variação de 0,03%. Isso significa que os promotores de germinação utilizados no experimento não favoreceram significativamente a germinação, não promovendo um aumento significativo da quantidade de aquênios germinados. No entanto, os efeitos de “temperatura” e a “interação” tratamento/temperaturas foram extremamente significantes com valores de  $P < 0,0001$  para ambos e de porcentagem de variação de 95,7% e 2,5% respectivamente. Assim, os aquênios de arnica germinaram diferentemente quanto expostos às diferentes temperaturas do experimento e nas interações entre tratamento e temperatura. As tabelas 2.3 e 2.4 mostram os resultados do teste de média (Tukey 5%) da germinabilidade de arnica para os efeitos de temperaturas e interação (temperaturas x tratamentos), respectivamente. Dados em arco seno.

O comportamento germinativo de aquênios de arnica nas condições de temperaturas e tratamentos do experimento está representado no gráfico da Figura 2.3. Os dados usados no gráfico são valores da porcentagem simples de aquênios germinados no período do experimento (Tabela 2.5.).

As curvas de germinação acumulada de aquênios de arnica em cada uma das temperaturas estão representadas na Figura 2.4. Os valores usados são os números de aquênios germinados ao longo do período de execução do experimento. A tabela 2.6 mostra os valores do tempo médio para a germinação dos aquênios nas diferentes temperaturas e pré-tratamentos.

Os aquênios de arnica não germinaram nas temperaturas extremas de 5° C e 40° C.

Entre as temperaturas nas quais ocorreu a germinação, 10° C foi a pior condição

térmica para a germinação de arnica. As porcentagens de germinação foram de 1,5% , 1,0% e 8,5 % de germinação para os tratamentos água, KNO<sub>3</sub> e GA<sub>3</sub>, respectivamente, iniciando-se a partir do 49º dia após o semeio. Os valores do tempo médio de germinação foram os mais longos do experimento, com 58 dias em água, 66 dias em KNO<sub>3</sub> e 55 dias em GA<sub>3</sub>. Nota-se que sob temperatura de 10°C, o uso de GA<sub>3</sub> favoreceu significativamente a germinação em aquênios de arnica.

A partir de 15°C os valores de germinação foram maiores, porém variando consideravelmente entre as temperaturas adotadas. À temperatura de 15°C, a germinação iniciou entre o 15º e o 17º dias após o semeio, e germinabilidade de 49,5% (testemunha), 68,5% (KNO<sub>3</sub>) e 68% (GA<sub>3</sub>). A germinação ocorreu de forma dispersa e com início tardio em relação às temperaturas favoráveis à germinação. O uso de KNO<sub>3</sub> e GA<sub>3</sub> favoreceu a germinação de maneira similar e significativamente maior em relação ao uso da água, para esta temperatura. Os tempos médios de germinação de aquênios para esta temperatura foram um dos mais longos do experimento, sendo de 30 dias em água, 32 dias em KNO<sub>3</sub> e 28 dias em GA<sub>3</sub>.

A 20°C, as porcentagens de germinação foram de 76,5% em água, 78,0% em KNO<sub>3</sub> e 65,5% e em GA<sub>3</sub>, iniciando aos 11º, 10º e 8º dias, respectivamente. O comportamento germinativo para os tratamentos foi uniforme, com um crescente aumento de germinação até os 20º e 25º dias. Os tempos médios de germinação dos aquênios foram de 22 dias em testemunha e em KNO<sub>3</sub> e de 21 dias em GA<sub>3</sub>. O uso de tratamentos pré-germinativos não apresentou diferenças significativas na germinabilidade de arnica nesta temperatura.

Para as temperaturas alternadas de 20-30°C, os valores de germinação foram de 67,0% para testemunha, 81,5% em KNO<sub>3</sub> e 66,5% em GA<sub>3</sub>, com início de germinação aos 6º, 7º, e 6º dias, respectivamente. Para esta temperatura, também houve um comportamento germinativo uniforme entre os tratamentos, não apresentando diferença significativa entre eles. A velocidade de germinação dos aquênios foi similar nos três tratamentos, sendo de 19 dias em água e GA<sub>3</sub> e de 20 dias para KNO<sub>3</sub>.

O teste de média para os efeitos de temperaturas mostram que as temperaturas de 20° C e 20-30° C não diferem significativamente quanto a germinabilidade de arnica.

A temperatura de 35°C não foi favorável à germinação de aquênios de arnica, com valores inferiores de germinação, a qual foi mais dispersa ao longo do período do experimento, comparando-se às demais temperaturas. A germinação iniciou-se entre o 8º e o 15º dias e as porcentagens de germinação foram de 41% (H<sub>2</sub>O), 21,5% (KNO<sub>3</sub>) e 15,5% (GA<sub>3</sub>). Nota-se que os valores para água foram nitidamente maiores do que os demais tratamentos. Isso deve-se à possível desnaturação dos compostos pela elevada temperatura, reduzindo a germinação dos aquênios em relação à testemunha. Os valores de tempo médio de germinação foram o segundo mais elevado do experimento, com 35 dias em água, 34 dias em KNO<sub>3</sub> e 31 dias em GA<sub>3</sub>.

