# POPULAÇÕES DE *Lychnophora pinaster* MART. EM MINAS GERAIS: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ANATÔMICOS, QUÍMICOS E GENÉTICOS

**JAMILE JORGE DA SILVA FERREIRA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção de título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Fisiologia do Metabolismo Vegetal.

**BOTUCATU – SP**

**-2024-**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

# POPULAÇÕES DE *Lychnophora pinaster* MART. EM MINAS GERAIS: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ANATÔMICOS, QUÍMICOS E GENÉTICOS

**JAMILE JORGE DA SILVA FERREIRA**

**ORIENTADORA: PROFª DRª MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção de título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica), Área de concentração: Fisiologia do Metabolismo Vegetal.

**BOTUCATU – SP**

**-2024-**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Ferreira, Jamile Jorge da Silva.
Populações de *Lychnophora pinaster Mart*. em Minas Gerais : aspectos morfológicos, anatômicos, químicos e genéticos / Jamile Jorge da Silva Ferreira. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Marcia Ortiz Mayo Marques
Capes: 20300000

1. Genética de populações. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Plantas medicinais. 4. Retroelementos. 5. Sequências repetitivas dispersas.

Palavras-chave: Elementos repetitivos; Genética de populações; Oléos essenciais; Plantas medicinais; Retrotransposons.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE JAMILE JORGE DA SILVA FERREIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BOTÂNICA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.**

Aos 26 dias do mês de abril do ano de 2024, às 08:30 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de JAMILE JORGE DA SILVA FERREIRA, intitulada **POPULAÇÕES DE *Lychnophora pinaster* MART. EM MINAS GERAIS: ASPECTOS MORFOLÓGICOS, ANATÔMICOS, QUÍMICOS E GENÉTICOS.** A Comissão Examinadora foi constituida pelos seguintes membros: Dr.ª MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Centro de Pesquisa de Recursos Genéticos Vegetais / Instituto Agronômico de Campinas, Pesquisadora Dr.ª MARIA IMACULADA ZUCCHI (Participação Virtual) do(a) Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológica do Centro Sul / Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio - APTA, Pesquisadora Dr.ª MARIA DA PAZ LIMA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Produtos Naturais / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA-Manaus/AM, Profa. Dra. TATIANE MARIA RODRIGUES (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biodiversidade e Bioestatística / Instituto de Biociências de Botucatu UNESP, Prof. Dr. MARCOS VINICIUS BOHRER MONTEIRO SIQUEIRA (Participação Virtual) do(a) Universidade Estadual de Minas Gerais - UEMG. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: **APROVADO.** Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Dr.ª MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES

gov.br Documento assinado digitalmente
MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES
Data: 29/04/2024 09:45:43-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

**Dedico em primeiro lugar à Deus, que me fortalece a cada dia e ilumina os meus caminhos.**

**À minha família que muito me apoia em todas as minhas empreitadas.**

**Dedico a todos, colegas, amigos e sem exceção, aos amados PROFESSORES que tanto contribuíram nesta minha caminhada!**

## Agradecimentos

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES por nos conceder a bolsa, pois sem ela, a realização deste trabalho seria impossível.

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos Programas de Pós-Graduação: em Ciências Biológicas (Botânica) e Biologia Vegetal pelas oportunidades concedidas para o meu aperfeiçoamento e aprendizado profissional, pela disponibilidade de recursos, laboratórios e técnicos disponíveis tanto no IB em Botucatu, quanto em Rio Claro. Agradeço ainda, a todos os professores e professoras pela oportunidade de aprendizado durante as disciplinas cursadas.

Ao Instituto Agronômico de Campinas – IAC pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional, pela disponibilização de sua estrutura e recursos, e pelo acolhimento a mim dispensado.

Agradeço a Profa. Dra. Marcia Ortiz Mayo Marques pela orientação deste trabalho, pela dedicação, comprometimento e cuidados dispensados a mim durante todo o tempo em que estivemos na luta desenvolvendo essa pesquisa. Professora Marcia, serei grato por toda vida!!

A Dra. Maria Imaculada Zucchi e toda a equipe do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ – USP – Piracicaba, por disponibilizar toda sua estrutura para a realização de análises de dados moleculares, pelo acolhimento e atenção a mim dirigidos.

Agradeço aos colegas com os quais pude dividir momentos de aprendizado durante a realização das disciplinas que cursei.

As meninas: Andriele, Rosani e Malu pela parceria nas disciplinas, pelas saídas de campo, pelo compartilhamento de conhecimentos e pela amizade. Gratidão à todas!!

Aos amigos que fiz no IAC, no laboratório de Fitoquímica. Mariana, Paulo, Rafael, Júlio, Sandra, Daniela e Marina, obrigado pelas conversas e compartilhamento de experiências.

Agradeço aos colegas Roberto, Jonathan, Mateus e Zirlane pela ajuda na realização do tratamento e análises dos dados moleculares, e em especial, à Carol e João Vitor pela colaboração na montagem das bibliotecas GBS realizadas no Laboratório do Departamento de Genética da ESALQ.

Enfim, agradeço a Deus por me tornar forte e resiliente diante das adversidades da vida, por me iluminar e fazer enxergar saídas para a resolução de quaisquer problemas, agradeço a minha família, que mesmo longe, está sempre apoiando, mesmo sem entender o que estou a fazer. A todos, sem exceção, minha eterna gratidão!!

# SUMÁRIO

**Página**

LISTA DE TABELAS .....I

LISTA DE FIGURAS ..... II

LISTA DE SIGLAS .....III

**I. INTRODUÇÃO GERAL**.....18

1. O Gênero *Lychnophora* Mart.....18

1.1. Principais espécies de *Lychnophora* utilizadas na medicina popular.....18

**2.** Aspectos Morfológicos e Anatômicos de *Lychnophora pinaster* Mart.....21

3. Aspectos Fitoquímicos de *Lychnophora pinaster* Mart.....25

4. Atividade Biológica de *Lychnophora pinaster* Mart.....28

5. Estrutura populacional, diversidade genética e química de *Lychnophora pinaster* Mart....32

6. DNA Repetitivo-DNA satélite.....35

7. Marcadores SSRs e SNPs.....38

8. Elementos Transponíveis TEs.....41

**II. OBJETIVOS**.....44

**III. REFERÊNCIAS**.....45

**IV. CAPÍTULO I - *Lychnophora pinaster* Mart.: Uma Revisão sobre aspectos: Morfológicos, Anatômicos, Químicos e Genéticos de Populações ocorrentes em Minas Gerais**.....60

1. INTRODUÇÃO.....61

2. MATERIAIS MÉTODOS.....64

2.1. Levantamento de materiais botânicos – Histórico dos estudos realizados.....64

2.2. Estudos que trataram aspectos morfológicos e anatômicos de *L. pinaster*.....65

2.3. Histórico dos estudos que trataram dos componentes químicos dos óleos essenciais de *L. pinaster*.....66

2.4. Estudos de diversidade e estrutura genética – Principais estudos realizados.....66
2.5. Principais análises de material genético empregadas nos estudos revisados.....67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....71
3.1. Características morfológicas e anatômicas.....71
3.2. Caracterização de *Lychnophora pinaster* Mart.....73
3.3. Aspectos da composição química dos óleos essenciais de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.....77
3.4. Diversidade genética de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.: análises com marcadores microssatélites – SSRs.....82
3.5. Estrutura genética de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.: análises com marcadores microssatélites – SSRs.....83
4. CONCLUSÃO.....89
5. REFERÊNCIAS.....90
**V. CAPÍTULO II - Estrutura genética populacional e componentes químicos de óleos essenciais compartilhados entre populações de *Lychnophora pinaster* Mart.**.....95
1. INTRODUÇÃO.....96
2. MATERIAL E MÉTODOS.....98
2.1. Extração de DNA.....98
2.2. Quantificação e Normalização de DNA.....99
2.3. Preparação das Bibliotecas Genômicas.....99
2.4. Genotipagem de descoberta de marcadores SNP.....100
2.5. Diversidade e estrutura genética.....100
2.6. Análises dos componentes químicos dos óleos essenciais de *L. pinaster*.....101
2.7. Análise de agrupamentos em função dos componentes químicos dos óleos essenciais de *L. pinaster*.....101
3. RESULTADOS E DISCUSÃO.....102
3.1. Populações de *Lychnophora pinaster*, descoberta de SNP e processamento de dados.102

3.2. Diversidade Genética de Populações de *L. pinaster*.....105

3.3. Estrutura Genética de dezesseis populações de *L. pinaster*.....107

3.4. Compostos químicos de óleos essenciais compartilhados entre populações de *Lychnophora pinaster Mart*.....118

4. CONCLUSÃO.....127

5. REFERÊNCIAS.....128

**VI. CAPÍTULO III - Populações de *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae): composição repetitiva em sequências do DNA.....**133

1. INTRODUÇÃO.....134

2. MATERIAIS E MÉTODOS.....137

2.1. Extração de DNA.....137

2.2. Quantificação e Normalização de DNA.....137

2.3. Preparação das Bibliotecas Genômicas.....138

2.4. Genotipagem de descoberta de marcadores SNP.....138

2.5. Identificação e seleção de elementos transponíveis (TEs).....139

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....141

3.1. Anotação e identificação preliminar de elementos transponíveis em *Lychnophora pinaster*.....141

3.2. Diversidade de elementos retrotransposons Ty1-copia/SIRE/Tork/Ivana em *Lychnophora pinaster* Mart.....148

3.3. Diversidade de elementos retrotransposons Ty3-Gypsy/Tekay/Reina em *Lychnophora pinaster* Mart.....152

3.4. Elementos frequentes de Ty1-copia e Ty3-gypsy em *Lychnophora pinaster* Mart.....155

3.5. Análise individual e comparativa entre populações de *Lychnophora* sp.....157

4. CONCLUSÃO.....164

5. REFERÊNCIAS.....165

VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....171

# LISTA DE TABELAS

**Página**

**Tabela 1.** Populações, códigos das populações, regiões e altitude das áreas de distribuição dos indivíduos de *Lychnophora pinaster* e estudos já realizados para 15 populações no estado de Minas Gerais, Brasil.....68

**Tabela 2.** Diferenças morfológicas e anatômicas entre *L. ericoides* Mart. e *L. pinaster* Mart...71

**Tabela 3.** Substâncias majoritárias presentes nos óleos essenciais de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.....78

**Tabela. 4.** Índices de diversidade genética das populações de *Lychnophora pinaster* Mart. analisadas em estudos realizados com base em marcadores microssatélites – SSRs.....86

**Tabela 5.** Número de indivíduos de dezesseis populações de *Lychnophora pinaster* sequenciados e selecionados.....104

**Tabela 6.** Índices de diversidade genética para as dezesseis populações de *L. pinaster* distribuídas por quatro mesorregiões de Minas Gerais.....106

**Tabela 7.** Substâncias majoritárias compartilhadas entre quinze populações de *Lychnophora pinaster* Mart., ocorrentes em quatro mesorregiões de Minas Gerais.....122

**Tabela 8.** Frequências de elementos Ty1-copia em *Clusters* e domínios codificantes internos do DNA repetitivo de *Lychnophora pinaster* Mart.....146

**Tabela 9.** Informações das amostras das populações de *Lychnophora* sp. e códigos utilizados nas análises.....158

**Tabela 10.** Classes/linhagens de DNA repetitivo e suas proporções genômicas (%) identificadas em análises individuais das populações de arnica (*Lychnophora sp.*), utilizando o RepeatExplorer2.....158

**Tabela 11.** Classes de DNA repetitivo e suas proporções genômicas (%) identificadas na análise comparativa entre as populações de arnica (*Lychnophora sp.*), utilizando o RepeatExplorer2.....161

# LISTA DE FIGURAS

**Página**

**Figura 1.** Distribuição do gênero *Lychnophora* Mart. pelo território brasileiro.....18

**Figura 2.** Espécies de *Lychnophora* utilizadas na medicina popular. **A.** *L. ericoides*, **B.** *L. granmogolensis*, **C.** *L. passerina*, **D.** *L. pinaster* e **E.** *L. salicifolia*.....19

**Figura 3.** Distribuição de populações de *L. pinaster* em 3 mesorregiões do estado de Minas Gerais.....22

**Figura 4.** Distribuição geográfica das populações de *Lychnophora pinaster* Mart. no estado de Minas Gerais. **Região Norte de Minas Gerais:** Diamantina (DIMa), Itacambira/Botumirim (ITBO), Olhos D'Água (OD), Grão Mogol (GM); **Região Metropolitana de Belo Horizonte:** Caeté/Rio Acima (CTRA), Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC), Ouro Branco (OB), Serra da Moeda (SM), Serra do Rola Moça (SRM); **Campo das Vertentes:** Antena (ANT), Areia Branca (AB), Poço Bonito (PB), Serra da Arnica (SA), Serra do Sofá (SS).....64

**Figura 5.** Hábitos, ilustrações e características micromorfológicas e anatômicas de indivíduos de *Lychnophora pinaster* Mart. (**A**-**B**). Ilustrações de ramo, fruto e folhas de *L. pinaster*; (a-e). Imagens dos hábitos; (g-i). Imagens de características anatômicas das folhas e (f). Estômato.....72

**Figura 6.** Ilustração de ramo e fruto; (**A-C).** Imagens do hábito, glomérulos e frutos de *Lychnophora pinaster* Mart.....76

**Figura 7.** Vias metabólicas e substâncias sintetizadas partindo da glicose no metabolismo especializado de plantas.....81

**Figura 8.** Análise de agrupamento utilizando genótipos multilocos de *Lychnophora pinaster* Mart. Admixture model contendo 3 populações de *L. pinaster* (admitindo k=3), demonstradas pelas cores verde, azul e vermelha.....88

**Figura 9.** Fst par a par entre as sete populações de *Lychnophora pinaster* analisadas. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil. OB: Ouro Branco, PB: Poço Bonito, SS: Serra do Sofá, SA: Serra da Arnica, SSa: Serra do Salto, SB: Serra Branca, AB: Areia Branca.....88

**Figura 10.** Atribuição Bayesiana de 186 indivíduos de *Lychnophora pinaster* em (A) K=2, (B) K=3 e (C) K=4 *clusters* utilizando o software STRUCTURE v.2.3.4. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil. OB: Ouro Branco, PB: Poço Bonito, SS: Serra do Sofá, SA: Serra da Arnica, SSa: Serra do Salto, SB: Serra Branca, AB: Areia Branca.....88

**Figura 11.** Quatro mesorregiões do estado de Minas Gerais, áreas de distribuição das 16 populações de *Lychnophora pinaster*.....102
**Figura 12.** Dendograma e *heatmap* baseado no índice de fixação ($F_{st}$) de Wright expressando grande diferenciação entre as populações de *L. pinaster* ocorrentes em 4 mesorregiões do estado de Minas Gerais. GM: Grão Mogol, ITBO: Itacambira/Botumirim, DIMa: Diamantina, DI: Diamantina, OD: Olhos D'Água, ODMa: Olhos D'Água/Diamantina, CTRA: Caeté/Rio Acima, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, OB: Ouro Branco, SM: Serra da Moeda (SM), SEM: Serra do Rola Moça, AB: Areia Branca, SA: Serra da Arnica, SB: Serra Branca, SSa: Serra do Salto e SS: Serra do Sofá.....109
**Figura 13.** Estimativa do modelo PCAdapt para formação de quatro grupos genéticos entre 16 populações de *L. pinaster*. Grão Mogol (MG), Itacambira/Botumirim (ITBO), Diamantina (DIMa), Diamantina (DI), Olhos D'Água/Diamantina (ODMa) e Olhos D'Água (OD); Caeté/Rio Acima (CTRA), Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC), Ouro Branco (OB), Serra da Moeda (SM) e Serra do Rola Moça (SRM); Areia Branca (AB), Serra da Arnica (SA), Serra Branca (SB), Serra do Salto (SSa) e Serra do Sofá (SS).....111
**Figura 14.** Teste *Admixture* de 16 Populações de *Lychnophora pinaster* do estado de Minas Gerais. (**A**). K=6, grupos genéticos de **I-VI** e (**B**). K=9, grupos genéticos de **I-IX**. AB: Areia Branca, CTRA: Caeté/Rio Acima, DI: Diamantina, DIMa: Diamantina, GM: Grão Mogol, ITBO: Itacambira/Botumirim, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, OB: Ouro Branco, OD: Olhos D'Água, ODMa: Olhos D'Água/Diamantina, SA: Serra da Arnica, SB: Serra Branca, Serra da Moeda, SRM: Serra do Rola Moça, SS: Serra do Sofá, SSa: Serra do Salto.....113
**Figura 15.** Análise discriminante (DAPC) a partir de SNPs de 16 populações de *Lychnophora pinaster*. AB: Areia Branca, CTRA: Caeté/Rio Acima, DI: Diamantina, DIMa: Diamantina, GM: Grão Mogol, ITBO: Itacambira/Botumirim, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, OB: Ouro Branco, OD: Olhos D'Água, ODMa: Olhos D'Água/Diamantina, SA: Serra da Arnica, SB: Serra Branca, SM: Serra da Moeda, SRM: Serra do Rola Moça, SS: Serra do Sofá, SSa: Serra do Salto.....117
**Figura 16.** Dendrograma de similaridade química dos óleos essenciais de 15 populações de *Lychnophora pinaster* Mart.. ANT: Antena, AB: Areia Branca, ERE: Estrada Real, CTRA: Caeté/Rio Acima, DIMa: Diamantina, GM: Grão Mogol, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, OB: Ouro Branco, OD: Olhos D'Água, PB: Poço Bonito, SA: Serra da Arnica, SB: Serra Branca, SM: Serra da Moeda, SSa: Serra do Salto, SSo: Serra do Sofá.....123
**Figura 17.** Dendrograma baseado em 154 compostos químicos presentes nos óleos essenciais de 15 populações de *Lychnophora pinaster* Mart. das regiões Norte, Metropolitana de Belo

Horizonte e Campo das Vertentes do estado de Minas Gerais. Os agrupamentos refletem o compartilhamento de substâncias entre as populações.....123
**Figura 18.** Análise de *clusters* baseada no Algorítimo de Agrupamento *Kmeans* para populações de *Lychnophora pinaster*, sendo tomado como quantidade ótima de *clusters*, o K=3. ANT: Antena, AB: Areia Branca, ERE: Estrada Real, PB: Poço Bonito, SA: Serra da Arnica, SSa: Serra do Salto, SS: Serra do Sofá; CTRA: Caeté/Rio Acima, DIMa: Diamantina, OD: Olhos D'Água, GM: Grão Mogol, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, OB: Ouro Branco e SM: Serra da Moeda.....126
**Figura 19.** Análise de componentes principais (PCA) a partir das substâncias majoritárias compartilhadas pelas 15 populações de *Lychnophora pinaster* Mart. ANT: Antena, AB: Areia Branca, ERE: Estrada Real, PB: Poço Bonito, SA: Serra da Arnica, SSa: Serra do Salto e Serra do Sofá, CTRA: Caeté/Rio Acima, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, OB: Ouro Branco, SM: Serra da Moeda, OD: Olhos D'Água, GM: Grão Mogol, DIMa: Diamantina.....126
**Figura 20.** Sistema de classificação para elementos transponíveis. **(A)**. Classificação dos elementos transponíveis de acordo com a ordem, superfamília e classe de elementos segundo a organização das sequências do DNA e os seus domínios codificantes, e **(B)**. Esquema de organização da Classe I – LTR-Retrotransposons e suas duas superfamílias e linhagens de acordo com os seus domínios codificantes.....140
**Figura 21.** Resumo gráfico dos *superclusters* obtidos após análises preliminares da composição repetitiva do DNA de 16 populações de *Lychnophora pinaster* Mart. …….....142
**Figura 22.** Dendrograma baseado em agrupamentos pareados (UPGMA) de 66 elementos/linhagens/famílias Ty1-copia de acordo com formação de clusters em cinco domínios codificantes internos: RH, INT, PROT, GAG e RT. Análise preliminar da composição repetitiva do DNA de populações de *Lychnophora pinaster*….....143
**Figura 23.** Tabela de anotações de elementos transponíveis: Ty1-copia e suas linhagens e Ty3-gypsy e suas linhagens em análise preliminar para a composição do DNA repetitivo de 16 populações de *Lychnophora pinaster* Mart., distribuídas por quatro mesorregiões do estado de Minas Gerais.....145
**Figura 24.** Dendrograma baseado em agrupamentos pareados (UPGMA) de 79 elementos/linhagens/famílias Ty3-gypsy de acordo com formação de *clusters* em cinco domínios codificantes internos: RH, INT, PROT, GAG e RT. Análise preliminar da composição repetitiva do DNA de populações de *Lychnophora pinaster*.....147
**Figura 25.** Representatividade dos elementos SIRE Ty1-copia nos cinco domínios codificantes internos: Integrase (INT), RNAse H (RH), Protease (PROT), Grupo Antígeno Específico

(GAG) e Transcriptase Reversa (RT) na porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.....148
**Figura 26.** Representatividade dos elementos TORK Ty1-copia em quatro domínios codificantes internos: Integrase (INT), RNAse H (RH), Protease (PROT) e Transcriptase Reversa (RT) na porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.....150
**Figura 27.** Representatividade dos elementos IVANA Ty1-copia em quatro domínios codificantes internos: Integrase (INT), RNAse H (RH), Protease (PROT) e Transcriptase Reversa (RT) na porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.....151
**Figura 28.** Representatividade dos elementos TEKAY Ty3-gypsy em cinco domínios codificantes internos: Integrase (INT), RNAse H (RH), Protease (PROT), Grupo Antígeno Específico (GAG) e Transcriptase Reversa (RT) na porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.....153
**Figura 29.** Representatividade dos elementos REINA Ty3-gypsy em dois domínios codificantes internos: RNAse H (RH) e Reversa (RT) na porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.....154
**Figura 30.** Ocorrência de Linhagens/famílias Ty1-copia e Ty3-gypsy na formação de *clusters*. Análise preliminar da porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.....155
**Figura 31.** Frequência de ocorrências de linhagens/famílias Ty1-copia e Ty3-gypsy na composição da porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.....156
**Figura 32.** Frequência de linhagens/famílias Ty1-copia e Ty3-gypsy por domínio codificante interno. Análise preliminar da composição das sequências repetitivas do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.....157
**Figura 33.** Abundância relativa (%) de sequências repetitivas nas populações individuais de arnica (*Lychnophora* sp.) conforme análise usando o RepeatExplorer2. lp. *Lychnophora pinaster*, ls. *Lychnophora salicifolia*.....159
**Figura 34**. Proporção genômica das sequências repetitivas de duas superfamílias da ordem LTR identificadas nas populações de arnica (*Lychnophora* sp.). Ty1-copia e suas linhagens. Ty3-gypsy e suas linhagens. (lp. *Lychnophora pinaster*, ls. *Lychnophora salicifolia*.....160
**Figura 35**. Comparação da composição repetitiva entre as populações de arnica (*Lychnophora sp.*) inferida a partir de uma análise comparativa do RepeatExplorer2. As colunas representam diferentes *clusters* e as cores representam diferentes repetições. Em vermelho (Tekay), e em verde (SIRE) representando as principais linhagens de DNA repetitivo componentes dos genomas de *Lychnophora pinaster* e *Lychnophora salicifolia*.....163

# LISTA DE SIGLAS

AB – Areia Branca

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ANT – Antena

APTA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios

BH – Belo Horizonte

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAPS – *Cleaved Amplified Polymophic Sequence*

CG-DIC – Cromatografia a Gás com Detector de Ionização de Chama

CG-EM – Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas

CTRA – Caeté/Rio Acima

DAPC – Análise Discriminante de Componentes Principais

DI – Diamantina

DIMa – Diamantina

ERE – Estrada Real

ESALQ – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

$F_{ST}$ – Coeficiente de Endogamia

GM – Grão Mogol

GPS – *Global Positioning System*

$H_E$ – Heterozigosidade Esperada

$H_O$ – Heterozigosidade Observada

IAC – Instituto Agronômico

IB – Instituto de Biociências

ITBO – Itacambira/Botumirim

ISSR – *Inter Simple Sequence Repeats*

NGS – *Next-Generation Sequencing*

NLSC – Nova Lima Serra da Calçada

OB – Ouro Branco

OD – Olhos D'Água

ODMa – Olhos D'Água/Diamantina

PB – Poço Bonito

PCA – Análise de Componentes Principais

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RAPD – *Randon Amplified Polymorphic DNA*

SA – Serra da Arnica

SB – Serra Branca

SCAR – *Sequence Characterized Amplified Regions*

SM – Serra da Moeda

SRM – Serra do Rola Moça

SNPs – *Single Nucleotide Polymorphisms*

SSa – Serra do Salto

SSo – Serra do Sofá

SSCP – *Singe-Strand Conformation Polymorphism*

SSR – *Simple Sequence Repeats*

STR – Repetições de Tandem Curto

STS – *Sequence Tagged Sites*

TEs – Elementos Transponíveis

UNESP – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

USP – Universidade de São Paulo

**Resumo**

*Lychnophora pinaster* Mart., espécie endêmica do estado de Minas Gerais, é largamente utilizada como planta medicinal na medicina popular ao longo da cadeia montanhosa da Serra do Espinhaço. A espécie apresenta características polimórficas tanto para os aspectos morfológicos quanto para aspectos químicos dos óleos essenciais, além de apontar para uma grande diferenciação genética entre várias populações já estudadas anteriormente. *L. pinaster* é uma espécie irmã de *L. ericoides* com a qual, geralmente é muito confundida. Características morfológicas unidas às características anatômicas poderão auxiliar na separação entre as duas espécies. Diante deste contexto, este trabalho teve como principal objetivo realizar um estudo destacando os diversos aspectos morfológicos, anatômicos, químicos e genéticos de populações de *L. pinaster* ocorrentes no estado de Minas Gerais, buscando fornecer novos elementos e subsídios para futuros programas de conservação desta espécie, tendo como objetivos específicos: (i) Caracterizar grupos de características morfológicos e anatômicos relevantes para a identificação de *L. pinaster*; (ii) Realizar uma revisão sobre características morfológicas, anatômicas, genéticas e componentes químicos de populações de *L. pinaster*, destacando aspectos da composição química dos óleos essenciais de 15 populações; (iii) Identificar elementos de sequências repetitivas do DNA presentes em *L. pinaster*, através de marcadores moleculares (SNPs) presentes em populações da espécie, ocorrentes no estado de Minas Gerais; (iv) Verificar a estruturação populacional de 16 populações de *L. pinaster* ocorrentes em quatro mesorregiões do estado de Minas Gerais através de análises de marcadores SNPs; e (v) Verificar níveis de compartilhamento de compostos químicos entre populações de *L. pinaster* de uma mesma região ou de regiões diferentes. A revisão bibliográfica sobre aspectos de características morfológicas, anatômicas, químicas e genéticas confirmam o caráter polimórfico dos indivíduos das 15 populações quanto as características morfológicas evidenciadas após análises de 98 materiais, aspectos anatômicos como feixes vasculares colaterais, ausência de esclereides, estômatos projetados acima das demais células epidérmicas e ausência de criptas estomáticas são fortes caracteres para diferenciar *L. pinaster* de espécies muito próximas como *L. ericoides*, sendo os aspectos da composição química dos óleos essências e a genética de populações, dois pontos essenciais para o entendimento do comportamento das populações da espécie. A composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster* evidencia a diferenciação de duas grandes grupos de populações em função de duas classes de compostos: Sesquiterpenos e Fenilpropanóides contribuindo para a divisão das populações por região de ocorrência, o mesmo, é verificado para os agrupamentos obtidos após análises realizadas com marcadores moleculares: SSRs e SNPs, onde os grupos genéticos formados sugeriram fortes evidencias para agrupamentos em função das regiões de ocorrência das populações estudadas. As análises para identificação do DNA repetitivo em sequências de indivíduos de *L. pinaster*, revelaram preliminarmente uma abundância de 16 linhagens/famílias, sendo oito de Ty1-copia e oito de Ty3-gypsy. Os resultados dos dados analisados revelaram uma grande diversidade de características apresentadas por populações de *L. pinaster*. O acréscimo de informações e conhecimentos sobre esta espécie, poderá auxiliar no futuro na construção de planos de manejo e conservação de suas populações ameaçadas de extinção.