Às temperaturas de 25°C e 30°C o comportamento germinativo de arnica foi similar, não havendo diferença significativas entre elas e entre os tratamentos dentro de cada temperatura. Os valores respectivos de germinabilidade são de 66,5% e 63,5% para testemunha, 54,5% e 55,5% em KNO<sub>3</sub> e 62,5 para ambos em GA<sub>3</sub>. A 25°C, a germinação iniciou-se entre o 4º e o 9º dia e apresentou uma curva de germinação uniforme. A germinação ocorreu de forma mais rápida para a temperatura de 25°C, apresentando tempos médios de germinação de 18 dias em água, 17 dias em KNO<sub>3</sub> e 16 dias em GA<sub>3</sub>. A 30°C, o início da germinação ocorreu entre o 6º e o 8º dias e apresentou germinação mais dispersa em relação àquela a 20°C. O tempo médio para a germinação foi de 20 dias em água, 17 dias em KNO<sub>3</sub> e 18 dias em GA<sub>3</sub>.

De acordo com os resultados obtidos, a temperatura de 20°C apresenta-se como a melhor opção para a germinação de aquênios de arnica, não havendo necessidade do uso de promotores de germinação.

### **Estabelecimento de protocolos para conservação**

Na Figura 2.5 estão representados os efeitos das diferentes condições de armazenamento sobre a germinação de aquênios de arnica. Evidenciou-se uma diferença qualitativa e quantitativa entre os materiais selecionados e não selecionados. A tabela 2.7 e 2.8 mostram os resultados da análise de variância dados de conservação de aquênios de

arnica selecionados e aquênios não submetidos ao teste densimétrico, respectivamente.

O material não selecionado (A) não apresentou diferença significativa no comportamento germinativo entre as temperaturas adotadas. No entanto, o tempo de armazenamento mostrou-se significativo para este tipo de material. Esse comportamento pode ser explicado pela heterogeneidade do material colhido a campo, com presença de muitos aquênios chochos.

O material selecionado (B) apresentou um comportamento germinativo uniforme entre os períodos e as temperaturas de armazenamento. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para os valores de germinação obtidos para os períodos de armazenamento nas condições de temperatura testadas.

No entanto, houve diferença significativa entre os períodos de conservação, para aquênios selecionados e não selecionados ( $P < 0,001$ ). A variação total encontrada entre os períodos foi de 20,9% para aquênios selecionados e de 23,37% para os aquênios não selecionados. As tabelas 2.9 e 2.10 mostram o resultado do teste de média (Tukey 5%) para os períodos de conservação de aquênios de arnica selecionados e aquênios não submetidos ao teste densimétrico, respectivamente. Dados de germinabilidade em arco seno.

As tabelas 2.11 e 2.12 mostram, respectivamente, os valores médios de germinabilidade de aquênios selecionados e aquênios não submetidos ao teste densimétrico, no experimento de conservação.

Para os aquênios selecionados, o período de oito meses de conservação apresentou os maiores valores médios e mais uniformes, variando entre 70 e 75% de germinação. O período de seis meses em nitrogênio líquido resultou na menor porcentagem de germinação (55,5%). O período de 10 meses apresentou os menores valores de germinação nas demais temperaturas, 64,5% (temperatura ambiente), 62% (10°C) e 60,5% (-20°C).

A diferença significativa foi constatada apenas entre os períodos que apresentaram os maiores e menores valores de germinabilidade: 8 meses e 10 meses, respectivamente. Não houve diferença significativa quanto às médias de germinabilidade entre os períodos de 2, 4, 6, 8 e 12 meses.

Os aquênios não submetidos ao teste densimétrico apresentaram uma baixa germinabilidade em todas as condições do experimento. No entanto, o comportamento germinativo em resposta aos diferentes períodos de conservação não foi similar ao material selecionado. Aos seis meses de conservação, estes aquênios apresentaram germinabilidade variando entre 23% (temperatura ambiente) e 30,5% (10°C), sendo os maiores valores encontrados para este tipo de material. Esses aquênios apresentaram maior uniformidade de germinação no período de doze meses, com valores variando entre 18,5% e 21,5%. Para o período de dois meses de armazenamento foram observados os menores valores de germinabilidade variando entre 14,5% e 22%.

A prévia seleção dos aquênios mostrou-se efetiva, já que os aquênios não submetidos ao teste densimétrico apresentaram porcentagens de germinação variando entre 14,5% e 30,5%, enquanto que para o material selecionado, esses valores foram entre 55,5% e 75%.

De acordo com os resultados obtidos, a conservação de aquênios de arnica pode ser realizada por um período de no mínimo um ano, não sendo necessária a utilização de temperaturas baixas para a realização do procedimento, já que não houve queda na porcentagem de germinação ao longo do tempo. No entanto, sugere-se a seleção prévia, por teste densimétrico em água, dos aquênios coletados a campo.

Por outro lado, os resultados evidenciam que os aquênios de arnica não se mostraram sensíveis à exposição a baixas temperaturas (10°C) e temperaturas subzero (-20°C e -196°C) por um período de 12 meses. Isso sugere a possibilidade de conservação de aquênios de *L. ericoides* por períodos superiores a 1 ano.



## CONCLUSÕES

O teste densimétrico foi uma técnica efetiva na seleção de aquênios viáveis: aumenta o rendimento germinativo do material colhido a campo e promove uma germinação mais uniforme.

Os aquênios de arnica não apresentaram dormência: uso de tratamentos pré-germinativos não incrementou de forma significativa o percentual de germinação.