**Palavras-chave:** Elementos repetitivos, Genética de populações, Óleos essenciais, Plantas medicinais, Retrotransposons

**Abstract**

*Lychnophora pinaster* Mart., a species endemic to the state of Minas Gerais, is widely used as a medicinal plant in folk medicine along the mountain range of Serra do Espinhaço. The species presents polymorphic characteristics for both morphological and chemical aspects of essential oils, in addition to pointing to a great genetic differentiation between several populations previously studied. *L. pinaster* is a sister species of *L. ericoides* with which it is often confused. Morphological characteristics together with anatomical characteristics may help in the separation between the two species. In this context, the main objective of this work was to carry out a study highlighting the various morphological, anatomical, chemical and genetic aspects of *L. pinaster* populations occurring in the state of Minas Gerais, seeking to provide new elements and subsidies for future conservation programs of this species, with the following specific objectives: (i) To characterize groups of morphological and anatomical characteristics relevant to the identification of *L. pinaster*; (ii) To conduct a review of morphological, anatomical, genetic and chemical components of *L. pinaster* populations, highlighting aspects of the chemical composition of essential oils from 15 populations; (iii) To identify elements of repetitive DNA sequences present in *L. pinaster*, through molecular markers (SNPs) present in populations of the species, occurring in the state of Minas Gerais; (iv) To verify the population structure of 16 populations of *L. pinaster* occurring in four mesoregions of the state of Minas Gerais through analysis of SNP markers; and (v) To verify levels of sharing of chemical compounds between populations of *L. pinaster* from the same region or from different regions. The literature review on aspects of morphological, anatomical, chemical and genetic characteristics confirm the polymorphic character of the individuals of the 15 populations regarding the morphological characteristics evidenced after analysis of 98 materials, anatomical aspects such as collateral vascular bundles, absence of sclereids, stomata projected above the other epidermal cells and absence of stomatal crypts are strong characters to differentiate *L. pinaster* from very different species. *L. ericoides* and the aspects of the chemical composition of the essential oils and the genetics of populations, are two essential points for understanding the behavior of the populations of the species. The chemical composition of the essential oils of *L. pinaster* evidences the differentiation of two major groups of populations due to two classes of compounds: Sesquiterpenes and Phenylpropanoids, contributing to the division of populations by region of occurrence, the same is verified for the groupings obtained after analyses carried out with molecular markers: SSRs and SNPs, where the genetic groups formed suggested strong evidence for groupings according to the regions of occurrence of the populations studied. The analyses for the identification of repetitive DNA in sequences of individuals of *L. pinaster* preliminarily revealed an abundance of 16 lineages/families, eight of Ty1-copia and eight of Ty3-gypsy. The results of the analyzed data revealed a great diversity of characteristics presented by populations of *L. pinaster*. The addition of information and knowledge about this species may help in the future in the construction of management and conservation plans for its endangered populations.

**Keywords:** Essential oils, Medicinal plants, Population genetics, Repetitive elements, Retrotransposons

# I. INTRODUÇÃO GERAL

## 1. O gênero *Lychnophora* Mart.

*Lychnophora* é um gênero pertencente à família Asteraceae (Compositae) (SEMIR *et al*., 2011), circunscrito dentro da classe Equisetopsida, subclasse Magnoliidae e ordem Asterales (LOEUILLE *et al*., 2015). O gênero *Lychnophora* é endêmico do Brasil (BFG, 2021) com cerca de 29 espécies descritas e distribuição confirmada para os estados da Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Piauí, São Paulo e Tocantins (Figura 1).

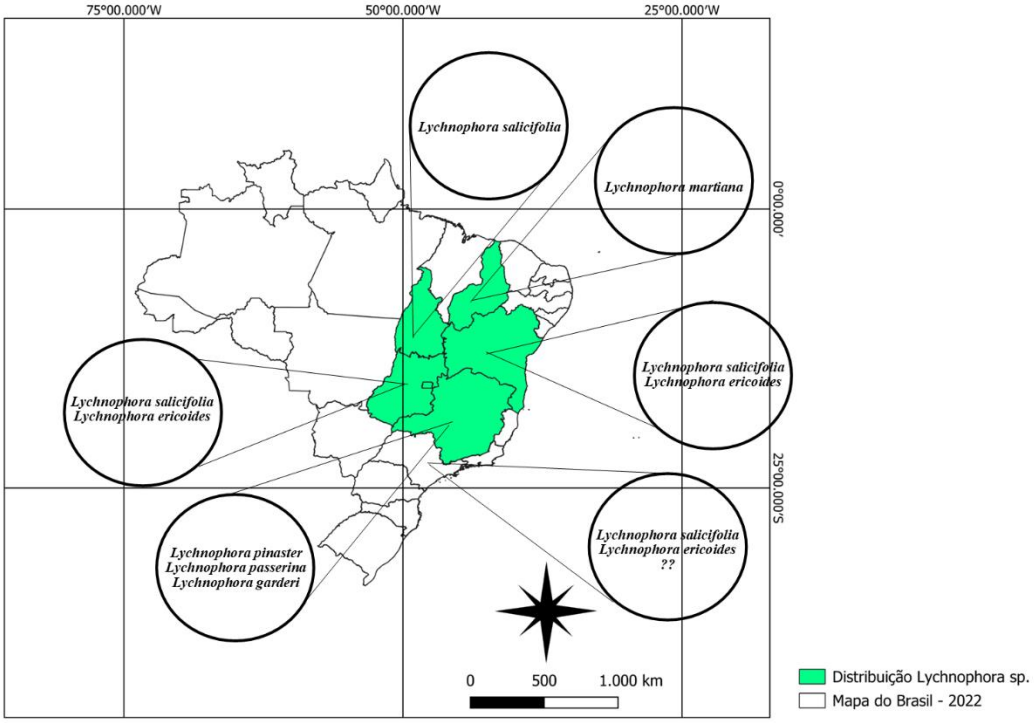



**Figura 1.** Distribuição do gênero *Lychnophora* Mart. pelo território brasileiro.

As espécies de *Lychnophora* apresentam hábito variando desde arvoretas a arbustos ou subarbustos candelabriformes ou subdicotômicos, com ramos cilíndricos, cobertos por indumento variado podendo ser velutinos, pubérulos, tomentosos, vilosos ou lanosos. As folhas são imbricadas e ascendentes no ápice, alternas ou raramente opostas. As inflorescências seguem um padrão básico e são consideradas como glomérulos simples, o fruto é uma cipsela que pode ser glabra, glandulosa ou costada (SEMIR *et al*., 2011).

### 1.1. Principais espécies de *Lychnophora* utilizadas na medicina popular

No Brasil as espécies do gênero são conhecidas como “arnica brasileira”, “arnicão brasileiro” ou “arnica da serra” e são geralmente utilizadas no tratamento de dores, inflamações, feridas e reumatismos (SAÚDE *et al*., 1998; BERNARDES *et al*., 2021). Atualmente no Brasil,

pelo menos 10 espécies de *Lychnophora* são reconhecidas por serem utilizadas na medicina popular, principalmente por apresentarem características morfológicas semelhantes entre si, estando dentre estas, *Lychnophora ericoides* Mart., *Lychnophora granmogolensis* (Duarte) Semir., *Lychnophora passerina* (Mart. ex DC.) Gardner, *L. pinaster* e *Lychnophora salicifolia* Mart. (SEMIR, 1991; CHAVES *et al*., 2015; BERNARDES *et al*., 2021) (Figura 2).

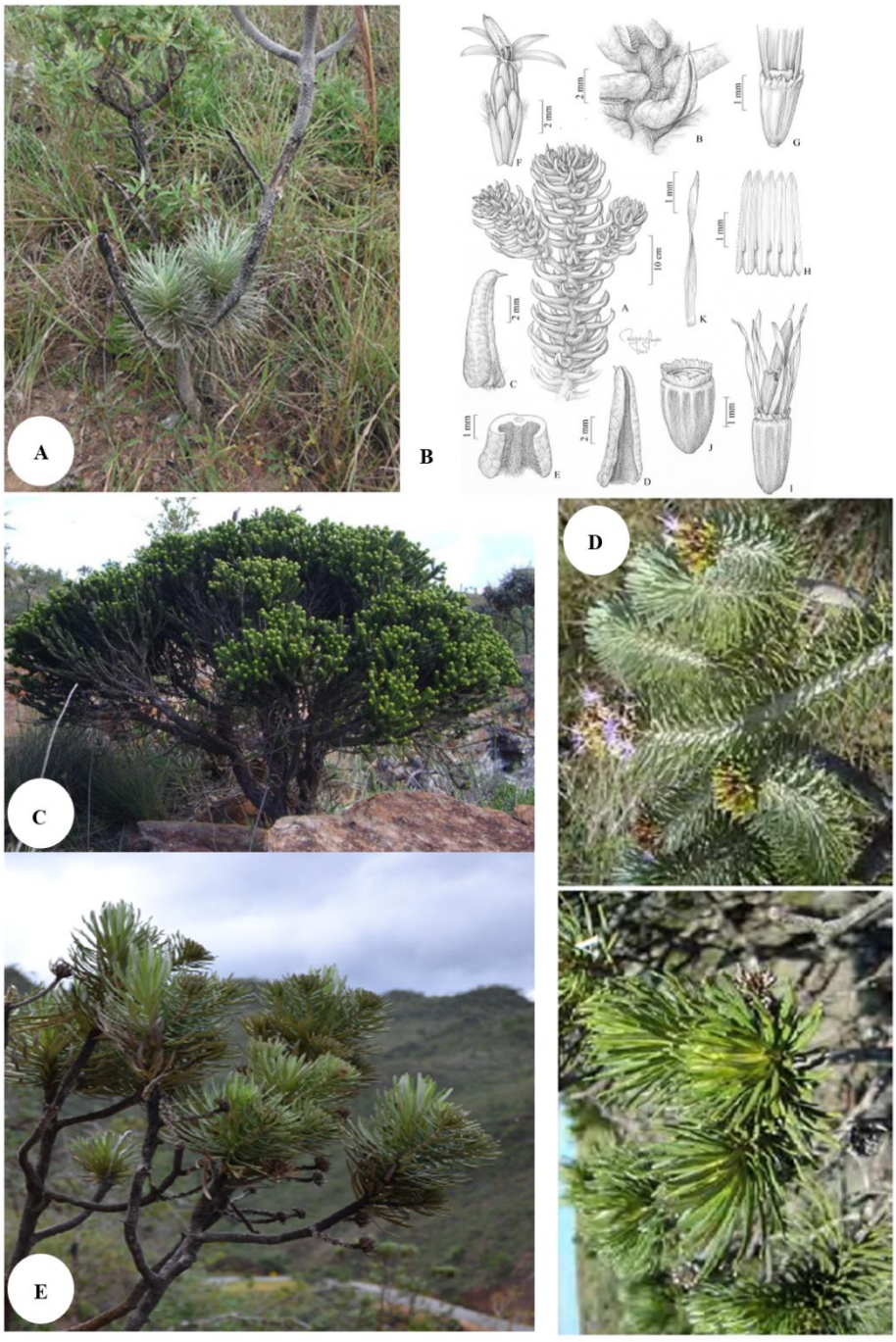



**Figura 2.** Espécies de *Lychnophora* utilizadas na medicina popular. **A.** *L. ericoides*, **B.** *L. granmogolensis*, **C.** *L. passerina*, **D.** *L. pinaster* e **E.** *L. salicifolia*. Imagens extraídas. **A.** Ribeiro-Silva *et al*. (2017), **B.** Semir *et al*. (2014), **C.** Oliveira (2010), **D.** Silva (2016) e **E.** Gouvea (2013).

Na medicina popular do Brasil, as espécies de *Lychnophora* mais utilizadas, são *L. ericoides* e *L. pinaster* Mart. devido a semelhanças morfológicas e químicas destas duas espécies com *Arnica montana* L. espécie europeia de arnica que já tinha o seu potencial medicinal reconhecido na Europa (CERQUEIRA *et al*., 1987; CHAVES *et al*., 2015; BERNARDES *et al*., 2021).

As espécies de *Lychnophora* ocorrem de forma restrita em Campos rupestres, e em bioregiões adjacentes ao Cerrado e Caatinga (SEMIR *et al*., 1991; ROBINSON, 1999; GOUVEIA, 2010; SEMIR *et al*., 2011; COLLI-SILVA *et al*., 2019). Algumas espécies de *Lychnophora* apresentam em sua distribuição um microendemismo muito pronunciado principalmente no estado de Minas Gerais (SEMIR *et al*., 2011).

Devido a sua importância na medicina popular, espécies de *Lychnophora* tem sido exploradas sem um manejo específico para a sua conservação, isso tem causado forte pressão extrativista sobre populações de espécies microendêmicas no estado de Minas Gerais onde muitas espécies do gênero, foram incluídas na lista de espécies da flora nacional ameaçadas de extinção classificadas dentro das categorias: vulneráveis, em perigo, criticamente em perigo e provavelmente extintas (MENDONÇA, LINS, 2000; SILVA, 2016).

Após ser estabelecido por Martius em (1822), o gênero *Lychnophora* passou por diversas adições, recolocações ou combinações de espécies propostas por diversos estudiosos do gênero (SEMIR *et al*., 2011). Algumas revisões para suas espécies foram realizadas por Schultz-Bipontinus (1863), Baker (1873), Coile & Jones (1981), Semir (1991) e Robinson (1999).

Atualmente, poucos estudos foram realizados caracterizando morfologicamente os táxons representantes de *Lychnophora* em Semir (1991) é onde pode-se melhor encontrar uma caracterização morfológica para espécies do gênero, sendo esta complementada em Semir *et al*. (2011), que destacaram a importância do estudo dos caracteres vegetativos e reprodutivos a nível específico para o gênero (SEMIR *et al*., 2011), levantando-se assim, a hipótese de que grupos de características morfológicos e anatômicas específicas podem auxiliar na identificação correta dos táxons do gênero, sendo necessário neste sentido, a realização de novos estudos que possam melhor caracterizar morfologicamente os representantes de *Lychnophora*.

Alguns estudos mais recentes vêm abordando não somente a importância de alguns táxons do gênero na medicina popular, mas também destacando características fitoquímicas de espécies como *L. ericoides*, *L. pinaster* e *Lychnophora salicifolia* Mart. (GOUVEIA, 2010; SILVA, 2016; MARQUES *et al*., 2020; PAVARINI *et al*., 2020).

Devido a relatos de seu uso medicinal, muitas espécies de *Lychnophora* foram estudadas quanto a atividade biológica de compostos químicos presentes em seus representantes (SEMIR

*et al*., 2011). Neste contexto, *L. pinaster* tem sido bastante estudada principalmente na caracterização de sua composição química e perfil metabólico (SILVA, 2016), com destaque para as importantes atividades biológicas desempenhadas por algumas substâncias presentes em estratos desta espécie (SILVEIRA *et al*., 2005a; ABREU *et al*., 2011; ANTONISAMY *et al*., 2011; ABREU *et al*., 2013; SILVA, 2016).

A grande maioria dos estudos tratando de *Lychnophora*, versam basicamente sobre aspectos relacionados a composição química de algumas de suas espécies de diferentes populações com destaque para Gouvea (2010) em seu estudo sobre a variação populacional dos metabolismos secundários do "arnicão brasileiro" (*L. salicifolia*) e Gouvea *et al*. (2012) destacando um método de HPLC-DAD-MS/MS na determinação de compostos principais no extrato bruto de *L. salicifolia*, ou estudos realizados por Chicaro *et al*. (2004) com *L. passerina*, Santos *et al*. (2005) com *L. ericoides*, Bernardes *et al*. (2019) com *Lychnophora* ssp..

Outros estudos como os realizados por Marques *et al*. (2020) com *L. pinaster*, Pavarini *et al*. (2020) estudando *L. ericoides* e mais recentemente, Bernardes *et al*. (2021) tratando de lactonas sesquiterpênicas em espécies de *Lychnophora*, ressaltaram principalmente as possibilidades e potenciais aplicabilidades de compostos presentes nestas espécies em possíveis tratamentos de diversas inflamações, sugerido hipoteticamente que os compostos químicos presentes em espécies de *Lychnophora* apresentam uma diversidade de atividades biológicas com grande eficiência, refletindo assim, a importância da realização de mais estudos que investiguem os compostos químicos presentes nos táxons desse gênero.

## 2. Aspectos Morfológicos e Anatômicos de *Lychnophora pinaster* Mart.

*Lychnophora pinaster* Mart. é uma espécie endêmica do estado de Minas Gerais pertencente a família Asteraceae, tribo Vernonieae e subtribo Lychnophorinae. A espécies apresenta microendemismo em algumas áreas inseridas dentro da Serra do Espinhaço, distribuída por 3 mesorregiões, onde ainda se encontram poucas populações remanescentes (Figura 3). Os indivíduos de *L. pinaster* se apresentam na forma de subarbustos eretos ramificados, pequenos arbustos ericoides e, mais raramente, como arbustos mais altos, variando entre 0,4m a 2,4m, podendo atingir até 3,6 m raramente (SEMIR, 1991; SEMIR *et al*., 2011).

Suas folhas podem se apresentar muito imbricadas e ascendentes na parte superior dos ramos e mais patentes até pouco reflexas nas partes inferiores, variando nas formas linear, linear oblonga, rosmarinióide e ericóide, sendo ocasionalmente longa e linear em forma de fita. A base foliar vai de arredondada a auriculada, ligeiramente atenuada, de ápice obtuso a pouco arredondado ou raramente pouco agudo, margem revoluta, venação broquidódroma, face

adaxial intensamente tomentosa canescente, nervura principal subvilosa quando jovem, subglabrescente permanecendo pouco pubérula até totalmente glabra quando velha (SEMIR, 1991).

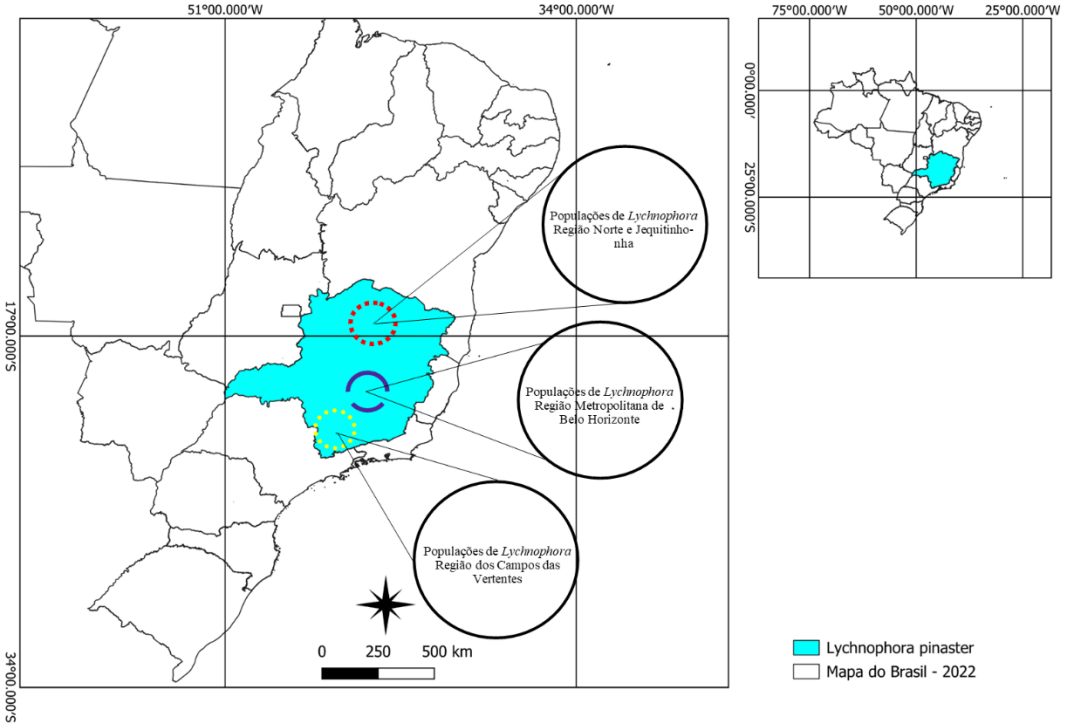



**Figura 3.** Distribuição de populações de *L. pinaster* em 3 mesorregiões do estado de Minas Gerais.

As folhas de *L. pinaster* podem apresentar textura que varia de muito rugosa e bulada, sendo às vezes quase lisa sua nervura principal é alargada e vai afinando da base para o ápice, a face abaxial é tomentosa, com tricomas subvilosos e tomentosos cobrindo todas as nervuras, com a principal subquadrática, que é não alada e sulcada (SEMIR, 1991; SEMIR *et al*., 2011; MARQUES, 2020).

Quanto aos aspectos reprodutivos de *L. pinaster*, a espécie apresenta inflorescências do tipo glomérulos simples folhosos, típica para o gênero *Lychnophora* (SEMIR, 1991), glomérulos com capítulos campanulados portando de 3 a 5 flores com coloração lilás a purpúrea (SEMIR *et al*., 2011).