A condição mais adequada para a germinação de arnica foi sob temperatura de 20°C em papel germitest embebido em água. O uso da temperatura alternada de 20-30°C com KNO<sub>3</sub> não se justifica devido ao custo adicional do procedimento sem vantagens adicionais quanto à germinação.

Os aquênios de arnica com teor de umidade  $\leq$  a 8,0% podem ser armazenados a baixas temperaturas por um período 12 meses sem perdas significativas quanto ao percentual de germinação, evidenciando que as sementes de arnica são ortodoxas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.P. DE; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1998. 464p.

BASTOS, M.; CERQUEIRA, S.; SOUZA, J.T.; AMADO JR., R.; PEIXOTO, A.B.F.. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica). **Ciência e Cultura**. v.39, n.5/6, p.551-553, 1987

BOHLMANN, F.; MÜELLER, L.; KING, R.M.; ROBINSON, H.. Naturally occurring terpene derivatives. A guaianolide and other constituents from *Lychnophora* species. **Phytochemistry**. v.20, v.5, p.1149-1151, 1981

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R.M.; ROBINSON, H.. **A new type of sesquiterpenes lactones from *Lychnophora salicifolia***. **Liebigs Ann. Chem.**. Berlin. v.8, p.1455-1458, 1983

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R.M.. Caryophyllene derivatives and heliangolide from *Lychnophora* species. **Phytochemistry**. v.19, p.2381-2385, 1980

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R.M. 1982. **Germacranolides from *Lychnophora* species**. **Phytochemistry**. v.21, n.5, p.1087-1091.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R.M.. Humulene derivatives including a sesquiterpene acid with a rearranged carbon skeleton from *Lychnophora columnaris*. **Phytochemistry**. v.21, n.3, p.685-689, 1982.

BORELLA, J.C.; LOPES, J.L.C.; LEITÃO FILHO, H.F.; SEMIR, J.; DIAZ, J.G.; HERZ, W. Eudesmanolides and 15-deoxygoyazensolide from *Lychnophora pseudovillosissima*. **Phytochemistry**. v.41, n.2, p.692-695, 1992.

BRASIL, Regras para análise de sementes. **Ministério da Agricultura e Reforma Agrária**. Brasília, 365p, 1992.

CHIARI, E; RASLAN, D.S.; BOAVENTURA, M.A.D.; DUARTE, D.S.; SAÚDE, D.A.; SILVA, K.P.P.; OLIVEIRA, A.B.. Atividade tripanossomicida de sesquiterpenos de espécies do gênero *Lychnophora* (Asteraceae). In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 13., Fortaleza, CE. **Resumo de temas livres**. Fortaleza, CE. 128, 1994

COSTA, F.B.; DIAS, D.A.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.. Flavonoids and heliangolides from *Lychnophora diamantinana*. **Phytochemistry**. v.34, n.1, p.261-263, 1993

COYLE, N.C. & S.B. JONES. *Lychnophora* (Compositae; Vernoniae), a genus endemic to the Brazilian planalto. **Brittonia**, 33(4): 528-542, 1981.

CUNHA, R. Métodos alternativos para conservação de germoplasma-semente. In: Puignau, J.P. e R. Cunha. Diálogo XLV. **Conservacion de germoplasma vegetal**. IICA. Montevideo, p. 123-128, 1996.

CUNHA, W.R.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; DIAZ, J.G.; HERZ, W. Eremantholides and a guainolide from *Lychnophora rupestris*. **Phytochemistry**. v.39, n.2, p.387-389, 1995.

EIRA, M.T.S. Classificação de sementes em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias. In: Puignau, J.P. e R. Cunha. Diálogo XLV. **Conservacion de germoplasma vegetal**. IICA. Montevideo, p. 119-122, 1996.

FAIAD, M. G. R., GONDIM, M.T. P., FERREIRA, F. R., MIRANDA, A.R., BARBOSA, N. F., VASCONCELOS, L. C. **Conservação de germoplasma vegetal – semente a longo prazo**. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,. Circular Técnica, 1, 35p, 1998.

FAIAD, M.G.R, GOEDERT, C.O., WETZEL, M. M. V DA S., SILVA, D. B., PEREIRA, N, L.G. **Banco de Germoplasma de sementes da Embrapa**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos, 71. 31p, 2001.

GOTTLIEB, O.R. M.A.C. KAPLAN. Amazônia: Tesouro químico a preservar. **Ciência Hoje**, 11(61):17-20, 1990.

LEONEL, S., RODRIGUES, J. D. Efeitos de giberelinas, citocininas e do nitrato de potássio, no processo germinativo de sementes de limoeiro `cravo' (*Citrus limonia osbeck*). **Scientia Agricola**. , vol.56, n<sup>o</sup>.1, p.111-116, 1999.

LIBERAL, O. H. T., COELHO, R. C. **Manual do laboratório de análise de sementes**. Pesagro-Rio. Niterói, R, J v.1, 95p, 1980.

LOPES, N.P. A essência da arnica. **Revista Fapesp Perquisa**, n<sup>o</sup> 64, p 42 – 44, 2001.

MIGUEL, O.G.; LIMA, E.O.; MORAIS, V.M.F.; GOMES, S.T.A.; MONACHE, F.D.; CRUZ, A.B.; CRUZ, R.C.B.; CECHINEL FILHO, V. Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, 10:694-696, 1996.

MOURA, V. P. G. **Efeito da temperatura na germinação de sementes de *Eucalyptus urophylla*** S. T. Blake. Boletim de Pesquisa n<sup>o</sup> 15. Embrapa CPAC. Planaltina, DF 19p. 1982.

PARON, M.E. **Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares em *Lychnophora ericoides* Mart. (Arnica-da-Serra), efeitos da inoculação e estudos de propagação.** Tese - Doutorado em Microbiologia, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 99p, 2002.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany** 80, 223-230, 1997.

SALOMÃO, A.N. Tropical seed species responses to liquid nitrogen exposure. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 14(2), p 133-138, 2002.

SALOMÃO, A.N., FAIAD, M. G. R. CUNHA, R. Seed health and variability of *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillet after dehydration and storage. **Hort Science**, v. 31(5), p.876, 1996.

SALOMÃO, A. N.; DAVIDE, A.C.; FIRETTI, F.; SOUSASILVA, J.C.; CALDAS, L.S.; WETZEL, M.M.S ; TORRES, R.A.; GONZÁLES, S.. Germinação de sementes e produção de mudas de plantas do Cerrado. 1. ed. Brasília: **Rede de Sementes do Cerrado**. 96 p, 2003.

SANTANA, D., G., RANAL, M.A. **Análise da germinação – um enfoque estatístico**. Brasília: Universidade de Brasília, 2004. 248p.

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora ericoides* Mart. (Vernominaceae: compositae).** Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 515p, 1991.

SAÚDE, D.A.; RASLAN, D.S.; DE OLIVEIRA, A.B. Teste de atividade antitumoral e anti-HIV de lactonas sesquiterpênicas de *Lychnophora trichocarpa* Spreng. (Asteraceae). In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil, 13., Fortaleza, CE. **Resumo de temas livres**. Fortaleza, CE. 129p, 1994.

SILVA, J. A., SALOMÃO, A.N., FAIAD, M. G. R. VALOIS, A.C.C. NÁVIA, D, SILVA, P.P, NORONHA, S.E, SANTOS, A.A. **Conservação *ex situ* de aroeira ( *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) – Anacardiaceae em bancos de germoplasma**. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 54. 40p, 2000.

SILVA, S.M.P. **Aspectos da fenologia e da reprodução sexuada da arnica [*Lychnophora pinaster* Mart.] Asteraceae**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 45p, 1994.

VALOIS, A. C. C., SALOMÃO, A. N., ALLEM, A. N. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Serviço de Produção de Informação,. Documentos, 22. 62p, 1996.

VICHEWSKI, W.; LINS, A.P.; HERZ, W.; MURARI, R. Lychnopholic acid and its acetate from *Lychnophora martiana*. **Phytochemistry**. v.19, p.685-686, 1980.

VIEIRA, R. F., MARTINS, M. V. M. Recursos Genéticos de Plantas Medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. Botucatu-SP, v.3, n.1, p.13-15, 2000.

WALTER, B. M. T. **Biodiversidade e Recursos Genéticos: Questões e Conceitos**. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,. Documentos, 46.48p, 2000.

WETZEL, M. M. V. S, REIS, R.B., RAMOS, K. M. **Metodologia para criopreservação de sementes de espécies florestais nativas**. Brasília, DF. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Circular Técnica, 26.22p, 2003.

Tabela 2.1. Dinâmica do lote de aquênios da Fazenda Água Limpa quanto ao número de aquênios selecionados e não selecionados pelo teste densimétrico e seus respectivos valores de germinação após 21 dias. Valores de 4 repetições de 500 sementes.

Repetição	NS	GNS	S	GS
A	410	6	90	54
B	375	3	125	49
C	335	3	165	48
D	372	4	128	55
Média	373	4	127	51,5
%	74,6	1,07	25,4	40,47
Total	1492	16	508	206
%		11,1		

NS = aquênios não selecionados (chochas)

GNS = número de NS germinadas

S = aquênios selecionados

GS = número de S germinadas

Tabela 2.2. Análise de variância dos dados de germinação de aquênios de arnica em 9 temperaturas e 3 tratamentos pré-germinativos

Fonte de Variação	% total de variação	P
Interação	2,49	P<0.0001
Tratamento	0,03	0,4492
Temperatura	95,72	P<0.0001

Fonte de Variação	valores de P	Significante?
Interação	***	Sim
Tratamento	ns	Não
Temperatura	***	Sim

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Interação	16	1129	70,56	7,207
Tratamento	2	15,83	7,914	0,8083
Temperatura	8	43380	5423	553,8
Residual	81	793,1	9,791	

Tabela 2.3. Teste de Tukey das médias de germinabilidade do parâmetro temperatura do experimento de germinação de aquênios de arnica (*L. ericoides*). Valores em arco seno.

Temperatura (°C)	n° repetições.	Médias	5%	1%
20	12	48.996668	a	A
20-30	12	48.406667	ab	A
15	12	44.919168	b	A
25	12	44.679166	b	A
30	12	44.430833	b	A
35	12	28.291667	c	B
10	12	8.400834	d	C
40	12	0.000000	e	D
5	12	0.000000	e	D

Medidas seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado 66

D.M.S. 5% = 4.07197 - D.M.S. 1% = 4.77043

D.M.S = diferença mínima significativa

Tabela 2.4. Teste de Tukey dos dados de germinação em arranjo fatorial entre 9 temperaturas de três tratamentos pré-germinativos. Valores em arco seno.