O fruto é do tipo cípsela obcônica, oval cilíndrica, glabra ou glandulosa, olivácea a castanha as vezes com manchas atropurpúreas e com dispersão acondicionada às características sazonais em função de mudanças climáticas, sendo seu período de floração, entre os meses de agosto e outubro, com dispersão dos frutos nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro (SILVA, 1998; SEMIR *et al*., 2011; MARQUES, 2020).

*L. pinaster* tem sido utilizada como planta medicinal por populações que vivem em diversas comunidades localizadas nos entornos da Serra Geral (Serra do Espinhaço) no estado de Minas Gerais onde esta espécie apresenta microendemismo. A planta fornece ramos, folhas e inflorescências que são utilizadas na medicina popular tradicional principalmente como agentes anti-inflamatório e cicatrizantes, analgésicos, contra pancadas e contusões, hematomas e até mesmo contra picadas de insetos (RODRIGUES, CARVALHO, 2001; HABER *et al*., 2009; SEMIR *et al*., 2011; SILVA, 2016).

Devido a sua importância na medicina popular tradicional local, o extrativismo indiscriminado desta espécie unido a fatores como queimadas e desmatamento progressivo do Cerrado nas áreas de sua ocorrência, tem refletido em populações de *L. pinaster* apresentando um reduzido número de indivíduos o que confere à espécie, o *status* de ameaçada de extinção na Lista de Espécies Ameaçadas do Estado de Minas Gerais (COPOM, 1997; MENDONÇA, LINS, 2000; SILVA, 2016; MARQUES, 2020).

Com relação às características anatômicas das folhas de *L. pinaster*, estas apresentam caracteres xeromórficos como: cutícula grossa, folhas hipoestomáticas, e alta concentração de tricomas tectores, estando estes, presentes tanto em folhas jovens quanto nas folhas adultas. Os tricomas tectores podem ser ramificados, podendo ser encontrados em ambas as faces foliares apresentando distribuição aleatória sobre a superfície foliar. A sua epiderme é uniestratificada, com mesofilo compactado dorsiventralmente e feixes vasculares colaterais, na face adaxial a epiderme apresenta células volumosas e quadrangulares cobertas por uma cutícula espessa, na face abaxial, as células da epiderme são achatadas e menos volumosas com cutícula delgada (ISOBE, 2012).

Quanto aos tricomas glandulares presentes nas folhas de *L. pinaster*, estes são bisseriados, compostos por 10 células, sendo duas basais, seis no pedúnculo e duas formando a cabeça secretora com cutícula delgada. Dependendo do estádio de desenvolvimento da folha, os tricomas glandulares apresentam em seus diferentes estádios, variações em sua função secretora. Em folhas jovens, na face adaxial, estes tricomas apresentam-se totalmente desenvolvidos, ativos em secreção e com cutícula distendida, na face abaxial estes são menores e aparentam estarem em fase inicial do desenvolvimento. Nas folhas adultas, os tricomas glandulares presentes na face abaxial exibem atividade secretora, sendo que estes na face adaxial, apresentam cutícula rompida, o que indica o fim da atividade secretora (ISOBE, 2012).

Isobe (2012), desenvolveu um estudo até então mais bem detalhado sobre aspectos anatômicos de *L. pinaster*, destacando os caracteres de folhas com desenvolvimento completo, folhas jovens e os tipos de indumento encontrados na superfície foliar desta espécie.

Aspectos anatômicos/histológicos como os tipos de tricomas, sua presença ou ausência bem como suas formas e tamanhos, a ocorrência, a posição e organização das células epidérmicas, nervuras e suas orientações, os tipos de estômatos e diversas outras características da anatomia foliar, são importantes na identificação e separação de espécies no geral (SILVA *et al.*, 2005; ISOBE, 2012).

Estes aspectos e características anatômicas são particulares, especialmente em *L. pinaster* que tem como espécie similar *L. ericoides*, as duas espécies compartilham características morfológicas que se sobrepõem o que torna a separação das mesmas, uma tarefa difícil (SEMIR, 1991; SEMIR *et al.*, 2011). Analisando algumas características da anatomia foliar de *L. ericoides* e *L. pinaster*, Athayde *et al*. (2019), apresentaram uma série de fatores anatômicos que distinguem de forma clara estas duas espécies. Apesar de *L. pinaster* e *L. ericoides* apresentarem semelhanças quanto ao contorno da nervura média e a conformação do sistema vascular, as duas espécies se diferenciam pela presença de esclereides distribuídas por todo parênquima da nervura média em *L. ericoides*, estando estas, ausentes em *L. pinaster* (ATHAYDE *et al.*, 2019).

Em termos de separação entre as espécies *L. pinaster* e *L. ericoides*, a forma da folha é distinta para as duas espécies, podendo ser observadas dimensões maiores e margens menos flexionadas para a face abaxial em *L. ericoides*, sendo que em *L. pinaster* as folhas apresentam dimensões menores com margem muito revolutas (SEMIR *et al.*, 2011; ATHAYDE *et al.*, 2019). Lusa *et al.* (2018) estudando a evolução da diversidade estrutural de caules e folhas de diversos representantes da subtribo Lychnophorinae, destacaram as diversas características anatômicas das folhas de representantes do clado *Lychnophora sensu stricto*, observando que para a maioria das espécies deste clado, observa-se a presença de criptas na face abaxial das folhas sendo que estas criptas, não são observadas em *L. pinaster* (LUSA *et al.*, 2018).

O padrão de folha em relação a distribuição dos estômatos em *L. pinaster* é considerado como hipoestomática (SEMIR, 1991; LUQUE *et al.*, 1999; ISOBE, 2012; ATHAYDE *et al.*, 2019). Os estômatos presentes na face abaxial das folhas de *L. pinaster* são projetados acima das demais células epidérmicas (ISOBE, 2012), diferente do observado em outras espécies do gênero, como em *L. ericoides* onde os estômatos são observados no interior de criptas na face abaxial das folhas (ATHAYDE *et al.*, 2019).

Tanto as características morfológicas quanto as características anatômicas podem apresentar importantes marcadores que auxiliam no estudo dos diversos táxons. Em *L. pinaster* estas características refletem o comportamento dos diversos indivíduos desta espécie distribuídos em populações ocorrentes em áreas de campos rupestres em Minas Gerais, os caracteres xeromórficos até então descritos para *L. pinaster* (SEMIR, 1991; LUQUE *et al.*,

1999; ISOBE, 2012; ATHAYDE *et al.,* 2018), devem futuramente auxiliar na caracterização dos representantes de *L. pinaster* de diversas populações distribuídas nas regiões Norte, metropolitana de Belo Horizonte e Campos das Vertentes do estado de Minas Gerais.

## 3. Aspectos Fitoquímicos de *Lychnophora pinaster* Mart.

Muitas plantas do Cerrado têm sido utilizadas historicamente pelos povos que habitam as regiões cobertas por este bioma. No Brasil, o Cerrado cobre uma área aproximada de 2 milhões de $Km^2$, apresentando uma rica diversidade de espécies com importância cultural, econômica e medicinal, sendo um *hotspot* mundial com biodiversidade excepcional, possuindo diversas espécies endêmicas ameaçadas de extinção, merecendo assim, atenção prioritária para programas e projetos de conservação (MELO Jr *et al*., 2012; STRASSBURG *et al*., 2017; MARQUES, 2020).

Dentre algumas espécies ameaçadas ou vulnerável à extinção ocorrente nos campos rupestres e Cerrado no estado de Minas Gerais, encontra-se *Lychnophora pinaster* espécie endêmica desta fitofisionomia, sendo esta, muito utilizada na medicina popular de forma insustentável, sofrendo extinção de diversas populações naturais ao longo do tempo e atualmente, apresentando populações remanescentes reduzidas, o que torna a espécie, vulnerável a extinção (COPAN, 1997; SEMIR *et al*., 2011; SILVA, 2016).

*Lychnophora pinaster* é uma planta medicinal intensamente utilizada como agente anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante, aplicados contra pancadas, torções, contusões, hematomas ou picadas de insetos (HABER *et al*., 2009; MARQUES, 2020), o que justifica a existência de estudos que comprovem o seu uso medicinal tradicional e possível potencial como agente quimioprofilático (FERRAZ-FILHA *et al*., 2012; ABREU *et al*., 2013; MARQUES, 2020).

Nos últimos anos, alguns estudos têm abordado algumas características do perfil químico da espécie *L. pinaster*, principalmente relacionado aos óleos essenciais de diversos indivíduos pertencentes às populações desta espécie nas Regiões Sul (Campos das Vertentes), Sudeste (Região Metropolitana de Belo Horizonte) e Norte (Diamantina, Grão Mogol e Olhos D'Água) do estado de Minas Gerais (SEMIR, 1991; SEMIR et al., 2011).

Neste contexto, Haber (2008) mapeando os perfis químicos dos óleos essenciais de quatro populações de *L. pinaster* ocorrentes no sul de Minas Gerais, Isobe (2012) e Silva (2013), avaliando a influência da sazonalidade na composição química dos óleos essenciais de populações naturais de *L. pinaster* ocorrentes nos municípios de Lavras, Itumirim, Carrancas e Ingaí no sul do estado de Minas Gerais e Silva (2016), analisando os óleos essenciais de três

populações, duas em Carrancas no sul de Minas Gerais e uma em Itabirito no sudeste do estado, relataram a presença de algumas substâncias componentes do óleo essencial em *L. pinaster*.

Nos estudos conduzidos por Haber (2008), foram encontradas como substâncias majoritárias componentes dos óleos essenciais de populações naturais de *L. pinaster* o (*E*)-cinamato de metila para as populações Poço Bonito, Estrada Real e Estrada Real I (entre 61% e 82% do óleo essencial nestas populações) e o cedr-8(15)-en-9-α-ol cerca de 25,2% do óleo essencial para a população Antena (MARQUES, 2020).

Conduzindo novo estudo com os mesmos genótipos das populações naturais por meio de propagação vegetativa, indivíduos foram cultivados em Botucatu-SP, onde Haber (2008), avaliou os óleos essenciais dessas populações em três estações do ano (inverno, verão e outono), obtendo o seguinte resultado (a composição química das três populações Poço Bonito, Estrada Real e Estrada Real I, se mantiveram com o (*E*)-cinamato de metila como sendo a substância majoritária componente do óleo essencial destas populações cultivadas de *L. pinaster*) (HABER, 2008).

No mesmo estudo foi observado uma significativa mudança na composição química do óleo essencial dos indivíduos da população Antena, onde na população natural, o cedr-8(15)-en-9-α-ol era a substância majoritária, sendo observado para a população cultivada, a presença da substância (*E*)-cinamato de metila como substância majoritária (MARQUES, 2020).

Tanto nos estudos conduzidos por Isobe (2012), quanto nos estudos desenvolvidos por Silva (2013), as substâncias majoritárias presentes nos óleos essências das quatro populações de *L. pinater* (Lavras, Itumirim, Carrancas e Ingaí), foram o (*E*)-cinamato de metila com variação entre 57% e 80%, e o (*E*)-cariofileno variando entre 3% e 18% independente do período do ano, sendo observado que, os óleos essenciais dos indivíduos apresentaram divergência na composição química entre e dentro das populações (MARQUES, 2020).

Silva (2016), ao analisar os óleos essenciais de três populações de *L. pinaster*, duas (em Carrancas Sul do estado de Minas Gerais) e uma (em Itabirito no sudeste de Minas Gerais), encontrou resultado similar aos resultados obtidos por Isobe (2012) e Silva (2013), onde o (*E*)-cinamato de metila foi a substância majoritária presente nos óleos essenciais das duas populações analisadas (em Carrancas), estando esta substância, ausente na população de Itabirito (no sudeste do estado de Minas Gerais), ocorrendo nesta população a predominância de sesquiterpenos (SILVA, 2013; MARQUES, 2020).

Em estudos recentes, Marques (2020), avaliou a composição química dos óleos essenciais de seis populações de *L. pinaster* ocorrentes nas Regiões Norte e Metropolitana de Belo Horizonte no estado de Minas Gerais, sendo que a composição química dos óleos essenciais apresentaram divergência em função das populações, para as populações ocorrentes

na Região Norte, as substâncias majoritárias componentes dos óleos essenciais de *L. pinaster*, foram o α-pineno (cerca de 12%) para a população de Grão Mogol (GM), o 14-acetoxi-α-humuleno (cerca de 21,9%) para a população de Diamantina (DIMa), o 14-hidroxi-4,5-dehidro-cariofileno e esquamulosona (cerca de 9,13% e 8,30% respectivamente) para a população de Olhos D'Água (OD) (MARQUES, 2020; PORTELLA, 2021).

Para as populações ocorrentes na Região Metropolitana de Belo Horizonte, Marques (2020), obteve como resultados, a ocorrência das substâncias majoritária como componentes dos óleos essenciais de *L. pinaster*, o 1,7-diepi-α-cedrenal (6,46%) e (*Z*)-nerolidol (12,60%) na população Caeté/Rio Acima (CTRA), para Serra da Moeda, dois sesquiterpenos (1 e 7), sendo este último, componente exclusivo desta população, e para a população de Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC), o 14-acetoxi-α-humuleno (cerca de 53,33%) (MARQUES, 2020).

Em estudo recente, Portella (2021), avaliou a influência da altitude na diversidade da composição química dos óleos essenciais de oito populações de *L. pinaster* ocorrentes em duas regiões de Minas Gerais (Região Norte e Região Metropolitana de Belo Horizonte), onde foi observado que em função da altitude, as populações avaliadas apresentaram uma elevada diversidade química. O autor, destaca que os compostos majoritários dos óleos essenciais das populações de *L. pinaster* para as duas regiões foram: o 14-hidroxi-α-humuleno para Grão Mogol (GM) e Diamantina (DI), cedr-8(15)-en-9-α-ol para Olhos D'Água (OD) e Diamantina (DI), o 14-acetoxi-α-humuleno para a Serra do Rola Moça (SRM) e o 4-*oxo*-15-nor-eudesman-11-eno para a Serra da Moeda (SM) (PORTELLA, 2021).

Todos os estudos conduzidos até então tratando sobre a composição química dos óleos essenciais de indivíduos de diferentes populações de *L. pinaster* ocorrentes nas Regiões Norte, Metropolitana de Belo Horizonte e em Campo das Vertentes (Sul) do estado de Minas Gerais, tem apontado para uma significativa divergência na composição química majoritária dos óleos essenciais das diferentes populações de *L. pinaster* (HABER, 2009; REIS *et al*., 2010; ISOBE, 2012; SILVA, 2013; RESENDE, 2013; MARQUES, 2020; PORTELLA, 2021).

Diante das pesquisas realizadas anteriormente, as evidências apontam para uma composição química dos óleos essenciais de populações de *L. pinaster*, onde dois perfis químicos despontam como possíveis variáveis entre as populações e as regiões onde estas se localizam, nos estudos desenvolvidos com populações de *L. pinaster* ocorrentes na região de Campo das Vertentes em Minas Gerais (HABER, 2009; REIS *et al*., 2010; ISOBE, 2012; SILVA, 2013; RESENDE, 2013), ficou clara a predominância e abundância de compostos da classe dos fenilpropanóides como componentes majoritários dos óleos essenciais das populações de *L. pinaster* desta região, tendo o *trans*-cinamato de metila e o *trans* -cariofileno, como substâncias dominantes na composição dos óleos essenciais (MARQUES, 2020).

Para as populações de *L. pinaster* ocorrentes nas regiões Norte de Minas Gerais e região Metropolitana de Belo Horizonte, observou-se uma variedade de compostos pertencentes à classe dos sesquiterpenos, onde os estudos realizados por Marques (2020) e Portella (2021), utilizando indivíduos de populações ocorrentes nestas duas regiões de Minas Gerais, apontaram para uma variada composição química dos óleos essenciais das populações destas regiões.

No estudo realizado por Marques (2020), as substâncias majoritárias componentes dos óleos essenciais de *L. pinaster* para as populações ocorrentes na Região Norte foram o α-pineno, o 14-acetoxi-α-humuleno, o 14-hidroxi-4,5-dehidro-cariofileno e esquamulosona, e para as populações da Região Metropolitana de Belo Horizonte, o 1,7-diepi-α-cedrenal e (*Z*)-nerolidol, dois sesquiterpenos (1 e 7), e o 14-acetoxi-α-humuleno.

Para as populações das mesmas regiões de Minas Gerais, Portella (2021) relatou a ocorrência do 14-hidroxi-α-humuleno e o cedr-8(15)-en-9-α-ol, o 14-acetoxi-α-humuleno e o 4-*oxo*-15-nor-eudesman-11-eno (MARQUES, 2020; PORTELLA, 2021).

Os aspectos químicos de *L. pinaster* tem despertado cada vez mais o interesse no campo da pesquisa envolvendo a área farmacêutica e industrial (LEITE *et al*., 2007; SILVA *et al*., 2012; PINHEIRO *et al*., 2015; SILVA, 2016; MARQUES, 2020). Com a confirmação da grande variedade e divergência na composição química das populações de *L. pinaster* estudadas até então (MARQUES, 2020; PORTELLA, 2021), investigações buscam testar e comprovar, as interações e eficácia das diversas substâncias componentes dos óleos essenciais desta espécie endêmica em determinadas situações, buscando futuramente, viabilizar a sua aplicabilidade para fins terapêuticos como anti-inflamatórios e antimicrobianos, ou industriais na produção de cosméticos, produtos de limpeza, produtos para higiene pessoal, ou na indústria alimentícia (FERREIRA, 2010; SILVA, 2016; MARQUES, 2020).

## 4. Atividade Biológica de *Lychnophora pinaster* Mart.

Historicamente diversas espécies do gênero *Lychnophora* (Arnica brasileira) são utilizadas na medicina popular tradicional por povos que vivem nos entornos dos campos rupestres no Cerrado brasileiro. No Brasil, as espécies *L. ericoides* e *L. pinaster* são as espécies de *Lychnophora* mais utilizadas no tratamento de dores, inflamações, feridas e reumatismos devido a semelhanças destas espécies com a espécie europeia (*Arnica montana* L.) que tem potencial medicinal reconhecido na Europa (CERQUEIRA *et al*., 1987; SEMIR *et al*., 2011; CHAVES *et al*., 2015; BERNARDES *et al*., 2021).

Pelo seu conhecido potencial medicinal, a espécie *L. pinaster* tem sido alvo de vários estudos e pesquisas que buscam testar a eficácia dos diversos extratos de indivíduos de populações ocorrentes na Serra do Espinhaço em Minas Gerais (SEMIR *et al*., 2011).

Devido a uma grande variabilidade em sua composição química, *L. pinaster* apresenta diversos compostos químicos com ação biológica. Em muitos bioensaios realizados com extratos das partes aéreas de *L. pinaster*, ficou comprovada a sua ação tripanocida eficaz contra cepas Y tripomastigotas de *Triponosoma crizi* (CHIARI *et al*., 1996; SILVA, 2016). Em estudos anteriores, foi constatada a ação tripanocida da substância 15-deoxi-goiasensolido uma lactona sesquiterpênica (CHIARI *et al*., 1991; DUARTE *et al*., 1993).

A eliminação de até 100% de cepas Y de *T. cruzi*, também foi observada em experimentos onde foram utilizados extratos aquosos liofilizados de partes aéreas de *L. pinaster*, sendo identificados os compostos fenólicos, ácido caféico, ácido isoclorogênico, vitexina, isovitexina e quercetina (SILVEIRA *et al*., 2005a; SILVA, 2016). Em extratos hexânicos das partes aéreas de *L. pinaster*, foi identificada pela primeira vez, um composto relacionado ao cariofileno, o ácido lychnophoico, mais tarde reclassificado como ácido E-lychnofórico, também testado contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* com 100% de eficácia (OLIVEIRA *et al*., 1996; ALCÂNTARA *et al*., 2005; SILVEIRA *et al*., 2005b).

Outros extratos de *L. pinaster*, como o extrato hexânico/diclorometânico obtido de suas folhas, de onde foi isolada a α-amirina um triterpeno pentaciclico, que juntamente com extratos apolares de folhas e caules da espécie, apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (ABREU *et al*., 2011; SILVA, 2016).

Os extratos de partes aéreas de *L. pinaster* ainda foram testados tendo comprovadas as suas ações anti-inflamatória e antinociceptiva (GUZZO *et al*., 2008). A ação anti-inflamatória dos extratos e compostos isolados de *L. pinaster* foram investigadas por meio de aplicações transdermal via fonoforese em patas de ratos com significativa degeneração das fibras musculares, onde após 72h da aplicação, o extrato hexânico exerceu moderada ação anti-inflamatória, sendo que o extrato aquoso diminuiu o processo inflamatório drasticamente no mesmo período, isso comparado ao tratamento com a dexametasona, uma droga anti-inflamatória potente (GUZZO *et al*., 1996; CUPOLILO *et al*., 2007; ABREU *et al*., 2013).

Em outros ensaios com o mesmo intuito de testar a atividade anti-inflamatória de extratos da espécie, compostos como o flavonóide quercitina, o triterpeno lupeol, a mistura entre α-amirina e lupeol, a mistura entre os esteróides estigmasterol e sitosterol, isolados dos extratos hexânico de *L. pinaster*, foram testados, justificando assim, o uso medicinal tradicional da espécie (SILVA, 2016).

Em estudo conduzido por Ferreira (2010), onde foi avaliada a sua atividade anti-inflamatória e analgésica a partir de extratos da espécie coletada em áreas de campos rupestres em Nova Lima (Minas Gerais), foi evidenciada a presença de fenilpropanóides, terpenóides, flovonóides, antraquinonas e saponinas, sendo que neste mesmo estudo, os resultados obtidos

por meio de testes farmacológicos em camundongos, apontaram para um efeito anti-inflamatório e sedação sem prejuízo motor, sugerindo que, com mais estudos, os extratos de *L. pinaster* podem ser alternativos para insumos na produção de medicamentos (MARQUES, 2020).

Ainda, investigando a atividade anti-inflamatória dos extratos de *L. pinaster*, Pinheiro (2010), evidenciou atividade anti-inflamatória a partir de preparados de emulgel com 2% e 5% de extrato de *L. pinaster*, sendo esta atividade anti-inflamatória, superior se comparado ao medicamento Cataflam, sugerindo que a formulação de 2% de concentração, poderia vir a ser pelo seu baixo custo e eficiência, produzida em escala industrial (MARQUES, 2020).

Outros compostos relacionados a *L. pinaster*, foram estudados por Bernardes *et al*. (2019) e Bernardes *et al*. (2021) em pesquisas que tentaram demonstrar os efeitos das lactonas sesquiterpênicas sobre as inflamações causadas pela artrite (BERNARDES *et al*., 2021).

Em seu primeiro estudo, Bernardes *et al*. (2019), observaram que todas as lactonas sesquiterpênicas avaliadas, isoladas de extratos Etanólico e Clorofórmico de *Lychnophora trichocarpa* Spreng, (Sinônimo para *L. pinaster*) e de *Lychnophora passerina* (Mart. Ex DC.) Gardner, apresentaram atividade anti-hiperuricêmica em doses de 5 e 10 mg/kg, as substâncias Goiazensolida e Licnofolida nas doses de 10 mg/kg e Eremantolido C nas doses de 5 e 10 mg/kg, apresentaram uma inibição notável da atividade oxidante da xantina hepática e efeito uricosúrico, sendo possíveis agentes futuros no tratamento da hiperuricemia e gota (BERNARDES *et al*., 2019).

Bernardes *et al*. (2021), ainda estudando os efeitos das lactonas sesquiterpênicas Licnofolida e Eremantolida C isoladas de *L. trichocarpa* (um sinônimo de *L. pinaster*), testaram os efeitos destes compostos sobre artrite induzida por cristais MSU em camundongos C57BL6, observando que, ambas as substâncias testadas exerceram efeito anti-inflamatório inibitório quanto a migração de neutrófilos e a produção de NTF-α, concluindo que esses compostos também apresentaram atividade antinociceptiva e antioxidante (BERNARDES *et al*., 2021).

Barros *et al*. (2021), também avaliaram os efeitos do extrato etanolico de *L. pinaster* na inflamação e dor causada pela gota aguda, destacando a ação dos seus principais componentes em artrite induzida em camundongos por injeção de cristais de MSU monossódico (MSU), concluindo que o extrato etanolico de *L. pinaster* e seus principais componentes químicos, inibiram a migração de neutrófilos, reduzindo as concentrações de IL-1β e TNF-α, apontando para um efeito sinérgico de terpenos, flavonoides e ácidos fenólicos presentes no extrato, o que poderia apoiar, o seu uso, no tratamento de gota, inflamações e dor (BARROS *et al*., 2021).