Temperatura	Tratamentos		
	Testemunha	KNO <sub>3</sub>	GA <sub>3</sub>
5° C	0,00 a D	0,00 a D	0,00 a C
10° C	6,07 b D	2,86 b D	16,26 a B
15° C	40,15 b BC	47,41 a AB	47,20 a A
20° C	50,08 a A	50,60 a A	46,30 a A
25° C	46,71 a AB	42,03 a B	45,29 a A
30° C	45,53 a AB	45,16 a B	42,60 a A
35° C	36,49 a C	26,42 b C	21,96 b B
40° C	0,00 a D	0,00 a D	0,00 a C
20-30° C	46,86 a AB	51,65 a A	46,70 a A

Medidas seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%

As letras maiúsculas relacionam as temperaturas dentro do tratamento.

As letras minúsculas relacionam os tratamentos dentro da temperatura.



Tabela 2.5. Germinação total final de aquênios de arnica em diferentes temperaturas e tratamentos após 67 dias de contagem. Valores em porcentagem.

Temperatura	Testemunha				média
	A	B	C	D	
5°C	0	0	0	0	0
10°C	2	2	2	0	1,5
15°C	58	36	56	48	49,5
20°C	80	68	78	80	76,5
25°C	62	68	66	70	66,5
30°C	62	76	66	50	63,5
35°C	48	36	50	30	41,0
40°C	0	0	0	0	0
20-30°C	60	70	74	64	67,0

Temperatura	KNO <sub>3</sub>				média
	A	B	C	D	
5°C	0	0	0	0	0
10°C	0	4	0	0	1
15°C	68	68	74	64	68,5
20°C	74	80	80	78	78,0
25°C	52	76	44	46	54,5
30°C	52	46	62	62	55,5
35°C	18	26	16	26	21,5
40°C	0	0	0	0	0
20-30°C	80	88	68	90	81,5

Temperatura	GA <sub>3</sub>				média
	A	B	C	D	
5°C	0	0	0	0	0
10°C	4	10	6	14	8,5
15°C	72	68	74	58	68,0
20°C	56	66	76	64	65,5
25°C	64	58	64	64	62,5
30°C	58	56	80	56	62,5
35°C	26	18	8	10	15,5
40°C	0	0	0	0	0
20-30°C	68	60	68	70	66,5

Tabela 2.6. Tempo médio de germinação de *L. ericoides* em diferentes temperaturas e tratamentos pré-germinativos.

Temperatura	testemunha			KNO <sub>3</sub>			GA <sub>3</sub>		
	Média G%	TMG	DP	Média G%	TMG	DP	Média G%	TMG	DP
5°C	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
10°C	1,5	58,0	3,6	1	66,0	33	8,5	54,8	3,6
15°C	49,5	30,0	2,4	68,5	31,8	1,4	68	28,4	1,9
20°C	76,5	21,8	3,9	78	22,1	1,1	65,5	20,6	1,4
25°C	66,5	17,8	1,0	54,5	17,3	1,6	62,5	16,3	1,4
30°C	63,5	19,9	3	55,5	17,5	1,9	62,5	17,8	1,6
35°C	41	34,6	2,8	21,5	34,5	4,2	15,5	31,3	4,4
40°C	0	0,0	0	0	0,0	0	0	0,0	0
20-30°C	67	18,9	1,9	81,5	19,9	1,2	66,5	18,8	1,5

TMG (tempo médio de germinação) =  $\sum n_i \cdot t_i / \sum n_i$  (dias)

onde:

$n_i$  = número de sementes germinadas num intervalo de tempo

$t_i$  = intervalo de tempo de germinação

DP = desvio padrão de TMG

Tabela 2.7. Análise de variância dos dados de conservação de aquênios de arnica selecionados pelo teste densimétrico.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Interação	15	122,6	8,176	1,073
Temperatura armazen.	3	50,88	16,96	2,225
Período (mês)	5	190,9	38,18	5,009
Resíduo	72	548,9	7,623	

Fonte de Variação	% total de variação	P	valores de P	Significante?
Interação	13,43	0,3964	ns	Não
Temperatura armazen.	5,57	0,0926	ns	Não
Período (mês)	20,9	0,0005	***	Sim

ns = não significativo

Tabela 2.8. Análise de variância dos dados de conservação de aquênios de arnica não submetidos ao teste densimétrico.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F
Interação	15	220,3	14,69	0,9019
Temperatura armazen.	3	98,28	32,76	2,011
Período (mês)	5	454,7	90,94	5,584
Resíduo	72	1173	16,29	

Fonte de Variação	% total de variação	P	valores de P	Significante?
Interação	11,32	0,5653	ns	Não
Temperatura armazen.	5,05	0,1199	ns	Não
Período (mês)	23,37	0,0002	***	Sim

ns = não significativo

Tabela 2.9. Teste de Tukey das médias de germinabilidade do parâmetro período do experimento de conservação de aquênios de arnica (*L. ericoides*) selecionados pelo teste densimétrico. Valores em arco seno.

Período	n° repetições	Médias	5%	1%
8 meses	16	48.704374	a	A
12 meses	16	47.760626	ab	AB
4 meses	16	47.205001	ab	AB
2 meses	16	47.035627	ab	AB
6 meses	16	45.800627	ab	AB
10 meses	16	44.803749	b	B

Medidas seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 3.12384 - D.M.S. 1% = 3.73624

D.M.S = diferença mínima significativa

Tabela 2.10. Teste de Tukey das médias de germinabilidade do parâmetro período do experimento de conservação de aquênios de arnica (*L. ericoides*) não submetidos ao teste densimétrico. Valores em arco seno.