Os extratos etanolicos de *L. pinaster*, ainda foram testados por Ferreira *et al*. (2014). Neste foram avaliados a toxicidade e segurança do uso do extrato da espécie utilizando

camundongos suíços (machos e fêmeas), sendo a toxicidade aguda do extrato etanol bruto, avaliada a partir da administração do extrato via oral em doses únicas de 125, 250 e 500 mg/kg, avaliando-se os seus efeitos sobre a atividade locomotora espontânea, comportamento exploratório, força muscular, peso corporal, consumo de alimentos e água, peso relativo do órgão, histologia, parâmetros hematológicos e bioquímicos, sendo observado que, as três doses administradas não causaram danos ao tônus muscular (MARQUES, 2020).

Porém, nos testes realizados neste mesmo estudo, foi observado que para as doses de 250 e 500 mg/kg, ocorreu inibição significativa para a locomoção espontânea e o comportamento exploratório dos animais. Em testes de campo aberto, os autores, ainda observaram que, não houve alterações nos parâmetros hematológicos, consumo de água e alimentos, na variação de peso corporal e peso relativo dos órgãos. No entanto, foram observadas alterações nos parâmetros bioquímicos, e a avaliação histopatológica mostrou que ocorreu alterações celulares, como degeneração vacuolar, inflamação dos rins e fígado para todas as doses (FERREIRA *et al*., 2014).

As atividades anti-inflamatória e anti-hiperuricêmica dos extratos etanolicos de *L. pinaster* foram estudadas por Müller *et al*. (2019). Neste estudo foi avaliado os efeitos dos seus componentes químicos sobre a inflamação e a hiperuricemia tendo como resultados comprovados, a atividade anti-inflamatória e anti-hiperuricêmica exercida pelos ácidos *E*-lichnoforico, clorogenico, cinamico e cafeico, e pela rutina e lupeol compostos presentes nos extratos etanolicos, concluindo que os extratos etanolicos de *L. pinaster* e seus componentes químicos, podem ser promissores agentes na terapia contra inflamações, hiperuricemia e gota (MÜLLER *et al.*, 2019).

*Lychnophora pinaster* apresenta grande polimorfismo distribuído pelas populações dessa espécie ao longa da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais (SEMIR *et al*., 2011). Muitos estudos têm abordado aspectos da composição química e as possíveis atividades biológicas de extratos e óleos essenciais de diversos representantes da espécie nas diferentes regiões do estado (Minas Gerais), onde alguns autores tem utilizado de forma equivocada o sinônimo de *L. pinaster* (*L. trichocarpa*) um nome legítimo, mas incorreto para se referir à espécie aceita atualmente.

Nos estudos desenvolvidos por Souza *et al.* (2012); Ferrari *et al.* (2013); Bernardes *et al.* (2019); Caldeira *et al.* (2019); Caldeira *et al.* (2021) e Bernardes *et al.* (2021), todos se referindo as atividades anti-inflamatórias de compostos presentes no sinônimo de *L. pinaster* (*L. trichocarpa*), estes autores vem considerando *L. trichocarpa* como uma espécie válida de forma incorreta. Isso reflete uma das grandes dificuldades na determinação correta de *L.*

*pinaster* em relação a sua diferenciação das espécies consideradas irmãs dentro do gênero *Lychnophora*.

A composição química dos indivíduos bem como os tipos e classes de compostos, suas possíveis atividades biológicas e potenciais aplicabilidades futuras na indústria farmacêutica, são importantes incrementos ao conhecimento sobre a importância de *L. pinaster*, suas características químicas aplicadas para a sua diferenciação de outras espécies do gênero *Lychnophora*, poderão futuramente, evitar novos equívocos quanto a utilização da espécie correta, quer seja em estudos científicos, ou até mesmo no seu uso medicinal tradicional. Um estudo que caracterize possíveis marcadores químicos que auxilie na identificação inequívoca de *L. pinaster* e suas populações, e evidencie suas similaridades e divergências químicas, ainda se faz necessário, uma vez que, o emprego de marcadores químicos com valor quimiotaxonômico vem sendo aplicado dentro da família Asteraceae como o uso de lactonas sesquiterpênicas e alcaloides (COSTA, 1999; TRIGO, 1999).

Notar a presença de substâncias químicas e as empregar como marcadores possíveis para a caracterização de espécies e populações, pode favorecer e acrescentar ainda mais conhecimentos sobre a taxonomia de diversos táxons. Algumas vezes, quase todos os membros de um mesmo grupo, compartilham um padrão químico (VALLADÃO, 2011). Em alguns casos, estas substâncias podem ser mais especificas como a colchicina em *Gloriosa superba* L. (MISRA *et al*., 2020) ou os triterpenos friedelina e β-friedelinol em espécies do gênero *Maytenus* Molina. (ALBERTON, 2002, VALLADÃO, 2011).

Para *L. pinaster* isso não seria diferente, suas diversas populações até então estudadas, aparentemente apresentam uma grande diversidade química quanto a composição dos óleos essenciais (MARQUES, 2020; PORTELLA, 2021). Assim, hipoteticamente grupos de substâncias químicas compartilhadas entre os indivíduos das populações de *L. pinaster* poderia ser aplicadas como marcadores quimiotaxonômicos para expressar relações taxonômicas entre as populações e entre os indivíduos destas populações distribuídas pelas regiões Norte, Metropolitana de Belo Horizonte e Campos das Vertentes (Sul) de Minas Gerais.

## 5. Estrutura populacional, diversidade genética e química de *Lychnophora pinaster* Mart.

Estudos tratando sobre características genéticas envolvendo *L. pinaster* são escassos. Pouco se sabe sobre os aspectos genéticos dos indivíduos que compõem populações nativas desta espécie, que em seu ambiente de ocorrência, sofre sérios riscos de extinção. De modo geral, até o presente momento foram realizados apenas cinco estudos que abordam representantes de *L. pinaster* e alguns de seus aspectos e relacionamentos genéticos com as suas características químicas dentro de populações da espécie ocorrentes em três regiões do estado

de Minas Gerais (HABER *et al.,* 2009; VIEIRA, 2012; SILVA, 2016; MARQUES, 2020; PORTELLA, 2021).

Os marcadores moleculares como ferramentas úteis para estudos genéticos, marcam uma nova era no campo investigativo da genômica. Estes marcadores baseados em DNA, são amplamente utilizados nos mais diversos campos como em fisiologia taxonômica, embriologia, engenharia genética e outros (MARQUES, 2020). Marcadores moleculares expressam diferenças a nível molecular seja para o DNA ou proteínas. Estes são tipicamente definidos como um segmento particular de DNA que representa diferenças nas análises genômicas (DHUTMAL *et al.*, 2018; MARQUES, 2020).

Com a caracterização e descrição da técnica de Reação de Polimerização em Cadeia – PCR (*Polymerase Chain Reaction*) por Kary Mullis na década de 80, surgiram diversos estudos com marcadores de DNA como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), CAPS (*Cleaved Amplified Polymophic Sequence*) ou PCR-RFLP, ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), SSR (*Simple Sequence Repeats*), STS (*Sequence Tagged Sites*), SSCP (*Singe-Strand Conformation Polymorphism*), PCR-sequencing dentre muitos outros, contribuindo de forma decisiva para os avanços nas áreas de pesquisa envolvendo aspectos genéticos (COUTINHO *et al.*, 2006; SILVA, 2016).

Para *L. pinaster* em específico, estudos envolvendo populações das regiões Norte, Sudeste (região metropolitana de Belo Horizonte) e Sul (Campos das Vertentes), foram desenvolvidos a partir de 2004 pelo grupo de pesquisadores do Instituto Agronômico – IAC com o objetivo de investigar a composição química e diversidade populacional de populações naturais desta espécie (SILVA, 2016).

Para tanto, o grupo de pesquisa iniciou as atividades desenvolvendo e caracterizando marcadores SSR para populações de *L. pinaster* ocorrentes no Sul do estado de Minas Gerais. Haber *et al*. (2009) apresentaram um primeiro estudo com o desenvolvimento e caracterização de 13 marcadores microssatélites polimórficos utilizados para analisar 37 indivíduos de *L. pinaster* distribuídos em duas populações nativas do sul de Minas Gerais gerando um total de 6,6 alelos por lócus polimórfico (HABER *et al.*, 2009; SILVA, 2016).

Populações de *L. pinaster* vem sofrendo intensa pressão antrópica, quer seja pelo extrativismo sem controle ou plano de manejo ou pela destruição das áreas de ocorrência de populações da espécie com a implementação de empreendimentos da indústria mineradora no estado de Minas Gerais. A utilização de marcadores moleculares pode auxiliar no entendimento do funcionamento e comportamento de espécies ameaçadas que se encontram em áreas com habitats fragmentados reunidas em pequenas populações isoladas, como populações de *L.*

*pinaster*. Neste contexto, estudos tratando sobre suas características genéticas podem representar papel fundamental na conservação e preservação desta, e de outras espécies (LEE *et al.*, 2018; MARQUES, 2020).

Com o intuito de propor futuramente o desenvolvimento de programas de conservação e planos de manejo e uso medicinal de *L. pinaster* distribuídas nas diversas populações da espécie já estudadas nas três regiões (Norte, Sudeste e Sul) de Minas Gerais, estudos como o desenvolvido por Vieira (2012) com a investigação da diversidade genética e composição química dos óleos essenciais de *Lychnophora ericoides* Mart. e *L. pinaster*, acrescentaram uma visão mais clara sobre a diversidade genética de duas populações de *L. pinaster* ocorrentes na região norte de Minas Gerais (Olhos D'Água e Diamantina).

Neste estudo, Vieira (2012) utilizando análise de marcadores microssatélites, verificou que as populações de *L. pinaster* distribuídas pela região norte de Minas Gerais apresentaram um valor médio de heterozigosidade observada ($H_O$) e esperada ($H_E$) de 0.222 e 0.307 respectivamente com uma variabilidade genética considerada baixa entre as populações com coeficiente de endogamia de ($F_{ST}$ = 0.014) se comparado a *L. ericoides* que apresentou um coeficiente de endogamia de ($F_{ST}$ = 0.370) maior entre as populações.

Progredindo nos estudos e análises da diversidade genética e química de populações de *L. pinaster*, Silva (2016) amplia o foco investigativo para a espécie caracterizando os padrões de diversidade genética e estrutura populacional de sete populações de *L. pinaster* das regiões sul e sudeste de Minas Gerais, onde treze lócus microssatélite anteriormente descritos por Haber *et al*. (2009) foram analisados.

Para este estudo, Silva (2016) utilizou a análise de oito lócus que apresentaram polimorfismo, tendo como resultados significativos, a análise dos oito lócus SSR com um total de 81 alelos gerados para 186 indivíduos estudados. Em seus resultados após análises de genética populacional, Silva (2016) encontrou uma média de 5.00±0.24 de alelos próxima a 5.82, média encontrada por Haber *et al.* (2009) para populações nativas do sul de Minas Gerais, observando ainda, a existência de endogamia expressa pela heterozigosidade média esperada ($H_E$ = 0.565) maior que a heterozigosidade média observado ($H_O$ = 0.425).

Partindo de pesquisas e investigações que visam principalmente criar condições que poderão futuramente subsidiar novas possibilidades de conhecimento sobre a genética de populações nativas, como é o caso das populações de *L. pinaster*, o objetivo é presar pela conservação e pelo manejo e utilização dos recursos genéticos vegetais. Neste caso, é necessário se observar aspectos fundamentais como o conhecimento sobre as bases moleculares que regem os mais diversos fenômenos biológicos dentro e entre estas populações nativas, sendo os marcadores moleculares, cruciais nestes processos (MONDINI *et al.*, 2009; SILVA, 2016).

Neste aspecto, ampliando e fornecendo um acréscimo substancial aos conhecimentos anteriormente agregados às características genéticas de diversos representantes de *L. pinaster* componentes de populações ocorrentes em Minas Gerais, estudos atuais como os desenvolvidos por Marques (2020) e Portella (2021), investigando os marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), contribuíram para o entendimento do comportamento e dinâmica das populações de *L. pinaster* das regiões norte, sudeste e sul do estado de Minas Gerais.

Partido destes estudos, na atualidade sabe-se que as distâncias genéticas encontradas entre as populações até então estudadas, sofrem influência direta da distância geográfica e da endogamia dentro das populações contribuindo para o aumento desta distância (MARQUES, 2020). A análise do comportamento destas populações de *L. pinaster* utilizando os SNPs, ainda revelaram que as populações se mostraram estruturadas não apresentando padrões de agrupamento em função das regiões (MARQUES, 2020).

Esse grupo de populações de *L. pinaster* apresentam uma segregação espacial alélica, muito provavelmente determinada pelas serras do estado de Minas Gerais, sendo as faixas de altitudes determinantes para a diversidade genética destas populações de *L. pinaster* (PORTELLA, 2021).

Diante dos imensos esforços empregados pelo grupo de pesquisadores do Instituto Agronômico de Campinas e colaboradores, desde 2004 a quase 20 anos atrás, muito se pode entender sobre a diversidade genética e aspectos químicos de *L. pinaster*, sobre seu *status* de conservação e distribuição de suas populações ao longo da Serra do Espinhaço, nas regiões norte, sudeste e sul do estado de Minas Gerais, conhecimentos estes, essenciais para o desenvolvimento de novas estratégias que fomentem pesquisas e programas para a conservação das populações naturais de *L. pinaster*.

## 6. DNA Repetitivo - DNA satélite

O DNA satélite (satDNA) compõe uma das partes mais fascinantes das porções repetitivas do genoma de organismos eucariontes (GARRIDO-RAMOS, 2017). Com a descoberta do DNA *tandem* com alto grau repetitivo, desde a década de 1960, diversos trabalhos têm abordado de forma extensa, inúmeros temas ligados a estrutura, organização, função e evolução das sequências repetitivas do DNA (GARRIDO-RAMOS, 2017).

O genoma dos eucariotos é tipicamente composto por uma diversidade de classes de sequências repetitivas de DNA dispersas, principalmente *transposons* e *retrotransposons*, sequências retrotranspostas, e algumas família de genes codificantes de proteínas, ou agrupadas em conjunto, como RNA ribossômico, famílias de genes codificantes de proteínas, satélites,

DNA telomérico e DNA centromérico (LOPEZ-FLORES, GARRIDO-RAMOS, 2012; BISCOTTI *et al*., 2015; GARRIDO-RAMOS, 2017).

As famílias de DNA satélite, assim como os Elementos Transponíveis (TEs), contribuem bastante na composição do genoma. Estas famílias de DNA satélite se organizam em enormes matrizes de sequências curtas e altamente repetitivas não codificadas. Há muito a se discutir sobre a distribuição destas famílias (satDNA) entre as espécies. Sabe-se que diferentes famílias (satDNA) podem estar presentes em uma mesma espécie, por exemplo: 9 famílias compondo o genoma humano, 15 famílias em *Pisum sativum* L. e 69 famílias em *Lacusta migratoria* (LEVY *et al*., 2007; MACAS *et al*., 2007; MIGA, 2015; RUIZ-RUANO *et al*., 2016; GARRIDO-RAMOS, 2017).

O DNA satélite pode ser encontrado em algumas espécies com predominância de algumas famílias satDNA (MRAVINAC *et al*., 2005; RUIZ-RUANO *et al*., 2016; GARRIDO-RAMOS, 2017). Por exemplo, a família satDNA mais abundante dentro do genoma humano, é a centromérica α satDNA que corresponde a mais da metade do total de conteúdo satDNA do genoma humano (LANDER *et al*., 2001; MIGA, 2015).

Uma família satDNA pode ser específica de uma espécie, o que pode estar de acordo com a visão atualmente aceita de que estas são as partes evolutivas mais rápidas do genoma (GARRIDO-RAMOS, 2017), porém, além de satDNAs específicos de uma espécie, há famílias satDNA compartilhadas por diversas espécies relacionadas dentro de um gênero (BELYAYEV *et al*., 2020), pelo conjunto completo de espécies que compõe um gênero, por diversos gêneros pertencentes a uma família, por uma família completa, por várias famílias ou até mesmo por uma ordem (BACHMANN *et al*., 1994; GARRIDO-RAMOS *et al*., 1998; ROBLES *et al*., 2004; MARTINSEN *et al*., 2009; CAFASSO, CHINALI, 2014; SUJIWATTANARAT *et al*., 2015).

Desde o início do século XXI pesquisas vinham tratando o DNA satélite com indiferença. Os projetos de sequenciamento de genomas não foram capazes de responder com precisão aos estudos do satDNA, e se quer as metodologias mais clássicas conseguiram avançar na realização de estudos que pudessem abranger todos os conjuntos de sequências de satDNAs de um genoma (GARRIDO-RAMOS, 2021).

Os conhecimentos sobre a dinâmica dos satDNAs avançou de forma progressiva neste último século, principalmente pelo advento das novas técnicas e tecnologias analíticas (GARRIDO-RAMOS, 2021), com a descoberta dos satDNAs e a sua natureza altamente variável. Muitas pesquisas buscam cada vez mais entender as suas diversas implicações no genoma dos organismos eucarióticos, sabendo que estes estão envolvidos em um conjunto de funções que vão desde a organização do cromossomo e emparelhamento, no metabolismo

celular e até mesmo na modulação de funções genéticas (MESTROVIC *et al*., 2015; BELYAYEV *et al*., 2020).

Desde o seu descobrimento, mais de 50 anos atrás, o DNA satélite é, atualmente, considerado ainda uma das partes mais intrigantes e fascinantes do genoma (GARRIDO-RAMOS, 2017). No entanto, as novas abordagens sobre todo o genoma, e as novas vantagens para sua análise, renovaram e estimularam o interesse no desenvolvimento de novos estudos acerca dos conhecimentos dos satDNAs (GARRIDO-RAMOS, 2021).

O DNA satélite é comumente classificado em microssatélites, minissatélites, satélites e macrossatélites, sempre de acordo com o comprimento de suas repetições monoméricas (THAKUR *et al*., 2021).

Os microssatélites, conhecidos como Repetições de Sequências Simples (SSRs), ou ainda como Repetições de Tandem Curto (STR), são repetições curtas com (2 – 6 bp), apresentam natureza polimórfica e estão presentes na região telomérica (GOMES *et al*., 2010; THAKUR *et al*., 2021); os minissatélites são repetições monoméricas geralmente maiores que os microssatélites (aproximadamente 15 bp), sendo encontrados em regiões eucromáticas do genoma de organismos vertebrados, de fungos e plantas.

Os satélites compreendem matrizes geralmente repetidas estando presentes nas regiões centroméricas, pericentroméricas e subteloméricas, as matrizes de satélites são caracterizadas por repetições simples ou complexas; e os macrossatélites que apresentam unidades de repetição monomérica muito maiores, variando em até algumas quilobases em cumprimento, estes são encontrados em regiões subteloméricas (ALEXANDROV *et al*., 2001; KOMISSAROV *et al*., 2011; DUMBOVIC *et al*., 2017; THAKUR *et al*., 2021).

O DNA satélite possui alto grau de polimorfismo por apresentar variações no número de unidades repetitivas ocasionadas por mutações que envolvem diversos mecanismos. A grande variabilidade dentro das repetições de DNA satélites em organismos relacionados ou não, os tornam ótimos marcadores para mapeamento, caracterização de genomas, correlação entre genótipo-fenótipo, realização de seleção assistida por marcadores em plantas úteis para a agricultura, estudos de diversidade e ecologia molecular, evidenciando um melhor entendimento sobre evolução e funcionamento do genoma de eucariontes (TAUTZ, RENZ, 1984; NASLUND *et al*., 2005; KAYSER, SCHNEIDER, 2009; BELYAYEV *et al*., 2020; THAKUR *et al*., 2021).

**7. Marcadores SSRs e SNPs**

Marcadores genéticos são comumente descritos como diferenças genéticas observadas entre organismos individuais ou entre espécies (BOHAR *et al*., 2020). Os marcadores moleculares não representam genes alvos em sua essência, no entanto, agem como sinais, sendo classificados em três tipos principais, os marcadores morfológicos, os marcadores bioquímicos e os marcadores de DNA, estando esta classificação, baseada em variações alélicas causadas por traços fenotípicos, enzimáticos ou locais de variação do DNA (COLLARD *et al*., 2005; BOHAR *et al*., 2020).

Para a utilização de um sistema de marcadores moleculares eficiente, alguns critérios são considerados, os marcadores devem ser altamente polimórficos, distribuídos de forma uniforme, de preferência devem ser codominantes, alelo distinto, de cópia única, econômicos e favorável à automação (GUPTA *et al*., 1999; BOHAR *et al*., 2020).

Marcadores microssatélites (SSRs) são repetições de sequências simples usualmente empregadas no estudo da genética vegetal com a utilização da genotipagem de baixo e alto rendimento (VIEIRA *et al*., 2016). Com os avanços tanto das técnicas, quanto das tecnologias e metodologias envolvidas nos estudos de genética molecular, ocorreu uma generalizada utilização de marcadores moleculares codominantes, principalmente os SSRs e mais recente, os SNPs (VIEIRA *et al*., 2016).

Os microssatélites são referidos como repetições *tandem* com menos de 10 bp distribuídas em loci espalhados pelo genoma, além disso, os microssatélites apresentam muitas semelhanças com os minissatélites e os satélites em níveis genômicos e citológicos, apresentando uma disseminação intragenômica que precede agrupamentos, podendo exibir estados agrupados ou não agrupados, sendo estes em sua maioria semelhantes, exceto em comprimento repetido (RUIZ-RUANO *et al*., 2016; GARRIDO-RAMOS, 2017).

Marcadores microssatélites são muito utilizados em estudos, especialmente de genética de populações vegetais por serem ferramentas extremamente eficientes (LAVOR *et al*., 2014; TANAKA *et al*., 2014; SILVA, 2016), sendo estes ainda classificados como repetições mono-, di-, tri-, tetra- e hexanucleotídicas, e dependendo do tipo de sequência repetitiva, podem ser: perfeitos com sequências sem interrupções $(AT)_{20}$, imperfeitos se ocorrerem interrupções ocasionadas pela presença de diferentes nucleotídeos alterando o padrão do motivo repetitivo $(AT)_{12}$ $GC(AT)_8$, e/ou sequências compostas por dois ou mais motivos *in tandem* $(AT)_7(GC)_6$ (WANG *et al*., 2009; HOSHINO *et al*., 2012; MIAH *et al*., 2013; SILVA, 2016), sendo as repetições AT/TA, como motivos mais abundantes em plantas (KALIA *et al*., 2011).

Os microssatélites são encontrados tanto em organismos procariontes quanto nos organismos eucariotos, estando amplamente difundidos por todo o genoma, principalmente na

eucromatina de eucariontes e no DNA nuclear ou organelar não codificante (PÉREZ-JIMÉNEZ *et al*., 2013; PHUMICHAI *et al*., 2015; VIEIRA *et al*., 2016).

Microssatélites apresentam alta variação genética devido a sua alta heterozigosidade e a presença de alelos múltiplos, sendo um marcador neutro com grau de polimorfismo proporcional à taxa de mutação, que em termos estimativos, varia entre $10^{-2}$ a $10^{-4}$ por geração (ELLEGREN, 2004; MIAH *et al*., 2013).

Por possuírem uma alta taxa de mutação (VIEIRA *et al*., 2016), estudos indicam que os microssatélites poderiam comprometer a expressão gênica, por isso, estes estariam localizados com menor ocorrência em regiões genéticas, sendo que em regiões de codificação ocorrem com predominância, SSRs que apresentam motivos genéticos dos tipos tri e hexanucleotídeos (ZANG *et al*., 2004; XU *et al*., 2013b; VIEIRA *et al*., 2016).

Microssatélites aparentemente podem surgir espontaneamente a partir de eventos de inserção ou deleção que duplicam sequências adjacentes, formando inicialmente proto-microssatélites ou elementos transponíveis que, podem inserir formas mais primitivas de microssatélites em regiões receptivas do genoma (ZHU *et al*., 2000; WILDER, HOLLOCHER, 2001; KALIA *et al*., 2011; SILVA, 2016).

Os SSRs tem sido os marcadores mais amplamente utilizados na genotipagem de plantas por serem altamente informativos, codominantes, apresentarem alelos múltiplos, serem reprodutíveis experimentalmente e transferíveis entre as espécies relacionadas (MANSON, 2015; VIEIRA *et al*., 2016), sendo estas, úteis para estudos de diversidade medida com base na distância genética; na estimativa do fluxo gênico e passagem das taxas e estudos evolutivos, inferindo sobre as relações genéticas infraespecíficas (JONAH *et al*., 2011; KALIA *et al*., 2011).

Os marcadores microssatélites podem ser úteis no estudo de estruturas populacionais, no mapeamento genético e processos evolutivos (VIEIRA *et al*., 2016), porém, mesmo com uma ampla aplicabilidade dos marcadores microssatélites em estudos genéticos desde sua descoberta na década de 1980, estudos sobre a sua importância biológica ainda são poucos, especialmente para plantas (MORGANTE *et al*., 2002; VIEIRA *et al*., 2016). No entanto, com a detecção e descoberta de microssatélites em regiões regulatórias e de transcrição do genoma, surgiu um crescente interesse científico pelo descobrimento de suas possíveis funções biológicas, e assim, publicações vem apresentando novas evidências do papel desempenhado pelos microssatélites em processos importantes tal como, regulação da transcrição e tradução, organização da cromatina, tamanho do genoma e ciclo celular (NEVO, 2001; LI *et al*., 2004; GAO *et al*., 2013; VIEIRA *et al*., 2016).

Com o avanço tecnológico, a ampla utilização de marcadores moleculares tem contribuído de forma significativa para o estudo aplicado nos diversos métodos de reprodução de plantas, o que tem aumentado principalmente, o ritmo de melhorias das culturas (BOHAR *et al*., 2020).

Tanto os SSRs quanto os SNPs são destaques em estudos que tratam SSRs e SNPs em conjunto ou especificamente em diversos gêneros vegetais como: a cevada (KOTA *et al*., 2001), a mandioca (OLSEN, 2004), o milho (BLANCA *et al*., 2011), a abóbora (YANG *et al*., 2011), para árvores frutíferas cítricas (GARCIA-LOR *et al*., 2013), para o arroz (SINGH *et al*., 2013; SUMAN *et al*., 2021), a jujuba chinesa (CHEN *et al*., 2017), a amora (RUKMANGADA *et al*., 2019), o mirtilo (WANG *et al*., 2019) e para o sorgo (BAGGETT *et al*., 2021), onde fica evidenciada a importância destes marcadores moleculares para o estudo da diversidade genética de populações, melhoramento de culturas e ecologia molecular.

Segundo Bohar *et al*. (2020), os SNPs são os marcadores moleculares mais comumente utilizados para diversas aplicações genômicas atualmente, principalmente pela sua abundância nos genomas de todos os organismos, sendo um marcador de fácil automação, o que leva a uma genotipagem de baixo custo e alto rendimento (RAFALSKI, 2002; BOHAR *et al*., 2020).

Os SNPs são marcadores capazes de expressar diferenças únicas em bases de nucleotídeos entre duas sequências de DNA, fornecem formas mais simples e definitivas de marcadores moleculares, sendo sua frequência, na ordem de intervalo que compreende um SNP a cada 100 – 300 pb nas plantas (KUMAR *et al*., 2018; MARQUES, 2020).

Os SNPs tornam-se a cada dia, um sistema de marcadores moleculares ideal, podendo ser usados da mesma forma que outros marcadores genéticos em uma diversidade de funções como o aprimoramento de culturas, análises de diversidade genética, em associação de características de marcadores ou seleção assistida de marcadores (YANG *et al*., 2011). Os marcadores SNPs apresentam uma maior frequência nos genomas se comparado aos marcadores SSRs.

Yang *et al*. (2010) comparando estes dois sistemas de marcadores moleculares, observaram que a o método de detecção SNP (Array-based), pode ser até 100 vezes mais rápido que o método de detecção de SSRs baseado em gel, observando que o seu custo, era de 4-5 vezes menor (YANG *et al*., 2011).

Comparando a capacidade de SNPs e SSRs e sua contribuição na avaliação da estrutura de populações, Hamblin *et al*. (2007) utilizando 89 SSRs e 847 SNPs, observaram que os SSRs apresentaram desempenho melhor que os SNPs no agrupamento individual dentro das populações, no entanto, os dois marcadores mostraram que são consistentes no agrupamento quanto a estrutura de populações (YANG *et al*., 2011).

Marcadores moleculares tem se mostrado uma ferramenta essencial para o estudo da estrutura de populações, diversidade genética e ecologia molecular, devido ao seu alto grau de mutação. Estes são indispensáveis nos processos de reprodução assistida por marcadores, promovendo uma identificação precisa e rápida, são eficientes na caracterização, no manejo e coleta de germoplasma de culturas, apresentam especificidade de lócus, reprodutibilidade e ampla distribuição por todo genoma de diversos organismos (SINGH *et al*., 2013; HE *et al*., 2014; NADEEM *et al*., 2018; WANG *et al*., 2019).

**8. Elementos Transponíveis TEs**

O genoma dos eucariotos é composto por regiões de sequências não codificadas, estas em sua maioria, incluem o DNA intergênico, elementos repetitivos e introns, sendo os Elementos Transponíveis – TEs, componentes de uma grande parte dos elementos repetitivos presentes no genoma de muitos eucariontes (SAHEBI *et al*., 2018).

Fundamentalmente os TEs são bem diferentes dos genes, estando estes relacionados a sequências de DNA que são enriquecidas por modificações de cromatina associadas ao silenciamento transcricional (SAHEBI *et al*., 2018). Dentro dos genomas dos eucariontes, os TEs são as sequências mais repetitivas, estes são capazes de se mover dentro e entre o genoma, gerar mutações, e amplificar o número de suas cópias (MUSZEWSKA *et al*., 2011; ARANGO-LOPEZ *et al*., 2017; OROZCO-ARIAS *et al*., 2019).

Desde meados do século XX, quando foram descritos pela primeira vez em milho, os TEs, por vários anos, foram considerados como “DNA lixo” ou “parasitas genômicos” sem acrescentar qualquer benefício à composição do genoma dos hospedeiros, porém, descobertas indicaram que estes podem ser benéficos, fornecendo elementos genéticos com caráter regulatório, produzindo mudanças genômicas, compondo partes específicas de regiões do genoma como a região do centrômero (BRUNNER *et al*., 2005; LIU *et al*., 2008; RAVINDRAN, 2012; ZHANG, GAO, 2017; HIRSCH, SPRINGER, 2017; NEUMANN *et al*., 2019; COSTA *et al*., 2019).

Em geral, os TEs são classificados de acordo com as regiões que estão envolvidas diretamente na codificação e replicação do elemento, sendo que, os TEs que movem-se através de uma molécula de RNA (os retrotransposons), estão classificados dentro da Classe I, enquanto os TEs que movem-se através de uma molécula de DNA (os transposons), são classificados dentro da Classe II (WICKER *et al*., 2007; CHAPARRO *et al*., 2015; OROZCO-ARIAS *et al*., 2019), dentre estes, os elementos classificados na Classe I, os retrotransposons, são predominantes em genomas de plantas (OLIVER *et al*., 2013; MHIRI *et al*., 2019).

Os retrotransposons ainda são subdivididos e classificados em quatro ordens: LTR-RT; não-LTR; PLEs e DIRS de acordo com suas características estruturais e ciclo de vida do elemento (CASACUBERTA, GONZÁLEZ, 2013; OROZCO-ARIAS *et al*., 2019). A ordem LTR-RT é a mais comum, podendo contribuir em 75% a 80% do tamanho do genoma da planta, como observado na cevada, trigo e seringueira (GAO *et al*., 2012; RAHMAN *et al*., 2013; NEUMANN *et al*., 2019).

Os TEs da Classe I, principalmente os retrotransposons LTRs, são comumente classificados apenas ao nível de superfamílias (a categoria mais ampla de classificação dos retrotransposons LTR), tipicamente os retrotransposons LTR encontram-se classificados dentro das superfamílias: Ty1/Copia (*Pseudoviridae*), Ty3/Cigana-Gypsy (*Metaviridae*), Bel-Pao (*Belpaoviridae*), Retrovírus (*Retroviridae*) e Retrovírus Endógenos (ERV *Retroviridae*), diferindo entre si, pela organização do domínio proteico na sequência poligênica (SCHNABLE *et al*., 2009; BENNETZEN, WANG, 2014; NEUMANN *et al*., 2019; NEUMANN *et al*., 2019; ASSIS *et al*., 2020), sedo que, apenas as superfamílias Ty1/Copia e Ty3/Cigana, ocorrem em plantas inserindo uma grande quantidade de elementos diversos (NEUMANN *et al*., 2019).

Com base na organização interna do domínio de codificação, em plantas, a ordem LTR-RT é composta por duas superfamílias: Copia e Cigana (Gypsy). As duas superfamílias de LTR-RT, ainda foram subdivididas em linhagens e famílias por meio de análises filogenéticas com base em similaridades de regiões de codificação, muitas delas realizadas através do domínio enzimático conhecido como transcriptase reversa (RT) (LLORENS *et al*., 2009; OROZCO-ARIAS *et al*., 2019).

Em genomas vegetais, são descritas as linhagens: Ale (Retrofit), Alesia, Angela, Bianca, Bryco, Lyco, Gymco, Ikeros (Tork sto-4), Ivana (Oryco) e Osser, pertencentes a superfamília Copia, e para a superfamília Cigana (Gypsy), as linhagens Athila, Clamyvir, Galadriel, Selgy, TCnl, Reina, Tekay (Del), CRM, Phygy e TAT (OROZCO-ARIAS *et al*., 2019).

Os retrotransposons de repetições de terminais longos (LTR-RTs) compõem um grande grupo diverso de TEs presentes nos eucariotos, sendo abundantes principalmente, em genomas vegetais (NEUMANN *et al*., 2019). De modo geral, os retrotransposons exercem um papel importante na evolução de uma espécie, sua mobilidade produz variações genéticas, favorecendo rearranjos cromossômicos por meio de recombinações ilegítimas no mesmo cromossomo entre locais distantes ou em cromossomos diferentes (DEVOS *et al*., 2002; LISCH, 2013; VANGELISTI *et al*., 2021).

Os retrotransposons LTR-RT, atuam como um mecanismo de cópia e cola originando novas cópias de elementos aumentando o tamanho do genoma do hospedeiro após a integração, estes replicam-se através de um RNA intermediário, gerando assim, as novas cópias de

elementos. Este processo pode estar entre os principais impulsionadores da evolução do tamanho do genoma (VITTE, PANAUD, 2005; GROVER, WENDEL, 2010; GALINDO-GONZÁLEZ *et al*., 2017; WICKER *et al*., 2018; NEUMANN *et al*., 2019).

Uma das características mais importantes apresentadas pelos retrotransposons LTR é a sua alta diversidade de sequências de nucleotídeos, que são no geral, únicas para uma espécie ou para um grupo determinado de espécies que são intimamente relacionadas (NEUMANN *et al.,* 2019). Os retrotransposons LTR-RTs autônomos, ainda possuem domínios internos que estão intimamente ligados a codificação de proteínas que relacionam-se diretamente com a sua transposição sendo os domínios: GAG (Antígeno específico do grupo) e POL (sintetizado como poliproteína contendo PROT, Aspartic Proteinase; INT, Integrase, RT, Transcriptase Reversa e RH, RNAse H) importantes neste processo (COSTA *et al.,* 2019).

As duas superfamílias de retrotransposons LTR-RTs Copia e Sigana, as mais abundantes em plantas, assim como as outras três superfamílias LTR-RTs, são classificadas e divididas de acordo com inferências filogenéticas baseadas nos domínios das proteínas GAG e POL (LLORENS *et al.,* 2009; 2011; COSTA *et al.,* 2019). Os elementos componentes das superfamílias Copia e Sigana diferenciam-se pela organização de seus domínios internos (WICKER *et al.,* 2007; BENNETZEN, WANG, 2014, COSTA *et al.,* 2019), tendo as suas diversas linhagens, relações de similaridades sequenciais e organização molecular compartilhadas, sendo a sua identificação e caracterização, um passo fundamental para o entendimento dos mecanismos de transposição e história evolutiva deste sistema LTR-RT (EL BAIDOURI, PANAUD, 2013; OCHOA CRUZ *et al.,* 2016; VICIENT, CASACUBERTA, 2017; COSTA *et al.,* 2019).

Por serem abundantes em genomas vegetais, os TEs LTR-RTs, apresentam importância significativa quando investigados em sua ampla diversidade encontrada nos mais diversos genomas de plantas, em análises mais aprofundadas sobre estes diversos genomas. Estudos tem revelado que os TEs, especialmente contendo os elementos LTR-RT compõem: 8,9/125 Mb, cerca de 6,6% do genoma de *Arabidopsis* (*Arabidopsis* Genoma Initiative, 2000), 146,6/742,3 Mb, 31,1% do genoma da maçã (VELASCO *et al.,* 2010), 1432/2365 Mb, cerca de 70,1% do genoma do milho (RAYBURN *et al.,* 1993; SCHNABLE *et al.,* 2009), e 60,9/430 Mb, 14,5% do genoma do arroz (ECKARDT, 2000; PATERSON *et al.,* 2009).

Apresentando uma alta dinâmica na natureza, os TEs contribuem diretamente para a diversidade intraespecífica do genoma, promovendo variações no tamanho do genoma e expressão genética, sendo ativos na manutenção e estabilização de regiões do centrômero que são críticas, inserindo tipos específicos de TEs (MAKAREVITCH *et al.,* 2015; GAO *et*

*al.*, 2015; FERREIRA DE CARVALHO *et al.*, 2016; SARKAR *et al.*, 2017; JAYASWAL *et al.*, 2020).

Assim, levando em consideração a importância da espécie *L. pinaster* para a medicina popular, o seu potencial uso futuro na composição de insumos para as indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética dentre outras, sua importância ecológica e o seu status de conservação, este trabalho tem como objetivo principal realizar um estudo destacando os diversos aspectos morfológicos, anatômicos, químicos e genéticos de populações de *Lychnophora pinaster* ocorrentes no estado de Minas Gerais, buscando fornecer novos elementos e subsídios para futuros programas de conservação de populações naturais desta espécie endêmica ameaçada de extinção.

# II. OBJETIVOS

Realizar um estudo destacando os diversos aspectos morfológicos, anatômicos, químicos e genéticos de populações de *Lychnophora pinaster* ocorrentes no estado de Minas Gerais, buscando fornecer novos elementos e subsídios para futuros programas de conservação desta espécie, para isso, tendo como principais objetivos específicos:

- Caracterizar grupos de características morfológicos e anatômicos relevantes para a identificação de *Lychnophora pinaster*;
- Realizar uma revisão sobre características morfológicas, anatômicas, genéticas e componentes químicos de populações de *L. pinaster*, destacando aspectos da composição química dos óleos essenciais de quinze populações;
- Identificar grupos de elementos transponíveis retrotransposons de sequências repetitivas do DNA presentes em *Lychnophora pinaster*, através de marcadores moleculares (SNPs) presentes em populações da espécie, ocorrentes no estado de Minas Gerais;
- Verificar a estruturação populacional de populações de *L. pinaster* ocorrentes em quatro mesorregiões do estado de Minas Gerais através de análises de marcadores SNPs;
- Verificar níveis de compartilhamento de compostos químicos dos óleos essenciais entre populações de *L. pinaster* de uma mesma região ou de regiões diferentes.

## III. REFERÊNCIAS


ABREU, V.G.C; TAKAHASHI, J.A; DUARTE, L.P; PILÓ-VELOSO, D; JÚNIOR, P.A.S; ALVES, R.O; ROMANHA, A.J; ALCÂNTARA, A.F.C. Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21(4), p. 615-621, 2011.

ABREU, V.G.C; CORREA, G.M; SILVA, T.M; FONTOURA, H.S; CARA, D.C; PILÓ-VELOSO, D; ALCÂNTARA, A.F.C. Anti-inflammatory effects in muscle injury by transdermal application of gel with *Lychnophora pinaster* aerial parts using phonophoresis in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13(270), p. 2-8, 2013.

ALBERTON, M.D. **Avaliação da autenticidade de amostras comerciais à base de Espinheira-Santa (*Maytenus ilicifolia* Martius ex Reissek) comercializadas na região de Tubarão – SC**. XI Encontro Estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos, IX congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos e III Encontro de Farmacêuticos do Mercosul, código A5.02, 2002.

ALCÂNTARA, A.F.C; SILVEIRA, D; CHIARI, E; OLIVEIRA, A.B; GUIMARÃES, J.E; RASLAN, D.S. Comparative analysis of the trypanocidal activity and chemical properties of *E*-lychnophoric acid and its derivatives using theoretical calculations. **Eclética Química**, v. 30(3), p. 37-45, 2005.

ALEXANDROV, I; KAZAKOV, A; TUMENEVA, I; SHEPELEV, V; YUROV, Y. Alpha-satellite DNA de primatas: famílias antigas e novas. **Cromosoma**, v. 110(4), p. 253-66, 2001.

ANTONISAMY, P; DURAIPANDIYAN, V; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetracantha* Lam. in mouse and rat models. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 63(8), p. 1070-1077, 2011.

ARABIDOPSIS GENOMA I. Análise da sequência de genomas da planta de floração *Arabidopsis thaliana*. **Natureza**, v. 408, p. 796-815, 2000.

ARANGO-LÓPEZ, J; OROZCO-ARIAS, S; SALAZAR, J.A; GUYOT, R. **Colombian Conference on Computing**. Springer; Cham, Switzerland. Application of data mining algorithms to classify biological data: The *Coffea canephora* genome case. p. 156–170, 2017.

ASSIS, R; BABA, V.Y; CINTRA, L.A; GONÇALVES, L; RODRIGUES, R; VANZELA, A. Relações genômicas e diversidade LTR-retrotransposon em três espécies cultivadas de *Capsicum* L. (Solanaceae). **BMC genomics**, v. 21(1), p. 237, 2020.

ATHAYDE, A.L; RICHETTI, E; WOLFF, J; LUSA, M.G; BIAVATTI, M.W. "Arnicas" from Brazil: comparative analysis among ten species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29(4), p. 401-424, 2019.

BACHMANN, L; VENANZETTI, F; SBORDONI, V. Caracterização de uma família de DNA de satélite específica de *Dolichopoda schiavazzii* (Orthoptera, Rhaphidophoridae). **Journal of Molecular and Evolution**, v. 39(3), p. 274-81.

BAGGETT, J.P; TILLETT, R.L; COOPER, E.A; YERKA, M.K. De novo identification e sequenciamento direcionado de SSRs eficientemente impressões digitais Identidade sub-população sorgo bicolor. **PLos ONE**, v. 16(3), e0248213, 2021.

BAKER, J.G. **Flora Brasiliensis**, v. 6(2), p. 1-180, 1873.

BARROS, C.H; MATOSINHOS, R.C; BERNARDES, A.C.F.P.F; ARAÚJO, M.C.P.M; BEZERRA, J.P; SACHS, D; SOARES, R.D.O.A; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Efeitos de *Lychnophora pinaster* na inflamação e dor na gota aguda. **Journal of Etnopharmacology**, v. 280, p. 114460, 2021.

BELYAYEV, A; JOSEFIOVÁ, J; JANDOVÁ, M; MAHELKA, V; KRAK, K; MANDÁK, B. Transposons e DNA de satélite: sobre a origem da maior família de DNA de satélite no genoma do *Chenopodium*. **DNA da máfia**, v. 11, p. 20, 2020.

BENNETZEN, J.L; WANG, H. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 505-30, 2014.

BERNARDES, A.C.F.P.F; COELHO, G.B; ARAÚJO, M.C.P.M; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. In vivo anti-hyperuricemic activity of sesquiterpene lactones from *Lychnophora* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29(2), p. 241-245, 2019.

BERNARDES, A.C.F.P.F; MATOSINHOS, R.C; ARAÚJO M.C.P.M; BARROS, C.H; SOARES R.D.O.A; COSTA, D.C; SACHS, D; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Lactonas sesquiterpene da espécie *Lychnophora*: vias antinociceptivas, anti-inflamatórias e antioxidantes para tratar gota aguda. **Journal of Etnopharmacology**, v. 6(269), p. 113738, 2021.

BFG - Brazilian Flora Group. **Brazilian Flora 2020 project - Projeto Flora do Brasil 2020**. v. 393, p. 274, 2021.

BISCOTTI, M.A; OLMO, E; HESLOP-HARRISON, J.S. DNA repetitivo em genomas eucarióticos. **Cromossome Research**, v. 23(3), p. 415-20, 2015.

BLANCA, J; CAÑIZARES, J; ROIG, C; ZIARSOLO, P; NUEZ, F; PICÓ, B. Transcriptome caracterização e alta throughput SSRs e SNPs discovery in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). **Genômica BMC**, v. 12, p. 104, 2011.

BOHAR, R; CHITKINENI, A; VARSHNEY, R.K. Marcadores moleculares genéticos para acelerar os ganhos genéticos nas culturas. **Biotecnologias**, v. 69(3), p. 158-160, 2020.

BRUNNER, S; FENGLER, K; MORGANTE, M; TINGEY, S; RAFALSKI, A. Evolution of DNA sequence nonhomologies among maize inbreds. The **Plant Cell**, v. 17(2), p. 343-60, 2005.

CALDEIRA, T.G; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A; DE LACERDA, D.L.R; MUSSEL, W.D.N; YOSHIDA, M.I; DE SOUZA, J. Caracterização polimórfica e implicações em propriedades biofarmacêuticas de potenciais candidatos a medicamentos anti-inflamatórios eremantholide C de *Lychnophora trichocarpha* (Arnica brasileira). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71(6), p. 910-919, 2019.

CALDEIRA, T.G; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, I; BERMEJO, M; DE SOUZA, J. Eremantholide C de partes aéreas de *Lychnophora trichocarpha*, como

candidato à droga: previsão absorvida por fração em humanos e determinação da classe de permeabilidade bcs. **Daru Journal of Pharmaceitical Sciences**, v. 29(1), p. 195-203, 2021.

CAFASSO, D; CHINALI, G. Um DNA de satélite antigo manteve unidades repetitivas da estrutura original na maioria das espécies do gênero vegetal vivo *Zamia*. **Genoma**, v. 57(3), p. 125-35, 2014.

CASACUBERTA, E; GONZÁLEZ, J. O impacto dos elementos transposáveis na adaptação ambiental. **Molecular Ecology**, v. 22(6), p. 1503-17, 2013.

CERQUEIRA, M.B.S; SOUZA, J.T; JUNIOR, R.A; 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, p. 551-553, 1987.

CHAPARRO, C; GAYRAUD, T; DE SOUZA, R.F; DOMINGUES, D.S; AKAFFOU, S; LAFORGA VANZELA, A.L; KOCHKO, A.D; RIGOREAU, M; CROUZILLAT, D; HAMON, S; HAMON, P; GUYOT, R. Retrotransposons de repetição de terminais com domínio GAG em genomas vegetais: um novo testemunho sobre o complexo mundo dos elementos transposáveis. **Genome Biology and Evolution**, v. 7(2), p. 493-504, 2015.

CHAVES, T.L; RICARDO, L; PAULA-SOUZA, J.D; BRANDÃO, M.D.G.L. Plantas brasileiras úteis sob a visão do escritor-naturalista João Guimarães Rosa. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 437-444, 2015.

CHEN, W; HOU, L; ZHANG, Z; PANG, X; LI, Y. Genetic Diversity, Population Structure, and Linkage Disequilibrium of a Core Collection of *Ziziphus jujuba* Assessed with Genome-wide SNPs Desenvolvidos por Genotiping-by-sequencing and SSR Markers. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 575, 2017.

CHIARI, E; OLIVEIRA, A.B; RASLAN, D.S; MESQUITA, A.A.L; TAVARES, K.G. Screening in vitro of natural-products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85(3), p. 372-74, 1991.

CHIARI, E; DUARTE, D.S; RASLAN, D.S; SAÚDE, D.A; PERRY, K.S.P; BOAVENTURA, M.A.D; GRANDI, T.S.M; STEHMANN, J.R; ANJOS, A.M.G; OLIVEIRA, A.B. *In vitro* screening of asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytotherapy Research**, v. 10(7), p. 636-638, 1996.

CHIARO, P; PINTO, E; COLEPICOLO, P; LOPES, J.L.C; LOPES, N.P. Flavonoids from *Lychnophora passerina* (Asteraceae): potential antioxidants and UV-protectants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 239-243, 2004.

COILE, N.C; JONES JR, S.B. **Brittonia**, v. 33, p. 528-542, 1981.

COLLARD, B.C; JAHUFER, M.Z; BROUWER, J.B; PANG, E.C. Introdução a marcadores, mapeamento de traços quantitativos (QTL) e seleção assistida por marcadores para melhoria de culturas: os conceitos básicos. **Euphytica**, v. 142(1-2), p. 169-196, 2005.

COPAM – CONSELHO DE POLÍTICA AMBIENTAL. **Lista das espécies ameaçadas de extinção da flora do Estado de Minas Gerais**. Deliberação COPAM 85/97 . Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/MG-espécies-Flora-ameaçadas.pdf>. Acesso em: 15 Junho 2011.

COSTA, F.B. ET. AL. **Quimiossistemática e filogenia de *Viguiera* (*Asteraceae*)** (Resumo). XXI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, pág. 69, 1999.