Período	n° repetições.	Médias	5%	1%
6 meses	16	29.649375	a	A
4 meses	16	29.257500	ab	A
8 meses	16	26.389375	abc	AB
10 meses	16	25.774375	abc	AB
12 meses	16	25.436250	bc	AB
2 meses	16	23.562500	c	B

Medidas seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância indicado

D.M.S. 5% = 4.17250 - D.M.S. 1% = 4.99048

D.M.S = diferença mínima significativa

Tabela 2.11. Porcentagem média de germinação de amíca aos 28 dias em 6 períodos de conservação sob temperatura ambiente, 10°C, -20°C e nitrogênio líquido (NL). Aquênios selecionados pelo teste densimétrico.

Temperatura ambiente (G%)					
Período	A	B	C	D	Média
2 meses	62	82	72	60	69,0
4 meses	50	80	72	82	71,0
6 meses	86	68	74	62	72,5
8 meses	78	64	68	78	72,0
10 meses	66	60	68	64	64,5
12 meses	64	74	80	74	73,0

10°C (G%)					
Período	A	B	C	D	Média
2 meses	60	74	66	66	66,5
4 meses	76	56	60	66	64,5
6 meses	70	60	72	52	63,5
8 meses	76	70	78	76	75,0
10 meses	70	54	64	60	62,0
12 meses	62	72	68	62	66,0

- 20°C (G%)					
Período	A	B	C	D	Média
2 meses	56	68	68	54	61,5
4 meses	62	66	66	82	69,0
6 meses	60	68	62	72	65,5
8 meses	68	64	78	80	72,5
10 meses	62	78	54	48	60,5
12 meses	78	64	74	72	72,0

NL (G%)					
Período	A	B	C	D	Média
2 meses	64	78	78	74	73,5
4 meses	84	56	64	70	68,5
6 meses	58	60	44	60	55,5
8 meses	68	74	62	76	70,0
10 meses	60	51	77	47,5	59,0

12 meses 70 72 72 56 67,5

Tabela 2.12. Porcentagem média de germinação de amíga aos 28 dias em 6 períodos de conservação sob temperatura ambiente, 10°C, -20°C e nitrogênio líquido (NL). Aquênios não selecionados pelo teste densimétrico.

Temperatura ambiente (G%)					
Período	A	B	C	D	Média
2 meses	12	16	18	12	14,5
4 meses	20	28	14	32	23,5
6 meses	28	20	20	24	23,0
8 meses	28	26	20	26	25,0
10 meses	18	14	18	10	15,0
12 meses	16	22	18	18	18,5

10°C (G%)					
Período	A	B	C	D	Média
2 meses	4	22	28	16	17,5
4 meses	28	22	38	28	29,0
6 meses	36	26	26	34	30,5
8 meses	6	36	26	32	25,0
10 meses	20	20	14	22	19,0
12 meses	20	20	16	24	20,0

- 20°C (G%)					
Período	A	B	C	D	Média
2 meses	14	14	16	20	16,0
4 meses	16	30	22	26	23,5
6 meses	28	20	30	30	27,0
8 meses	16	22	18	20	19,0
10 meses	22	16	24	24	21,5
12 meses	18	34	20	14	21,5

NL (G%)					
Período	A	B	C	D	Média
2 meses	16	26	22	24	22,0
4 meses	24	30	10	36	25,0
6 meses	24	26	22	38	27,5
8 meses	28	22	22	6	19,5
10 meses	24	30	22	32	27,1

12 meses	26	20	22	12	20,0
----------	----	----	----	----	------

---



Figura 2.1 Detalhe da inflorescência (capítulo) de arnica *L. ericoides* em diferentes estágios de maturação: frutificação (A); floração (B); dessecação (C); maturação (D).



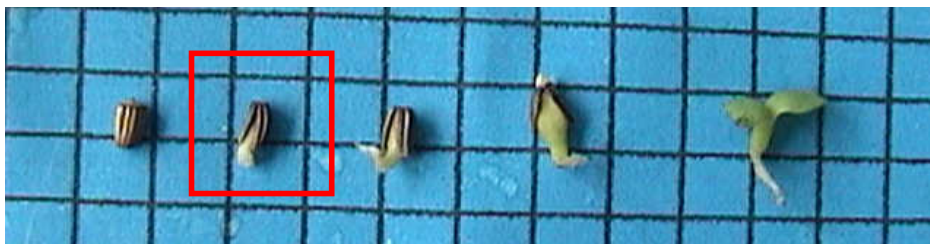


Figura 2.2. Quatro estágios de germinação de aquênios de arnica. Detalhe evidenciando curvatura inicial da radícula.