COSTA, Z.P; CAUZ-SANTOS, L.A; RAGAGNIN, G.T; VAN SLUYS, M.A; DORNELAS, M.C; BERGES, H; DE MELLO VARANI, A; VIEIRA, M.L.C. Transposable element discovery and characterization of LTR-retrotransposon evolutionary lineages in the tropical fruit species Passiflora edulis. **Molecula Biology Report**, v. 46(6), p. 6117-6133, 2019.

COUTINHO, H.D.M; NETO, V.M; VERDE, L.C.L. Técnicas com Marcadores Moleculares Usadas nas Ciências da Saúde. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 10(2), p. 177-188, 2006.

CUPOLILO, S.M.N; GOLLNER, A.M; SOUZA, R.L.P; TIAGO, D.A.G; LIMA, V.B.R; LIMA, T.S. Investigation of damage effects by antiinflammatory and immunosuppressive doses of dexamethasone on mice's gastric mucosal. **HU Revista**, v. 33, p. 17-22, 2007.

DEVOS, K.M; BROWN, J.K; BENNETZEN, J.L. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in *Arabidopsis*. **Genome Research**, v. 12(7), p. 1075-9, 2002.

DHUTMAL, R.R; MUNDHE, A.G; MORE, A.W. Molecular Marker Techniques: A Review.**International Journal Current Microbiology and Applied. Science**, **Special Issue**, v. 6, p. 816-825, 2018.

DUARTE, D.S; RASLAN, D.S; CHIARI, E; OLIVEIRA, A.B. Trypanocidal activity of *Lychnophora pinaster* Mart. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 88-240, 1993.

DUMBOVIC, G; FORCALES, S.V; PERUCHO, M. Papéis emergentes de macrosatélite se repetem na organização do genoma e no desenvolvimento de doenças. **Epigenética**, v. 12(7), p. 515-526, 2017.

ECKARDT, N.A. Sequenciamento do genoma do arroz. **Célula vegetal**, v. 12, p. 2011-2017, 2000.

EL BAIDOURI, M; PANAUD, O. Comparative genomic paleontology across plant kingdom reveals the dynamics of TE-driven genome evolution. **Genome Biology and Evolution**, v. 5(5), p. 954-965, 2013.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 435-445, 2004.

FERRAZ-FILHA, Z. S; LOMBARDI, J. A; GUZZO, L. S; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) bioassay of extracts from *Lychnophoriopsis candelabrum* and different *Lychnophora* species. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14(2), p. 358-361, 2012.

FERRARI, F.C; FERREIRA, L.C; SOUZA, M.R; GRABE-GUIMARÃES, A; PAULA, C.A; REZENDE, S.A; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Lactonas sesquiterpene anti-inflamatórias de *Lychnophora trichocarpha* Spreng. (Arnica brasileira). **Phytotherapy Research**, v. 27(3), p. 384-9, 2013.

FERREIRA, S.A. **Avaliação da toxicidade e das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* (arnica)**. UFOP, Ouro Preto, 2010.

FERREIRA, S.A; GUIMARÃES, A.G; FERRARI, F.C; CARNEIRO, C.M; PAIVA, N.C.N; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Assessment of acute toxicity of the ethanolic extract of *Lychnophora pinaster* (Brazilian arnica). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24(5), p. 553-560, 2014.

FERREIRA DE CARVALHO, J; DE JAGER, V; VAN GURP, T.P; WAGEMAKER, N.C; VERHOEVEN, K.J. Elementos transponíveis recentes e dinâmicos contribuem para a divergência genômica sob a assexualidade. **BMC Genome**, v. 17, p. 884, 2016.

GALINDO-GONZÁLEZ, L; MHIRI, C; DEYHOLOS, M.K; GRANDBASTIEN, M.A. LTR-retrotransposons nas fábricas: Motores de evolução. **Gene**, v. 626, p. 14-25, 2017.

GAO, D; JIMENEZ-LOPEZ, J.C; IWATA, A; GILL, N; JACKSON, S.A. Divergência funcional e estrutural de uma incomum família retrotransposon ltr em plantas. **PLos ONE**, v. 7(10), e48595, 2012.

GAO, C; REN, X; MASON, A.S; LI, J; WANG, W; XIAO, M; FU, D. Revisitando um componente importante dos genomas vegetais: microsatélites. **Functional Plant Biology**, (40), p. 645-645, 2013.

GAO, D; JIANG, N; WING, R.A; JIANG, J; JACKSON, S.A. As transposons desempenham um papel importante na evolução e diversificação dos centrosmers entre espécies intimamente relacionadas. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 216, 2015.

GARCIA-LOR, A; CURK, F; SNOUSSI-TRIFA, H; MORILLON, R; ANCILLO, G; LURO, F; NAVARRO, L; OLLITRAULT, P. Uma análise filogenética nuclear: SNPs, indels e SSRs fornecem novas percepções sobre as relações no grupo "verdadeiras árvores frutíferas cítricas" (Citrinae, Rutaceae) e a origem das espécies cultivadas. **Annals of Botany**, v. 111(1), p. 1-19, 2013.

GARRIDO-RAMOS, M.A; DE LA HERRÁN, R; REJÓN, C.R; REJÓN, M.R. Um DNA de satélite da família Sparidae (peixes, perciformes) associado a sequências telôméricas. **Genet celular citogeneta**, v. 83(1-2), p. 3-9, 1998.

GARRIDO RAMOS, M.A. DNA de satélite: um tópico em evolução. **Genes (Basileia)**, v. 8 (9), p. 230, 2017.

GARRIDO RAMOS, M.A. A Genômica do DNA do Satélite Vegetal. **Progress in Molecular end Subcellular Biology**, v. 60, p. 103-143, 2021.

GOMES, N.M; SHAY, J.W; WRIGHT, W.E. Biologia de Telômero em Metazoa. **FEBS Letters**, v. 584(17), p. 3741-51, 2010.

GOUVEA, D.R. **Estudo da variação populacional dos metabolitos secundários do Arnicão (*Lychnophora salicifolia* Mart., Vernonieae, Asteraceae).** Tese. Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, p. 105, 2010.

GOUVEA, D.R; MELONI, F; RIBEIRO, A.B; LOPES, J.L; LOPES, N.P. Um novo método HPLC-DAD-MS/MS para a determinação simultânea de compostos principais no extrato bruto de *Lychnophora salicifolia* Mart. (arnicão brasileiro) deixa: aplicação à avaliação de variabilidade química. **Analytica Chimica Acta**, v. 20(748), p. 28-36, 2012.

GROVER, C.E; WENDEL, J.F. Insights recentes sobre mecanismos de variação do tamanho do genoma nas plantas. **Journal of Botany**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

GUPTA, P.K; VARSHNEY, R.K; SHARMA, P.C; RAMESH, B. Marcadores moleculares e suas aplicações na criação de trigo. **Raça vegetal**, v. 118(5), p. 369-390, 1999.

GUZZO, C.A; LAZARUS, G.S; WERTH, V. Dermatologycal Pharmacology. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. (Org.). **Goodman & Gilman's the pharmacological basis phytotherapeutics**, v. 9, p. 1604-6, 1996.

GUZZO, L.S; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A; SILVA, A.C.A; LOMBARDI, J.A; GUIMARÃES, H.N; GRABE-GUIMARÃES, A. Antinociceptive and antiinflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 120–124, 2008.

HABER, L.H. **Caracterização da diversidade genética, via marcador microssatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart**. Tese. Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, p. 151, 2008.

HABER, L.H; CAVALLARI, M.M; SANTOS, F.R; MARQUES, M.O; GIMENES, M.A; ZUCCHI, M.I. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites para *Lychnophora pinaster*: um estudo para a conservação de uma planta medicinal nativa. **Resources Molecular and Ecology**, v. 9(3), p. 811-4, 2009.

HAMBLIN, M.T; WARBURTON, M.L; BUCKLER, E.S. Comparação empírica de repetições de sequência simples e polimorfismos de nucleotídeos únicos na avaliação da diversidade e da relação do milho. **PLoS ONE**, v. 12:e1367, 2007.

HE, J; ZHAO, X; LAROCHE, A; LU, ZX; LIU, H; LI, Z. Genotyping-by-sequencing (GBS), uma ferramenta final de seleção assistida por marcadores (MAS) para acelerar a criação de plantas. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 484, 2014.

HIRSCH, C.D; SPRINGER, N.M. Transposable element influences on gene expression in plants. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1860(1), p. 157-165, 2017.

HOSHINO, A.A; BRAVO, J.P; NOBILE, P.M; MORELLI, K.A. Chapter 6. **Microsatellites as Tools for Genetic Diversity Analysis**. In: Caliskan M. (Org). Genetic Diversity in Microorganisms. Intech: Croacia. 2012.

ISOBE, M.T.C. **Anatomia foliar e influência da sazonalidade no óleo essencial de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.** Dissertação (Mestrado em Agronomia – Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p. 93, 2012.

JAYASWAL, P.K; SHANKER, A; SINGH, N.K. Genoma ampla anotação e caracterização de jovens, intactos longos terminais repetitivos retrotransposons (In-LTR-RTs) de sete espécies de leguminosas. **Genética**, v. 148, p. 253-268, 2020.

JONAH, P; BELLO, L; LUCKY, O; MIDAU, A; MORUPPA, S. Review: a importância dos marcadores moleculares em programas de reprodução de plantas. **Global Journal of Science Frontier Research**, 11 eV-versl, 2011.

KALIA, R.K; RAI, M.K; KALIA, S; SINGH, R; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica,** v. 177, p. 309-334, 2011.

KAYSER, M; SCHNEIDER, P.M. Previsão baseada em DNA de características humanas externamente visíveis na perícia: motivações, desafios científicos e considerações éticas. **Science International Genetics forense**, v. 3(3), p. 154-61, 2009.

KOMISSAROV, A.S; GAVRILOVA, E.V; DEMIN, S.J; ISHOV, A.M; PODGORNAYA, O.I. Tandemly repeated DNA families in the mouse genome. **BMC Genomics**, v. 12, p. 531, 2011.

KOTA, R; VARSHNEY, R.K; THIEL, T; DEHMER, K.J; GRANER, A. Geração e comparação de SSRs e SNPs derivados de EST na cevada (Hordeum vulgare L.). **Hereditas**, v. 135(2-3), p. 145-51, 2001.

KUMAR, M.; CHAUDHARY, V.; SHARMA, V.R.; SIROHI, U.; SINGH, J. Advances in biochemical and molecular marker techniques and their applicantions in genetic studiesof orchid: A review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 6(6), p. 806-822, 2018.

LANDER, E.S; LINTON, L.M; BIRREN, B; NUSBAUM, C; ZODY, M.C; BALDWIN, J; DEVON, K; DEWAR, K; DOYLE, M; FITZHUGH, W; FUNKE, R; GAGE, D; HARRIS, K; HEAFORD, A; HOWLAND, J; KANN, L; LEHOCZKY, J; LEVINE, R; MCEWAN, P; MCKERNAN, K; MELDRIM, J; MESIROV, J.P; MIRANDA, C; MORRIS, W; NAYLOR, J; RAYMOND, C; ROSE, S.A; SOUGNEZ, C; STANGE-THOMANN, Y; STOJANOVIC, N. Consórcio Internacional de Sequenciamento de Genoma Humano. Sequenciamento inicial e análise do genoma humano. **Natureza**, v. 412(6846), p. 565, 2001.

LAVOR, P; BERG, C.V.D; JACOBI, C.M; CARMO, F.F; VERSIEUX L.M. Population genetics of the endemic and endangered *Vriesea minarum* (Bromeliaceae) in the Iron Quadrangle, Espinhaço Range, Brazil. **American Journal of Botany**, v. 101, p. 1167-1175, 2014.

LEE, S; CHOI, J; LEE, B; YU, J; LIM, C.E. Genetic diversity and structure of an endangered medicinal herb: implications for conservation. **AOB Plants,** 2018.

LEITE, A.M; LIMA, E.O; SOUZA, E.L; DINIZ, M.F.F.M; TRAJANO, V.N; MEDEIROS, I.A. Inhibitory effect of β-pinene, α-pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43(1), p. 121-126, 2007.

LEVY, S; SUTTON, G; NG, P.C; FEUK, L; HALPERN, A.L; WALENZ, B.P; AXELROD, N; HUANG, J; KIRKNESS, E.F; DENISOV, G; LIN, Y; MACDONALD, J.R; PANG, A.W; SHAGO, M; STOCKWELL, T.B; TSIAMOURI, A; BAFNA, V; BANSAL, V; KRAVITZ, S.A; BUSAM, D.A; BEESON, K.Y; MCINTOSH, T.C; REMINGTON, K.A; ABRIL, J.F; GILL, J; BORMAN, J; ROGERS, Y.H; FRAZIER, M.E; SCHERER, S.W; STRAUSBERG,

R.L; VENTER, J.C. The diploid genome sequence of an individual human. **PLoS Biology**, v. 5(10), e254, 2007.

LI, Y.C; KOROL, A.B; FAHIMA, T; NEVO, E. Microsatélites dentro dos genes: estrutura, função e evolução. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21(6), p. 991-1007, 2004.

LIU, Z; YUE, W; LI, D; WANG, R.R; KONG, X; LU, K; WANG, G; DONG, Y; JIN, W; ZHANG, X. Structure and dynamics of retrotransposons at wheat centromeres and pericentromeres. **Chromosoma**, v. 117(5), p. 445-56, 2008.

LISCH, D. How important are transposons for plant evolution? **Nature Reviews Genetics**, v. 14(1), p. 49-61, 2013.

LLORENS, C; MUÑOZ-POMER, A; BERNAD, L; BOTELLA, H; MOYA, A. Dinâmicas de rede de retroelements eucarióticos ltr além de árvores filogenéticas. **Biology Direct**, v. 4, p. 41, 2009.

LLORENS, C; FUTAMI, R; COVELLI, L. The Gypsy database (GyDB) of mobile genetic elements: release 2.0. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. D70-D74, 2011.

LOEUILLE, B; SEMIR, J; LOHMANN, L.G; PIRANI, J.R. A. Phylogenetic analysis of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae) based on molecular and morphological data. **Systematic Botany**, v. 40(1), p. 299–315, 2015.

LÓPEZ-FLORES, I; GARRIDO-RAMOS, M.A. O conteúdo repetitivo de DNA dos genomas eucarióticos. **Genome Dynamics**, v. 7, p. 1-28, 2012.

LUQUE, R.E.M; LUIZA, N; SEMIR, J. Anatomia foliar de *Lychnophora* Mart. (Vernonieae: Asteraceae). **Plantula**, v. 2(3), p. 141-152, 1999.

LUSA, M.G; LOEUILLE, B.F.P; CICCARELLI, D; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Evolution of stem and leaf structural diversity: a case study in Lychnophorinae (Asteraceae). **Botany Review**, v. 4, p. 017-9191, 2018.

MACAS, J; NEUMANN, P; NAVRÁTILOVÁ, A. DNA repetitivo no genoma da ervilha (*Pisum sativum* L.): caracterização abrangente utilizando 454 sequenciamento e comparação com soja e medicago truncatula. **Genômica BMC**, v. 8, p. 427, 2007.

MAKAREVITCH, I; WATERS, A.J; WEST, P.T; STITZER, M; HIRSCH, C.N; ROSS-IBARRA, J. Elementos transposáveis contribuem para a ativação de genes de milho em resposta ao estresse abiótico. **PLoS Genetics**, v. 11, e1004915, 2015.

MARQUES, A.P.S. **Diversidade química e genética de populações naturais de *Lychnophora pinaster* Mart**. Tese. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Instituto de Biociências, Botucatu – SP, p. 125, 2020.

MARQUES, A.P.S; BONFIM, F.P.G; SANTOS, D.G.P.O; LIMA, M.P; SEMIR, J; MARTINS, E.R; ZUCCHI, M.I; HANTAO, L.W; SAWAYA, A.C.H.F; MARQUES, M.O.M. Chemical diversity of essential oils from the Brazilian medicinal plant *Lychnophora pinaster* Mart from different environments. **Industrial Crops & Products**, 156, 112856. 2020.

MARTINSEN, L; VENANZETTI, F; JOHNSEN, A; SBORDONI, V; BACHMANN, L. Evolução molecular da família de DNA de satélite pDo500 em grilos das cavernas *Dolichopoda* (Rhaphidophoridae). **BMC Evolution and Biology**, v. 28(9), p. 301, 2009.

MASON, A.S. **SSR Genotyping**. In: Batley J, editor. *Planta Genotipagem*. Springer; Nova Iorque, NY, p. 77-89, 2015.

MELO JR, A.F; CARVALHO, D.F; VIEIRA, F; OLIVEIRA, D.A. Spatial genetic structure in natural populations of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) in North of the Minas Gerais, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 205-209, 2012.

MENDONÇA, M. P; LINS, L.V. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas – Fundação Zoo-botânica de Belo Horizonte, p. 157, 2000.

MEŠTROVIĆ, N; MRAVINAC, B; PAVLEK, M; VOJVODA-ZELJKO, T; ŠATOVIĆ, E; PLOHL, M. Ligações estruturais e funcionais entre elementos transposáveis e DNAs via satélite. **Cromossome Research**, v. 23(3), p. 583-96, 2015.

MHIRI, C; PARISOD, C; DANIEL, J; PETIT, M; LIM, K.Y; DORLHAC DE BORNE, F; KOVARIK, A; LEITCH, A.R; GRANDBASTIEN, M.A. As cargas de elementos transposáveis dos pais influenciam sua dinâmica em híbridos e aotostraploides jovens nicotiana. **Novo Fitol**, v. 221(3), p. 1619-1633, 2019.

MIAH, G; RAFII, M.Y; ISMAIL, M.R; PUTEH, A.B; RAHIM, H.A; ISLAM, K.H.N; LATIF, M.A. A review of microsatellite markers and their applications in rice breeding programs to improve blast disease resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 22499-22528, 2013.

MIGA, K.H. Completing the human genome: The progress and challenge of satellite DNA assembly. **Chromosome Research**, v. 23, p. 421–426, 2015.

MISRA, A; SRIVASTAVA, S; KUMAR, S; SHUKLA, P.K; KUMAR, M; AGRAWAL, P.K; BARIK, S.K. Estudos quimiotaxonômicos sobre população natural de *Gloriosa superba* (L.) coletados da planície gangética (Índia) e sua atividade invitro antigout para a identificação de germoplasma de elite(s). **Journal of Etnopharmacology**, v. 249, p. 112387, 2019.

MONDINI, L; NOORANI, A; PAGNOTTA, M. A. Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools. **Diversity**, v. 1, p. 19-35, 2009.

MORGANTE, M; HANAFEY, M; POWELL, W. Microsatélites são preferencialmente associados com DNA não repetitivo em genomas vegetais. **Nature Genetics**, v. 30(2), p. 194-200, 2002.

MRAVINAC, B; PLOHL, M; UGARKOVIĆ, D. Preservação e conservação de alta sequência de DNAs por satélite sugerem restrições funcionais. **Journal Molecular and Evolution**, v. 61(4), p. 542-50, 2005.

MÜLLER, C.M.S; COELHO, G.B; DE PAULA, C; ARAÚJO, M.C.P.M; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Extrato etanol *Lychnophora pinaster* e seus componentes químicos amenizam hiperuricemia e inflamação relacionada. **Journal of Etnopharmacology**, v. 242, p. 112040, 2019.

MUSZEWSKA, A; HOFFMAN-SOMMER, M; GRYNBERG, M. LTR retrotransposons em fungos. **PLos ONE**, v. 6(12), e29425, 2011.

NADEEM, M.A; NAWAZ, M.A; SHAHID, M.Q; DOĞAN, Y; COMERTPAY, G; YILDIZ, M. DNA marcadores moleculares na reprodução de plantas: status atual e avanços recentes na seleção genômica e edição de genomas. **Biotecnologia. Biotecnologia. Equipe**, v. 32, p. 261-285, 2018.

NÄSLUND, K; SAETRE, P; VON SALOMÉ, J; BERGSTRÖM, TF; JAREBORG, N; JAZIN, E. Predição genômica de VNTRs humanos. **Genômica**, v. 85(1), p. 24-35, 2005.

NEUMANN, P; NOVÁK, P; HOŠTÁKOVÁ, N; MACAS, J. Levantamento sistemático de plantas LTR-retrotransposons elucida relações filogenéticas de seus domínios de poliproteínas e fornece uma referência para classificação de elementos. **DNA Móvel**, v. 10(1), p. 1, 2019.

NEVO, E. Evolução da diversidade genoma-phenome sob estresse ambiental. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 98(11), p. 6233-40, 2001.

OCHOA CRUZ, E.A; CRUZ, G.M.Q; VIEIRA, A.P; VAN SLUYS, M.A. Virus-like attachment sites as structural landmarks of plants retrotransposons. **Mobile DNA**, v. 7, p. 14, 2016.

OLIVEIRA, A.B; SAÚDE, D.A; PERRY, K.S.P; DUARTE, D.S; RASLAN, D.S; BOAVENTURA, M.A.D; CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytotherapy Research**, v. 10(4), p. 292-295, 1996.

OLIVER, K.R; MCCOMB, J.A; GREENE, W.K. Elementos transposáveis: poderosos contribuintes para a evolução e diversidade do angiosperm. **Genome Biology and Evolution**, v. 5(10), p. 1886-901, 2013.

OLSEN, K.M. SNPs, SSRs e inferências sobre a origem da mandioca. **Plant Molecular Biology**, v. 56(4), p. 517-26, 2004.

OROZCO-ARIAS, S; ISAZA, G; GUYOT, R. Retrotransposons em Genomas Vegetais: Estrutura, Identificação e Classificação através de Bioinformática e Machine Learning. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20(15), p. 3837, 2019.

PATERSON, A.H; BOWERS, J.E; BRUGGMANN, R; DUBCHAK, I; GRIMWOOD, J; GUNDLACH, H. O genoma bicolor do Sorgo e a diversificação das gramíneas. **Natureza**, v. 457, p. 551-556, 2009.

PAVARINI, D.P; SEMIR, J; LOPES, J.L.C; SILVA, R.R; LOPES, N.P. Time-Scale Shifting of Volatile Semiochemical Levels in Wild Type *Lychnophora ericoides* (Brazilian arnica) and Pollinator Records. **Planta Medica**, v. 87, p. 101-112, 2020.

PÉREZ-JIMÉNEZ, M; BESNARD, G; DORADO, G; HERNANDEZ, P. Varietal tracing de azeites virgens baseados no perfil de variação de DNA plastida. **PLos ONE**, v. 8(8):e70507, 2013.

PINHEIRO, P.T.S.G. **Avaliação da atividade anti-inflamatória de formulações de uso tópico contendo extratos de *Lychnophora pinaster* e *Symphytum officinale***. UFOP, Ouro Preto, 2010.

PINHEIRO, M.D; MAGALHAES, R.M; TORRES, D. M; CAVALCANTE, R.C; MOTA, F.S.X; COELHO, E.M.A.O; MOREIRA, H.P; LIMA, G.C; ARAUJO, P.C.D; CARDOSO, J.H.L; DE SOUZA, A.N.C; DINIZ, L.R.L. Gastroprotective effect of alpha-pinene and its correlation with antiulcerogenic activity of essential oils obtained from *Hyptis* species. **Pharmacognosy Magazine**, v. 11(41), p. 123-130, 2015.

PHUMICHAI, C; PHUMICHAI, T; WONGKAEW, A. Novos marcadores de microsatélite de cloroplasto (cpSSR) para avaliação da diversidade genética da borracha *Hevea* cultivada e selvagem. **Plant Molecular Biology Report**, v. 33, p. 1486-1498, 2015.

PORTELLA, R.O. **Efeito da altitude na diversidade química e genética de *Lychnophora pinaster* Mart**. Tese. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Instituto de Biociências, Botucatu, p. 39, 2021.

RAFALSKI A. Aplicações de polimorfismos de nucleotídeos únicos na genética das culturas. Curr. Opin, opin. **Plant Biology**, v. 5(2), p. 94-100, 2002.

RAHMAN, A.Y; USHARRAJ, A.O; MISRA, B.B; THOTTATHIL, G.P; JAYASEKARAN, K; FENG, Y; HOU, S; ONG, S.Y; NG, FL; LEE, LS; TAN HS, SAKAFF MK, TEH, BS; KHOO, B.F; BADAI, S.S; AZIZ, N.A; YURYEV, A; KNUDSEN, B; DIONNE-LAPORTE, A; MCHUNU, N.P; YU, Q; LANGSTON, B.J; FREITAS, T.A; YOUNG, A.G; CHEN, R; WANG, L; NAJIMUDIN, N; SAITO, J.A; ALAM, M. Rascunho sequência de genoma da seringueira *Hevea brasiliensis*. **Genômica BMC**, v. 14, p. 75, 2013.

RAVINDRAN, S. Barbara McClintock and the discovery of jumping genes. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 109, p. 20198-20199, 2012.

RAYBURN, A.L; BIRADAR, D.P; BULLOCK, D.G; MCMURPHY, L.M. Conteúdo de DNA nuclear em híbridos F1 de milho. **Heredidade**, v. 70, p. 294-300, 1993.

REIS, E.S; PINTO, J.E.B.P; BERTOLUCCI, S.K.V; CORRÊA, R.M; PAULA, J.R.S. Seasonal variation in essential oils of *Lychnophora pinaster* Mart. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22(2), p. 147-149, 2010.

RESENDE, J.M.V. **Óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.: caracterização química, atividade antibacteriana, antifúngica, antiocratoxigênica e hemolítica**. Tese. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ROBINSON, H. Generic and Subtribal Classification of American Vernonieae. **Smithsonian Contribuitions of Botany**, v. 89, p. 1-116, 1999.

ROBLES, F; DE LA HERRÁN, R; LUDWIG, A; RUIZ REJÓN, C; RUIZ REJÓN, M; GARRIDO-RAMOS, M.A. Evolução de DNAs satélites antigos em genomas de esturjão. **Gene**, v. 338(1), p. 133-42, 2004.

RODRIGUES, V.E.G; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência Agrotecnica**, v. 25(1), p.102-123, 2001.

RUIZ-RUANO, F.J; LÓPEZ-LEÓN, M.D; CABRERO, J; CAMACHO, J.P.M. High-throughput analysis of the satellitome illuminates satellite DNA evolution. **Scientific Reports**, v. 6, p. 28333, 2016.

RUKMANGADA, M.S; SUMATHY, R; NAIK, V.G. Anotação funcional de mulberry (Morus spp.) transcriptome, expressão diferencial de genes relacionados ao crescimento e identificação de SSRs putativas, SNPs e InDels. **Molecular Biology Reports**, v. 46(6), p. 6421-6434, 2019.

SAHEBI, M; HANAFI, M.M; VAN WIJNEN, A.J; RICE, D; RAFII, M.Y; AZIZI, P; OSMAN, M; TAHERI, S; BAKAR, M.F.A; ISA, M.N.M; NOOR, Y.M. Contribuição de elementos transposáveis no genoma da planta. **Gene**, v. 665, p. 155-166, 2018.

SANTOS, M.D; GOBBO-NETO, D; ALBERELLA, L; SOUZA, G.E.P; LOPES, N.P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 545-549, 2005.

SARKAR, D; MAHATO, A.K; SATYA, P; KUNDU, A; SINGH, S; JAYASWAL, P.K. O genoma do rascunho de *Corchorus olitorius* cv. JRO-524 (Navin). **Genome Data**, v. 12, p. 151-154, 2017.

SAÚDE, D.A; RASLAN, D.S; DE SOUZA, J.D; DE OLIVEIRA, A.B. Constituintes das partes aéreas de *Lychnophora trichocarpha*. **Fitoterapia**, v. 69, p. 90-91, 1998.

SCHNABLE, P.S; WARE, D; FULTON, R.S; STEIN, J.C; WEI, F; PASTERNAK, S. O genoma do milho B73: complexidade, diversidade e dinâmica. **Ciência**, v. 326, p. 1112-1115, 2009.

SCHULTZ-BIPONTINUS, C.H. *Lychnophora*. **Journal Pollichia**, v. 18(19), p. 157-190, 1863.

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae: Compositae)**. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, Campinas, p. 515, 1991.

SEMIR, J; REZENDE, A.R; MONGE, M; LOPES, N.P. **As arnicas endêmicas das Serras do Brasil: Uma visão sobre a biologia e a química das espécies de *Lychnophora* (Asteraceae).** Ouro Branco (MG): UFOP, p. 212, 2011.

SILVA, L.M; ALQUINI, Y; CAVALLET, V.J. Inter-relacoes entre a anatomia vegetal e a producao vegetal. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19(1), p. 183-194, 2005.

SILVA, A.C.R; LOPES, P.M; AZEVEDO, M.M.B; COSTA, D.C.M; ALVIANO, C.S; ALVIANO, D.S. Biological activities of α-pinene and β-pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, 2012.

SILVA, P.S.S. **Caracterização da composição química dos óleos essenciais de *Lychnophora pinaster* Mart. em função da sazonalidade**. Dissertação. Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, p. 167, 2013.

SILVA, P.S.S. **Caracterização da diversidade genética e composição química de Lychnophora pinaster Mart.** Tese. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu – SP. 178p. 2016.

SILVEIRA, D; WAGNER, H; CHIARI, E; LOMBARDI, J.A; ASSUNÇÃO, A.C; OLIVEIRA, A.B; RASLAN. D.S. Biological activity of the aqueous extract of *Lychnophora pinaster* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15(4), p. 294-297, 2005a.

SILVEIRA, D; SOUZA FILHO, J.D; OLIVEIRA, A.B; RASLAN, D.S. Lychnophoric acid from *Lychnophora pinaster*: a complete and unequivocal assignment by NMR spectroscopy. **Eclética Química**, v. 30(1), p. 37-41, 2005b.

SINGH, N; CHOUDHURY, D.R; SINGH, A.K; KUMAR, S; SRINIVASAN, K; TYAGI, R.K; SINGH, N.K; SINGH, R. Comparação de marcadores SSR e SNP na estimativa da diversidade genética e estrutura populacional das variedades de arroz indiano. **PLos ONE**, (12):e84136, 2013.

SOUZA, M.R; DE PAULA, C.A; RESENDE, M.L.P; GRABE-GUIMARÃES, A; FILHO, J.D.S; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Base farmacológica para uso de *Lychnophora trichocarpha* na artrite gouty: efeitos anti-hiperuricemicos e anti-inflamatórios de seu extrato, fração e constituintes. **Journal of Etnopharmacology**, v. 142(3), p. 845-50, 2012.

STRASSBURG, B.B.N; BROOKS, T; FELTRAN-BARBIERI, R; IRIBARREM, A; CROUZEILLES, R; LOYOLA, R; LATAWIEC, A.E; OLIVEIRA FILHO, F.J.B; SCARAMUZZA, C.A.M; SCARANO, F.R; SOARES-FILHO, B; BALMFORD, A. Moment of truth for the Cerrado hotspot. **Nature Ecology &Evolution**, v. 1, p. 1-3, 2017.

SUJIWATTANARAT, P; THAPANA, W; SRIKULNATH, K; HIRAI, Y; HIRAI, H; KOGA, A. Estrutura de repetição de alta ordem no DNA do satélite alfa ocorre em macacos do Novo Mundo e não se limita a hominoides. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10315, 2015.

SUMAN, K; NEERAJA, C.N; MADHUBABU, P; RATHOD, S; BEJ, S; JADHAV, K.P; KUMAR, J.A; CHAITANYA, U; PAWAR, S.C; RANI, S.H; SUBBARAO, L.V; VOLETI, S.R. Identificação de RILs promissores para zinco de alto grão através de genótipo × Análise ambiental e QTL de Zinco de Grãos Estáveis Usando SSRs e SNPs em Arroz (*Oryza sativa* L.). **Fronties in Plant Science**, v. 12, p. 587482, 2021.

TANAKA, K; OSHIO, A; ENOKI, S; KUBO, A; TAKAHARA, Y. Population genetic diversity of the endemic plant subspecies Ixeridium dentatum subsp. nipponicum (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 73-78, 2014.

TAUTZ, D; RENZ, M. Sequências simples são componentes repetitivos onipresentes dos genomas eucarióticos. **Ácidos nucleicos Research**, v. 12(10), p. 4127-38, 1984.

THAKUR, J; PACKIARAJ, J; HENIKOFF, S. Sequence, Chromatin e Evolution of Satellite DNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22(9), p. 4309, 2021.

TRIGO, J.R. ET. AL. **Alcalóides pirrolizidínicos em senecio (*Asteraceae, Senecioneae*): importância taxonômica** (Resumo)**.** XXI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, p. 73, 1999.

VALLADÃO, F.N. **Estudo Fitoquímico de Folhas e Polpa de Fruto de *Maytenus salicifolia* (*Celastraceae*) e Análise Quimiotaxonômica em *Maytenus* sp.** Tese. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Instituto de Ciências Exatas – Belo Horizonte – MG, p. 149, 2011.

VANGELISTI, A; SIMONI, S; USAI, G; VENTIMIGLIA, M; NATALI, L; CAVALLINI, A; MASCAGNI, F; GIORDANI, T. (2021). Dinâmica de LTR-retrotransposon em genoma de figo comum (*Ficus carica* L.). **BMC Vegetal Biology**, v. 21(1), p. 221, 2021.

VELASCO, R; ZHARKIKH, A; AFFOURTIT, J; DHINGRA, A; CESTARO, A; KALYANARAMAN, A. O genoma da maçã domesticada (*Malus domestica* Borkh.). **Nature Genetic**, v. 42, p. 833-839, 2010.

VICIENT, C.M; CASACUBERTA, J.M. Impact of transposable elements on polyploid plant genomes. **Annals of Botany**, v. 120, p. 195-207, 2017.

VIEIRA, M.A.R. 2012. **Diversidade genética e constituição química dos óleos essenciais de populações de *Lychnophora ericoides* Mart. E *Lychnophora pinaster*** Mart. Tese. Faculdade de Ciências Agronômicas/Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p. 118, 2012.

VIEIRA, M.L; SANTINI, L; DINIZ, A.L; MUNHOZ, C.D.E.F. Marcadores microsatélites: o que significam e por que são tão úteis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39(3), p. 312-328, 2016.

VITTE, C; PANAUD, O. LTR retrotransposons e tamanho do genoma da planta de floração: surgimento do modelo de aumento/diminuição. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110(1-4), p. 91-107, 2005.

WANG, M.L; BARKLEY, N.A; JENKIS, T.M. Microsatellite markers in plants and insects. Part I: Applications of Biotechnology. **Genes, Genomes and Genomics**, v. 3(1), p. 1-14, 2009.

WANG, Y; SHAHID, M.Q; GHOURI, F; ERCIŞLI, S; BALOCH, F.S; NIE, F. Transcriptome análise e anotação: SNPs identificados a partir de cópia única anotado unigenes de três culturas de mirtilo poliploide. **PLos ONE**, v. 14(4):e0216299, 2019.

WICKER, T; SABOT, F; HUA-VAN, A; BENNETZEN, J.L; CAPY, P; CHALHOUB, B; FLAVELL, A; LEROY, P; MORGANTE, M; PANAUD, O; PAUX, E; SANMIGUEL, P; SCHULMAN, A.H. Um sistema de classificação unificado para elementos transposáveis eucarióticos. **Nature Reviews Genetics**, v. 8(12), p. 973-82, 2007.

WICKER, T; GUNDLACH, H; SPANNAGL, M; UAUY, C; BORRILL, P; RAMÍREZ-GONZÁLEZ, R.H; DE OLIVEIRA, R; MAYER, K.F.X; PAUX, E; CHOULET, F. Impact of transposable elements on genome structure and evolution in bread wheat. **Genome Biology**, v. 19(1), p. 103, 2018.

WILDER, J; HOLLOCHER, H. Mobile elements and the genesis ofmicrosatellites in dipterans. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 384–392, 2001.

XU, J; LIU, L; XU, Y; CHEN, C; RONG, T; ALI, F; ZHOU, S; WU, F; LIU, Y; WANG, J; CAO, M; LU, Y. Desenvolvimento e caracterização de marcadores repetitivos de sequência simples fornecendo cobertura em todo o genoma e alta resolução no milho. **DNA Research**, v. 20(5), p. 497-509, 2013.

YANG, X; YAN, J; SHAH, T; WARBURTON, M.L; LI, Q; LI, L; GAO, Y; CHAI, Y; FU, Z; ZHOU, Y; XU, S; BAI, G; MENG, Y; ZHENG, Y; LI, J. Análise genética e caracterização de um novo painel de mapeamento de associação de milho para dissecção quantitativa de loci. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121(3), p. 417-31, 2010.

YANG, X; XU, Y; SHAH, T; LI, H; HAN, Z; LI, J; YAN, J. Comparação de SSRs e SNPs na avaliação da relação genética no milho. **A Genetica**, v. 139(8), p. 1045-54, 2011.

ZHANG, L; YUAN, D; YU, S; LI, Z; CAO, Y; MIAO, Z; QIAN, H; TANG, K. Preferência de sequência simples se repete em regiões de codificação e não codificação de Arabidopsis thaliana. **Bioinformática**, (7), p. 1081-6, 2004.

ZHANG, Q.J; GAO, L.Z. Rapid and Recent Evolution of LTR Retrotransposons Drives Rice Genome Evolution During the Speciation of AA-Genome *Oryza* Species. **G3 (Bethesda)**, v. 7(6), p. 1875-1885, 2017.

ZHU, Y; STRASSMANN, J.E; QUELLER, D.C. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. **Genetics Research**, 76, p. 227-236, 2000.

## IV. CAPÍTULO I

# *Lychnophora pinaster* Mart.: Uma Revisão sobre aspectos: Morfológicos, Anatômicos, Químicos e Genéticos de Populações ocorrentes em Minas Gerais

## 1. INTRODUÇÃO

*Lychnophora pinaster* Mart. é uma espécie endêmica do estado de Minas Gerais, pertencente à família Asteraceae (Compositae) (SEMIR *et al*., 2011), circunscrita dentro da classe Equisetopsida, subclasse Magnoliidae e ordem Asterales (LOEUILLE *et al*., 2015). Seus representantes possuem microendemismo em algumas poucas áreas inseridas dentro da Serra do Espinhaço. Os indivíduos de *L. pinaster* se apresentam na forma de subarbustos eretos ramificados, pequenos arbustos ericoides e, mais raramente, como arbustos mais altos, variando entre 0,4m a 2,4m, podendo atingir até 3,6 m (SEMIR, 1991; SEMIR *et al*., 2011).

Esta espécie tem sido utilizada como planta medicinal por populações que vivem em diversas comunidades localizadas nos entornos da Serra do Espinhaço no estado de Minas Gerais onde *L. pinaster*, apresenta microendemismo. A planta fornece ramos, folhas e inflorescências que são utilizadas na medicina popular tradicional principalmente como agentes anti-inflamatório e cicatrizantes, analgésicos, contra pancadas e contusões, hematomas e até mesmo contra picadas de insetos (RODRIGUES, CARVALHO, 2001; HABER *et al*., 2009; SEMIR *et al*., 2011; SILVA, 2016).

Suas características morfológicas e anatômicas são folhas muito imbricadas e ascendentes na parte superior dos ramos com variação nas formas linear, linear oblonga, rosmarinióide e ericóide, sendo ocasionalmente longa e linear em forma de fita e margem revoluta. A venação é broquidódroma, face adaxial intensamente tomentosa canescente, nervura principal subvilosa quando jovem, subglabrescente permanecendo pouco pubérula até totalmente glabra quando velha, a sua textura varia entre rugosa e bulada podendo as vezes, se apresentarem lisas, com cutícula grossa. Com relação aos estômatos, as folhas são classificadas como hipoestomáticas com tricomas glandulares distribuídos em ambas as faces foliares. A epiderme é uniestratificada, com mesofilo compactado dorsiventralmente e feixes vasculares colaterais na face adaxial, ausência de esclereides, com células volumosas e quadrangulares cobertas por uma cutícula espessa. Na face abaxial das folhas as células da epiderme são achatadas e menos volumosas com cutícula delgada e ausência de criptas, sendo os estômatos, projetados acima das demais células epidérmicas (SEMIR, 1991; LUQUE *et al*., 1999; ISOBE, 2012; LUSA *et al*., 2018; ATHAYDE *et al*., 2019).

Por *L. pinaster* ser uma planta medicinal intensamente utilizada por populações locais (HABER *et al*., 2009; MARQUES, 2020), estudos buscam justificar a existência de compostos que comprovem o seu uso medicinal tradicional e possível potencial como agente quimioprofilático (FERRAZ-FILHA *et al*., 2012; ABREU *et al*., 2013; MARQUES, 2020). Assim, nos últimos anos algumas pesquisas têm abordado características do perfil químico da espécie, principalmente relacionado aos óleos essenciais de diversos indivíduos pertencentes às

populações que se localizam nas Regiões Sul (Campo das Vertentes), Sudeste (Região Metropolitana de Belo Horizonte) e Norte (Diamantina, Grão Mogol e Olhos D'Água) no estado de Minas Gerais, inseridas dentro da biorregião Província Sul Espinhaço, distribuídas pelos três distritos Quadrilátero Ferrífero, Platô de Diamantina e Distrito de Grão Mogol reconhecidos por Colli-Silva *et al*. (2019).

Os estudos mais representativos abordando características químicas de populações de *L. pinaster* no estado de Minas Gerais foram realizados por Haber (2008), que mapeou os perfis químicos dos óleos essenciais de quatro populações de *L. pinaster* ocorrentes no sul de Minas Gerais.

Em outros estudos, Vieira (2012) caracterizou a composição química dos óleos essenciais de duas populações de *L. pinaster* do Norte de Minas Gerais. Isobe (2012) e Silva (2013) avaliaram a influência da sazonalidade na composição química dos óleos essenciais de populações naturais de *L. pinaster* ocorrentes nos municípios de Lavras, Itumirim, Carrancas e Ingaí no sul do estado de Minas Gerais. Silva (2016), analisou os óleos essenciais de três populações, duas em Carrancas no sul de Minas Gerais e uma em Itabirito no sudeste do estado.

Em pesquisas mais recentes, Marques (2020) estudou a diversidade química de seis populações distribuídas entre o norte (Diamantina, Grão Mogol e Olhos D'Água) e a região Metropolitana de Belo Horizonte, e Portella (2021) avaliou o efeito da altitude na diversidade química dos óleos essenciais de cinco populações das diferentes regiões do estado. Todos estes estudos relataram uma grande diversidade química relacionada a presença de muitas substâncias componentes do óleo essencial em *L. pinaster* para as diversas populações analisadas.

Historicamente diversas espécies do gênero *Lychnophora* (Arnica brasileira) são utilizadas na medicina popular tradicional por povos que vivem nos entornos dos campos rupestres no Cerrado brasileiro. No Brasil, as espécies *L. ericoides* e *L. pinaster* são as espécies de *Lychnophora* mais utilizadas no tratamento de dores, inflamações, feridas e reumatismos devido a semelhanças destas espécies, com a espécie europeia (*Arnica montana* L.) que tem potencial medicinal reconhecido na Europa (CERQUEIRA *et al*., 1987; SEMIR *et al*., 2011; CHAVES *et al*., 2015; BERNARDES *et al*., 2021).

Pelo seu conhecido emprego na medicina popular tradicional, a espécie *L. pinaster* tem sido alvo de vários estudos e pesquisas que buscam testar a eficácia dos diversos extratos de indivíduos de populações ocorrentes na Serra do Espinhaço em Minas Gerais (SEMIR *et al*., 2011). Devido a uma grande variabilidade em sua composição química, *L. pinaster* apresenta diversos compostos químicos com ação biológica, em muitos bioensaios realizados com extratos das partes aéreas de *L. pinaster*, ficou comprovada a sua ação tripanocida eficaz contra

cepas Y tripomastigotas de *Triponosoma crizi* (CHIARI *et al*., 1996; OLIVEIRA *et al*., 1996; ALCÂNTARA *et al*., 2005; SILVEIRA *et al*., 2005a; SILVEIRA *et al*., 2005b; SILVA, 2016), atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (ABREU *et al*., 2011; SILVA, 2016), e ações anti-inflamatória, anti-hiperuricemica e antinociceptiva (GUZZO *et al*., 1996; CUPOLILO *et al*., 2007; GUZZO *et al*., 2008; FERREIRA, 2010; PINHEIRO, 2010; ABREU *et al*., 2013; BERNARDES *et al*., 2019; MULLER *et al.*, 2019; BARROS *et al.*, 2021; BERNARDES *et al*., 2021).

Estudos que abordaram as características e aspectos genéticos de populações de *L. pinaster* ocorrentes em áreas de campos rupestres em Minas Gerais, utilizando marcadores microssatélites - SSRs, foram realizados por Haber (2008) e Haber *et al.* (2009) com a caracterização da diversidade genética via marcadores microssatélites em populações de *L. pinaster* e o desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites para *L. pinaster* respectivamente, Vieira (2012) e Vieira *et al.* (2014) que avaliaram a diversidade genética de duas populações do norte de Minas Gerais e descreveram novos loci de *L. ericoides* e transferibilidade para *L. pinaster* e Silva (2016) que realizou a caracterização da diversidade genética de sete populações da espécie. Marques (2020) e Portella (2021), ambos conduziram estudos utilizando marcadores SNPs, que serão abordados nos dois próximos capítulos desta tese.

Diante do exposto, e levando em conta a importância medicinal popular de *L. pinaster* nas diversas regiões de sua ocorrência, bem como sua importância ecológica e seu *status* de conservação, este trabalho teve como objetivo, realizar uma revisão sobre características morfológicas, anatômicas, genéticas e componentes químicos dos óleos essenciais de populações de *L. pinaster* ocorrentes no estado de Minas Gerais, buscando futuramente, fornecer novos elementos e subsídios para futuros programas de conservação desta espécie ameaçada de extinção.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Levantamento de materiais botânicos – Histórico dos estudos realizados

Neste estudo foram tomados como objeto de revisão e posterior análise, amostras de populações naturais de *L. pinaster* pertencentes a 15 populações distribuídas por três diferentes regiões do estado de Minas Gerais (Figura 4).

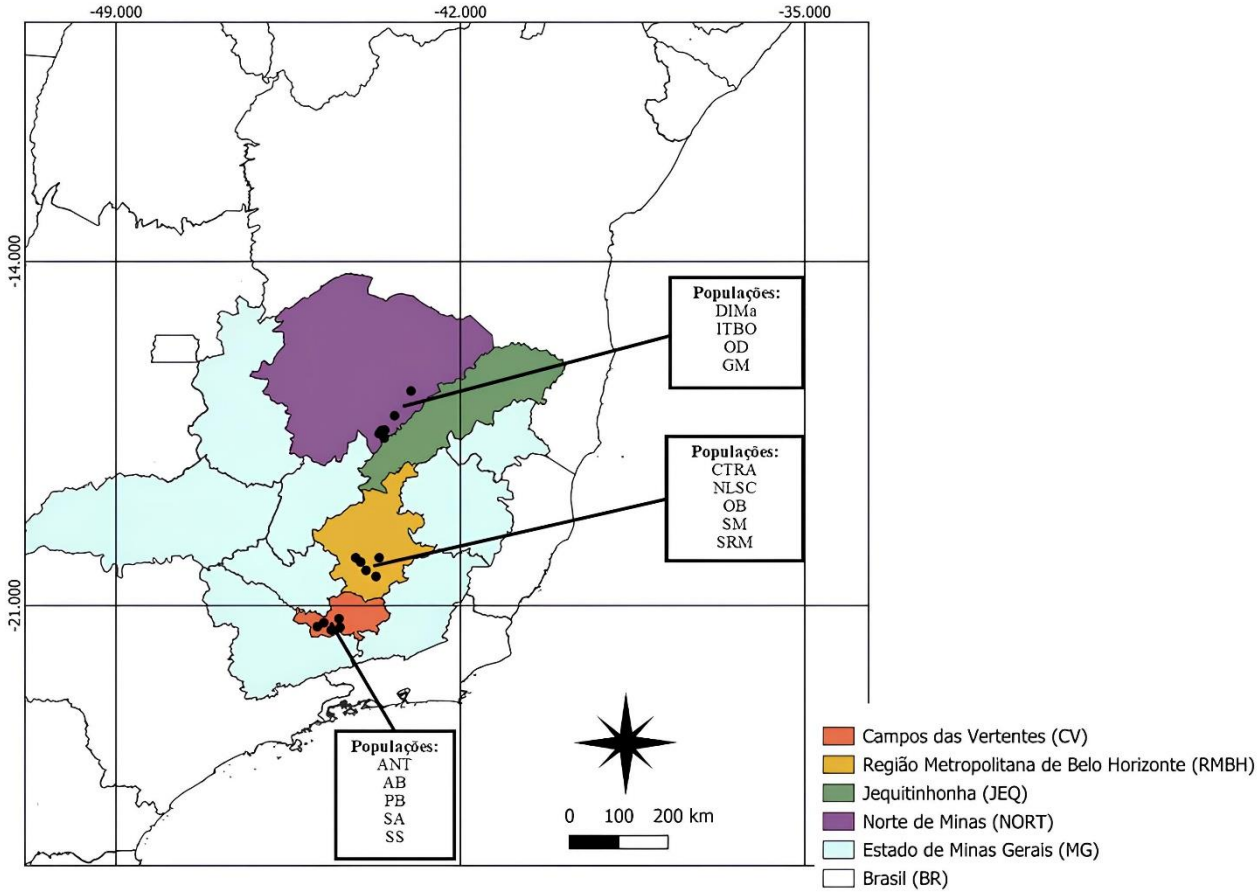



**Figura 4.** Distribuição geográfica das populações de *Lychnophora pinaster* Mart. no estado de Minas Gerais. **Região Norte de Minas Gerais:** Diamantina (DIMa), Itacambira/Botumirim (ITBO), Olhos D'Água (OD), Grão Mogol (GM); **Região Metropolitana de Belo Horizonte:** Caeté/Rio Acima (CTRA), Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC), Ouro Branco (OB), Serra da Moeda (SM), Serra do Rola Moça (SRM); **Campo das Vertentes:** Antena (ANT), Areia Branca (AB), Poço Bonito (PB), Serra da Arnica (SA), Serra do Sofá (SS).