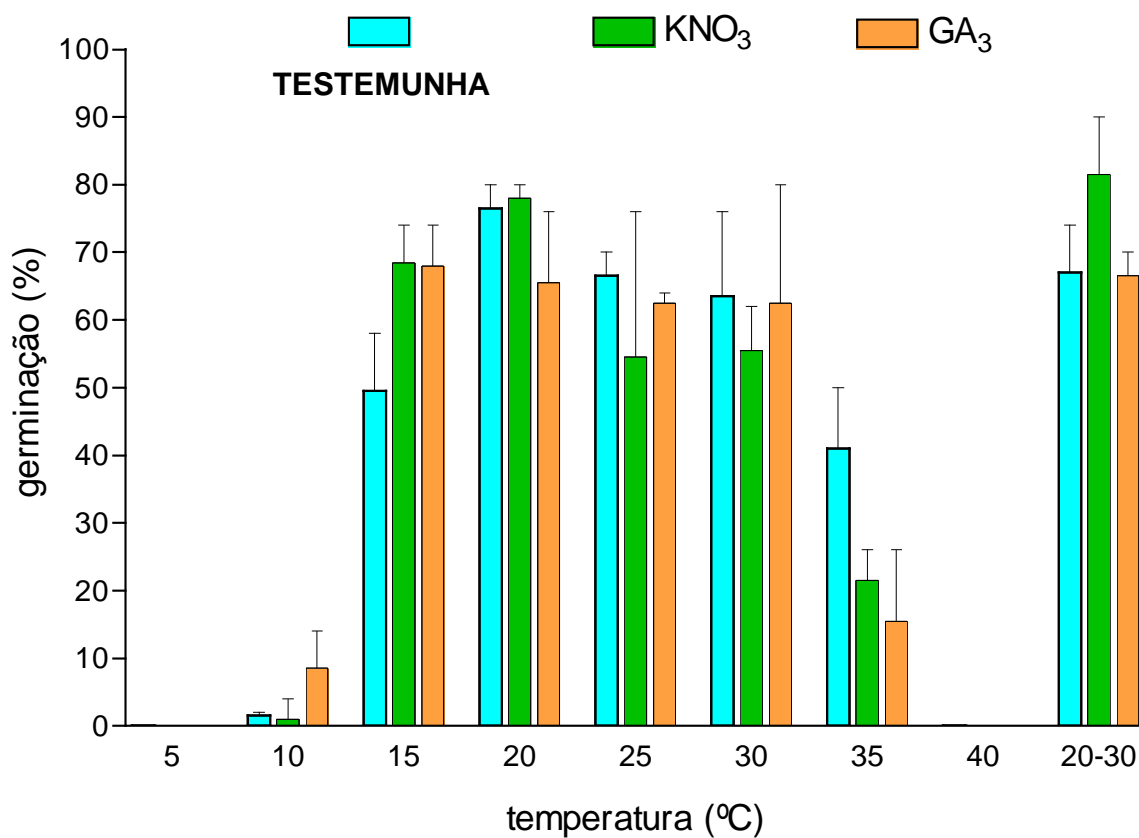


Figura 2.3. Efeito de temperaturas constantes e alternadas e de tratamentos pré-germinativos sobre a porcentagem final de germinação de sementes de *Lychnophora ericoides*.

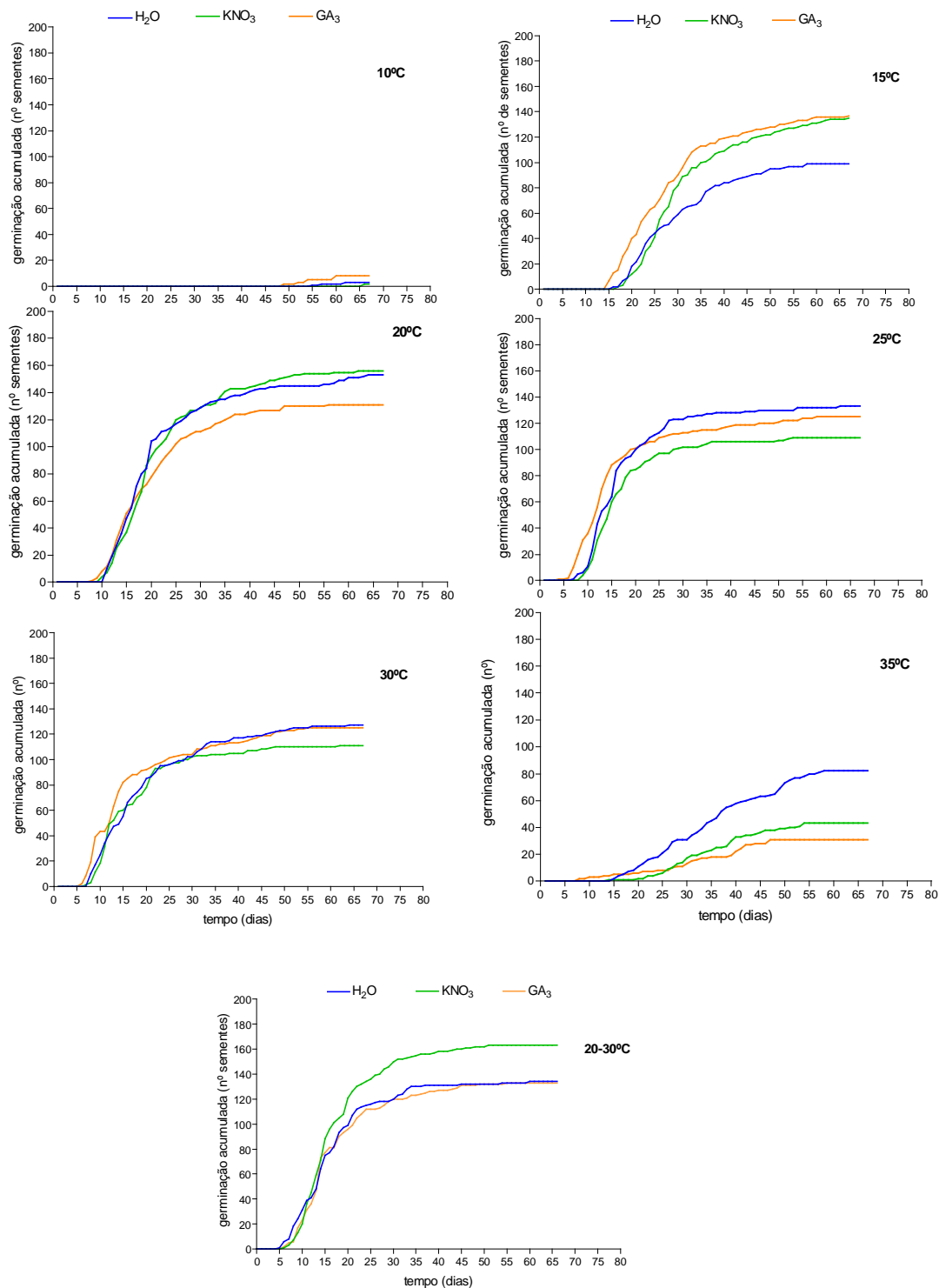


Figura 2.4. Efeito de temperaturas constantes e alternadas e de tratamentos pré-germinativos sobre a germinação acumulada de sementes de *Lychnophora ericoides*.

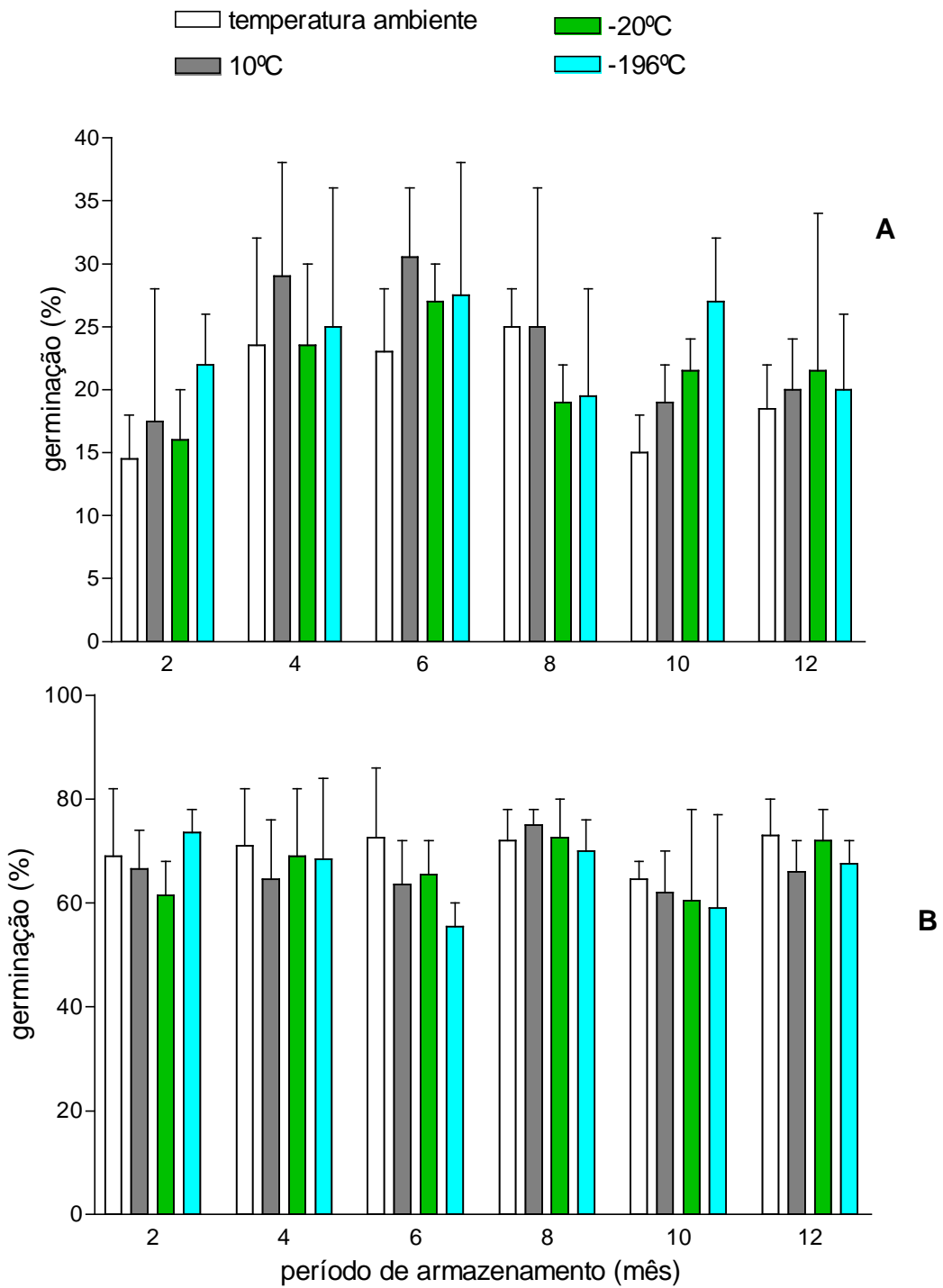


Figura 2.5. Efeito de diferentes condições de armazenamento num período de doze meses sobre as sementes de *Lychnophora ericoides* não selecionadas (A) e selecionadas (B) pelo teste densimétrico