Destas, 11 populações foram utilizadas em estudos que deram destaque para aspectos genéticos com a utilização de marcadores microssatélites (HABER *et al*., 2009; VIEIRA *et al*., 2014; SILVA, 2016), sendo que, o total de 15 populações amostradas para os estudos de composição química dos óleos essenciais (HABER, 2008; HABER *et al*., 2009; ISOBE, 2012; SILVA, 2013; VIEIRA *et al*., 2014; SILVA, 2016; MARQUES *et al*., 2020; MARQUES, 2020; PORTELLA, 2021), ou estudos que enfatizaram aspectos morfológicos (SEMIR *et al*., 2011) e anatômicos (ISOBE, 2012).

A coleta e análise das amostras foram autorizadas pelo Ministério do Meio Ambiente (ICMBio nº: 22772-6; SisGen/MMA: A01F803) e pelo Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais, Brasil (IEF- Autorização nº005/2017).

Os indivíduos de *L. pinaster* até então estudados foram coletados nos anos de 2004, 2005, 2011, 2012, 2015 e 2017. Foram coletadas e armazenadas partes aéreas (ramos e folhas) de indivíduos pertencentes às populações de *L. pinaster*, provenientes de quatro mesorregiões inseridas na Província Sul Espinhaço: Distrito Grão Mogol e Platô de Diamantina (nos municípios de Grão Mogol, Olhos D'Água e na BR367, entre Olhos D'Água e Diamantina, esta última denominada como Diamantina); Quadrilátero Ferrífero (nas regiões da Serra da Moeda, Itabirito (população Ouro Branco), Nova Lima/Serra da Calçada e Caeté/Rio Acima) (COLLI-SILVA *et al*. 2019) e Região de Campos das Vertentes (Itumirim, Ingaí, Lavras e Carrancas) no estado de Minas Gerais.

Para cada população foi coletado material botânico fértil e em seguida, foram confeccionadas exsicatas, sendo estas depositadas nas coleções do Herbário do Instituto Agronômico (IAC) e no Herbário da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (UEC).

O material botânico foi identificado pelos especialistas do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), o Prof. Dr. João Semir e pelo Prof. Dr. Marcelo Monge Egea, as exsicatas foram depositadas sob os *vouchers* (UEC nº 208026, 208028, 208030, 208032, 208036, 208038) e (IAC nº 46585, 46586, 46587). As plantas amostradas nas coletas foram marcadas com etiquetas plásticas e tiveram suas coordenadas geográficas anotadas por grupos de indivíduos (altitude, latitude e longitude) por meio de GPS (Global Positioning System) (e-trex, Garmin®). O número de indivíduos por população variou em função de seu tamanho e das condições encontradas em campo.

### 2.2. Estudos que trataram aspectos morfológicos e anatômicos de *L. pinaster*

Foram levantados cinco estudos que tratam sobre aspectos morfológicos Semir (1991), Silva (1998), Luque *et al*. (1999), Semir *et al*. (2011) e Loeuille *et al*. (2015) de indivíduos pertencentes a populações de *L. pinaster* distribuídas ao longo da Província Sul Espinhaço no

estado de Minas Gerais, sendo aqueles que tratam sobre aspectos anatômicos Silva *et al*. (2005), Isobe (2012), Lusa *et al*. (2018) e Athayde *et al*. (2019) um total de quatro estudos.

### 2.3. Histórico dos estudos que trataram dos componentes químicos dos óleos essenciais de *L. pinaster*

Em todos os estudos levantados nesta revisão, as análises da composição química dos óleos essenciais dos indivíduos das populações de *L. pinaster*, foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais Unidade de Fitoquímica do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico, Campinas - SP.

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger (CRAVEIRO *et al.*, 1981) por duas horas, e, posteriormente, armazenados em frascos de vidro transparente devidamente identificados e mantidos no freezer a 4 ºC até a análise da composição química, conduzida em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu, QP-5000), operando a 70 eV, dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 um), hélio como gás de arraste (1,7 mL/min), injetor a 240ºC, detector a 230ºC e o seguinte programa de temperatura: 80ºC – 150ºC, 6ºC/min; 150ºC – 190ºC, 2ºC/min; 190ºC – 280ºC, 10ºC/min; 280ºC (6 min.) e split 1/20.

As técnicas empregadas para as análises quantitativas e qualitativas da composição química dos óleos essenciais das 15 populações amostradas pelos diversos estudos desenvolvidos, foram para análises qualitativas o emprego de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e para as análises quantitativas, se empregou a cromatografia a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC) (HABER, 2008; ISOBE, 2012; SILVA, 2013, 2016; MARQUES, 2020; PORTELLA, 2021).

### 2.4. Estudos de diversidade e estrutura genética – Principais estudos realizados

Todos os estudos de caracterização genética das populações nativas de *L. pinaster* foram conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico (IAC). Os materiais vegetais (folhas jovens) coletados dos diferentes genótipos foram armazenados separadamente em freezer a -20ºC, triturados em nitrogênio líquido, em almofariz e armazenados para posterior extração do DNA. A extração de DNA foi realizada para um total de 186 indivíduos de *L. pinaster*, constantes nos estudos realizados por Haber (2008), Viera (2012), Vieira *et al*. (2014), Silva (2013, 2016), Marques (2020) e Portella *et al*. (2021), dentre os materiais, foram selecionadas porções de 10 mg de material vegetal previamente triturado em nitrogênio líquido, momentos

antes de iniciar o procedimento de extração do DNA, utilizando protocolo CTAB (DOYLE e DOYLE, 1990).

**2.5. Principais análises de material genético empregadas nos estudos revisados**

Para todos os estudos que analisaram diversidade e estrutura genética de populações de *L. pinaster*, foram realizadas análises estatísticas para determinação da diversidade genética do material genético por meio dos *Software* GDA e o pacote DIVERSITY implementado na plataforma R v. 3.1.2 e os *Softwares* FSTAT v. 2.9.3.2 e GENEPOP v. 3.1 (LEWIS, ZAYKIN, 2001; KEENAN *et al.*, 2013; GOUDET, 1995; RAYMOND, ROUSSET, 1995). Para a determinação de estrutura populacional, foram empregados os seguintes *Softwares*: FSTAT v. 2.9.3.2 (GOUDET, 1995), o pacote HIERFSTAT implementado na plataforma R (GOUDET, 1995) e o *Software* ARLEQUIN v. 3.1 (EXCOFFIER *et al.*, 2005), além de serem utilizados o programa STRUCTURE v. 2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000), o *software* online STRUCTURE HARVESTER v. 0.6.93 (EARL, VON HOLDT, 2012), o *software* PROGRID v. 1.1 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o ADEGENET (JOMBART, 2008) da plataforma R v.3.1.2. e o *software* BOTTLENECK v. 1. 2. (CORNUET, LUIKART, 1996; PIRY *et al.*, 1999).

As localidades e coordenadas geográficas, os códigos de cada população amostrada, bem como estudos já realizado e grupos de indivíduos estudados encontram-se na (Tabela 1).

**Tabela 1.** Populações, códigos das populações, regiões e altitude das áreas de distribuição dos indivíduos de *Lychnophora pinaster* e estudos já realizados para 15 populações no estado de Minas Gerais, Brasil.

| População | Código/estudo | Região | Altitude (m) | N° de indivíduos | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Genética | | Química | Morfologia | Herbário |
| | | | | SSR | SNP | | | |
| Areia branca (Carrancas-MG) | AB Silva (2016) Marques (2020) Portella (2021) | Campo das Vertentes | 1143 | 25 | 17 | 20 | 10 | IAC |
| Estrada Real (Carrancas-MG) | ERE Isobe (2012) Haber (2008) | Campo das Vertentes | 1135-1150 | 19* | - | 26 | 10 | IAC |
| Caeté/Rio Acima (Rio Acima-MG) | CTRA Marques (2020) Portella (2021) | Metropolitana de BH | 1497 | - | 25 | 22 | 9 | BHCB/UEC |
| Diamantina (Diamantina-MG) | DIMa Vieira (2012) Marques (2020) Portella (2021) | Norte | 796 | 6 | 20 | 24 | 7 | BHCB/UEC |
| Olhos D'Água (Olhos D'Água-MG) | OD Vieira (2012) Marques (2020) Portella (2021) | Norte | 704 | 6 | 20 | 20 | 6 | UEC |
| Grão Mogol (Grão Mogol-MG) | GM Marques (2020) | Norte | 859 | - | 16 | 17 | 1 | UEC |

**Figura1.** Distribuição geográfica das populações de *Lychnophora pinaster* Mart. no estado de Minas Gerais.

**Tabela 1.** Continuação.

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Portella (2021) | | | | | | | |
| Nova Lima/Serra da Calçadas (Nova Lima-MG) | NLSC Marques (2020) Portella (2021) | Metropolitana de BH | 1450 | - | 25 | 23 | 4 | UEC |
| Serra da Arnica (Ingaí-MG) | SA Silva (2013) Silva (2016) Marques (2020) Portella (2021) | Campo das Vertentes | 1055 | 25 | 14 | 25 | 1 | UEC |
| Serra Branca (Carrancas-MG) | SB Silva (2013) Silva (2016) | Campo das Vertentes | 1124 | 25 | - | 25 | 17 | UEC |
| Serra da Moeda (Moeda-MG) | SM Marques (2020) Portella (2021) | Metropolitana de BH | 1366 | - | 19 | 17 | 7 | UEC |
| Serra do Salto (Carrancas-MG) | SSa Silva (2013) Silva (2016) | Campo das Vertentes | 1292 | 25 | - | 42 | 1 | UEC |
| Serra do Sofá (Itumirim-MG) | SSo Isobe (2012) Silva (2016) Marques (2020) Portella (2021) | Campo das Vertentes | 940 | 28 | 13 | 28 | 2 | UEC |
| Ouro Branco (Moeda/Itabirito-MG) | OB Silva (2016) | Metropolitana de BH | 1240 | 38 | - | 27 | 11 | UEC |
| Poço Bonito (Lavras/Ingaí-MG) | PB Haber (2008) Isobe (2012) Silva (2016) | Campo das Vertentes | 1044 | 20 | - | 20 | 2 | UEC/IAC |

**Tabela 1.** Continuação.

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Antena (Lavras-MG) | ANT Haber (2008) | Campo das Vertentes | 1245 | 18 | - | 20 | 6 | IAC |
| **Total:** | **15** | **3** | **--** | **235** | **159** | **356** | **98** | **--** |

AB: Areia Branca; CTRA: Caeté/Rio Acima; DIMa: Diamantina; OD: Olhos D'Água; GM: Grão Mogol; NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada; SA: Serra da Arnica: SB: Serra Branca; SM: Serra da Moeda; SSa: Serra do Salto; SSo: Serra do Sofá; OB: Ouro Branco; PB: Poço Bonito; ANT: Antena; ERE: Estrada Real.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Características morfológicas e anatômicas

Quanto às características morfológicas e anatômicas de *Lychnophora pinaster* Mart., neste trabalho de revisão bibliográfica buscamos potenciais características diagnósticas para uma precisa identificação de *L. pinaster*, espécie endêmica de uso medicinal popular no estado de Minas Gerais. Para isso, apresentamos uma série de caracteres morfológicos e anatômicos que podem auxiliar na diferenciação entre *L. pinaster* e *L. ericoides* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Diferenças morfológicas e anatômicas entre *L. ericoides* Mart. e *L. pinaster* Mart.

| *L. pinaster* | | *L. ericoides* | |
|---|---|---|---|
| **Morfológicas** | **Anatômicas** | **Morfológicas** | **Anatômicas** |
| Subarbustos eretos ou ramificados.<br>Arbustos ericoides.<br>Raramente arbustos candelabriformes. | Folhas hipoestomáticas.<br>Sem criptas na face abaxial.<br>Rugosas, bulada ou lisas. | Arbustos ou arvoreta candelabriformes. | Folha hipoestomáticas.<br>Criptas na face abaxial |
| Ramos delicados ou robustos. | Epiderme:<br>Uniestratificada.<br>Cutícula grossa.<br>Estômatos projetados acima das demais células epidérmicas. | Ramos robustos. | Epiderme:<br>Uniestratificada.<br>Cutícula grossa.<br>Estômatos presentes dentro de criptas na face abaxial da folha. |
| Folhas lineares ou linear-oblongas.<br>Rosmarinoides ou ericoides.<br>Longas lineares em forma de fitas. | | Folhas linear-lanceoladas, longamente lineares | |
| Inflorescências em glomérulos simples.<br>Folhosos.<br>Capítulos campanulados. | Tricomas tectores.<br>Glandulares. | Inflorescências em glomérulos simples.<br>Folhosos, hemisféricos.<br>Capítulos laxos. | Tricomas glandulares.<br>Tricomas tectores. |
| Flores lilases ou purpúrea. | Mesofilo compactado dorsiventralmente.<br>Sem esclereides. | Flores lilases ou purpúrea. | Mesofilo com parênquima aquífero.<br>Presença de esclereides. |
| Fruto cipsela obcônica, oval ou cilíndrica. | | Fruto cipsela angulosas. | |

Características obtidas de Semir (1991); Semir *et al*. (2011); Isobe (2012) e Athayde *et al*. (2019).

*Lychnophora pinaster* ocorre em algumas áreas na porção mineira da cadeia do espinhaço. Os indivíduos são subarbustos ramificados, arbustos ericoides, e arvoretas variando entre 0,4m a 2,4m, podendo atingir raramente 3,6 m (SEMIR, 1991, SEMIR *et al*., 2011) (Figura 5).

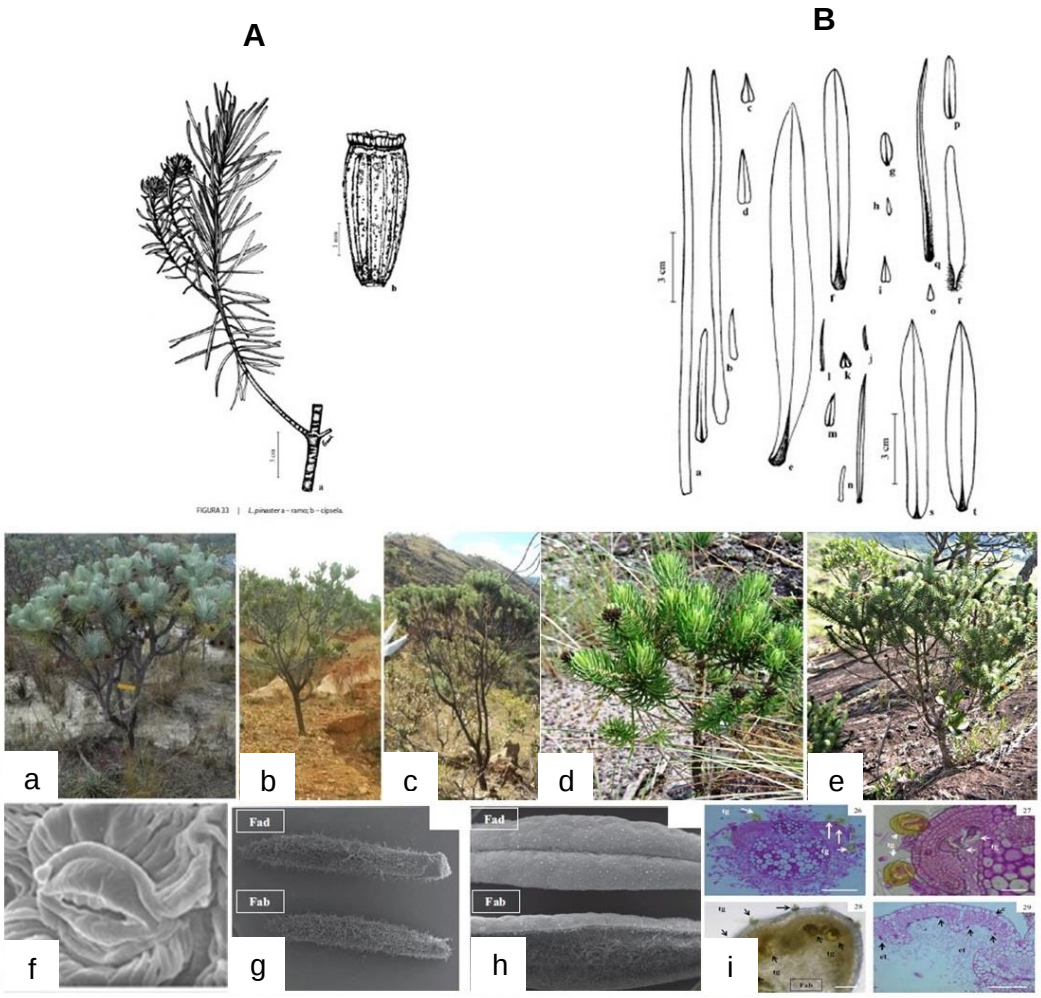



**Figura 5.** Hábitos, ilustrações e características micromorfológicas e anatômicas de indivíduos de *Lychnophora pinaster* Mart. (**A-B**). Ilustrações obtidas de Semir *et al*. (2011); (a-e). Imagens dos hábitos retiradas de Marques (2020); (g-i). Imagens de características anatômicas retiradas de Isobe (2012) e (f). Estômato, imagem obtida de Athayde *et al*. (2019).

Em termos de características morfológicas dos indivíduos pertencentes a *L. pinaster*, conforme já reportado na literatura (SEMIR, 1991, SEMIR *et al*. 2011), entende-se que estes apresentam um expressivo polimorfismo dada as condições e ambientes nos quais encontram-se as populações desta espécie. Nesta revisão foram analisados 98 materiais constantes dos estudos realizados por Haber (2008), Vieira (2012), Isobe (2012), Silva (2013, 2016), Marques (2020) e Portella *et al*. (2021). Todos estes indivíduos pertencentes a populações de *L. pinaster* ocorrentes nos distritos Distrito de Grão Mogol, Platô de Diamantina, Quadrilátero Ferrífero e Campo das Vertentes em Minas Gerais.

Foram analisados 40 exemplares depositados no Herbário do Instituto Agronômico – IAC, além de consultas realizadas às coleções online do Herbário da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP – UEC. A descrição morfológica foi complementada com informações descritas por Semir (1991) e Semir *et al*. (2011).

Quanto as características anatômicas de *L. pinaster*, seus representantes foram analisados exclusivamente para caracteres presentes nas folhas de indivíduos cultivados em campo experimental, estudo realizado por Isobe (2012), que confirma a natureza xeromórfica dos caracteres presentes em táxons do gênero *Lychnophora* (presentes em Semir (1991) e Luque *et al*. (1999)), estando estes obviamente, fortemente expressos nos indivíduos de *L. pinaster* analisados por Isobe (2012) e Athayde *et al*. (2019).

A descrição detalhada dos caracteres morfológicos e anatômicos para *L. pinaster* segue no texto abaixo, seguida de ilustração e tabela de marcadores morfológicos e anatômicos para representantes da espécie (Tabela 2).

### 3.2. Caracterização de *Lychnophora pinaster* Mart.

***Lychnophora pinaster*** Mart., Denkschr. Königl.-Baier. Bot. Ges. Regensburg 2: 152. t (1822).

**Sinônimos para *Lychnophora pinaster* Mart.**

*Vernonia pinaster* Less., Linnaea 4(2): 249 (1829).

*Vernonia trichocarpha* Spreng., Syst. Veg., ed. 16 [Sprengel] 3: 437 (1826).

*Lychnophora affinis* Gardner, Londres J. Bot. 5: 233 (1846).

*Lychnophora brunioides* var. *affinis* (Gardner) Baker, Fl. Bras. (Martius) 6(2): 155 (1873).

*Lychnophora rosmarinus* Pohl ex Sch.Bip., Jahresber. Pollichia 21: 361 (1864), nom. illeg.

*Lychnophora rosmarinus* var. *normalis* Sch.Bip., Jahresber. Pollíquia 21: 362 (-363) (1864).

*Lychnophora brunioides* var. *pinifolia* Mart., Fl. Bras. (Martius) 6(2): 155 (1873).

**MORFOLOGIA**

**Subarbustos** eretos, ramificados, arbustos ericoides, raramente arbustos candelabriformes, 0,4-2,4 (3,6) m (SEMIR 1991, SEMIR *et al*. 2011).

**Ramos** alternos, subverticilados, flexuosos, delicados, ou raramente robustos, densamente tomentosos, velutinos, subvilosos com coloração cinérea, nigriscente, canescente, as vezes ocracea ou atrofusca, cicatrizes triangulares, circulares, alveolares, subrombicas, com aspecto tesselado, em forma de ladrilho (SEMIR 1991, SEMIR *et al*. 2011).

**Folhas** imbricadas, ascendentes na parte superior dos ramos, patentes ou pouco reflexas abaixo, lineares, linear-oblongas, rosmarinoides, ou ericoides, longas lineares em forma de fitas, geralmente com 0,5cm a 6,0cm de comprimento, raramente podendo atingir até 12,0 cm de comprimento com 0,1cm de largura, base arredondada a auriculada, as vezes atenuadas, ápice obtuso ou pouco arredondado, raro pouco agudo, mucronado, margem revoluta, venação broquidódroma, face adaxial densamente tomentosa ou canescente, nervura principal subvilosa quando jovem, subglabrescente, pouco pubérula ou totalmente glabra quando velha, muito rugosa, bulada ou lisa as vezes, nervura principal alargada afinando da base para o ápice, subvilosas, face abaxial totalmente tomentosas e subvilosas, tricomas recobrindo todas as nervuras, nervura principal subquadrática, alada, sulcada longitudinalmente, evidentes e salientes (SEMIR 1991, SEMIR *et al*. 2011).

**Inflorescências** do tipo glomérulos, simples folhosos, glomérulos com capítulos campanulados, com 3 a 5 flores, 6,5mm a 8mm de comprimento, 3,0mm a 5,0mm de diâmetro, brácteas involucrais, 4 a 5 séries, as exteriores triangulares a subovais, as interiores mais lanceoladas, concavas, ápice obtuso a arredondado, amarronzado, margens inteiras, membranáceas, escariosas, pálidas, com superfície tomentosa quando jovem, glabrescentes, com 2,0mm a 8,0mm de comprimento, 1,0mm a 2,0mm de largura (SEMIR 1991, SEMIR *et al*. 2011).

**Flores** lilases a purpúreas, 0,8mm a 10,0mm de comprimento, lacínios glabros, glandulosos, com até 4,0mm de comprimento anteras alvas, 4,0mm de comprimento (SEMIR 1991, SEMIR *et al*. 2011).

**Fruto** do tipo cípsela, obcônica, oval cilíndrica, glabra ou glandulosa, olivácea a castanha, as vezes com manchas atropurpúreas, costados ou as vezes, com costas pouco evidentes, angulosos, 1,5mm a 30,0mm de comprimento, 0,8mm a 1,5mm de diâmetro, pápus externo quadrático, pouco coriforme com ápice trucado a ligeiramente eroso a crenulado com 0,5mm a 2,0mm de comprimento, série interna, as vezes pouco espiralada, com 10 a 15 páleas, com 5,5mm a 6,0mm de comprimento (SEMIR 1991, SEMIR *et al*. 2011).

**ANATOMIA DAS FOLHAS**

**Folhas:** apresentam cutícula grossa, são hipoestomáticas, com densa concentração de tricomas tectores presentes tanto em folhas jovens quanto nas folhas velhas.

**Tricomas:** tectores podem ser ramificados e glandulares, presentes nas faces adaxial e abaxial, os tricomas glandulares são bisseriados, compostos por 10 células, duas basais, seis no pedúnculo, duas formando a cabeça secretora com presença de cutícula delgada, em folhas jovens, na face adaxial, tricomas glandulares estão totalmente desenvolvidos, com secreção ativa e cutícula distendida, na face abaxial, os tricomas glandulares são menores, em fase final de desenvolvimento, em folhas velhas, na face adaxial, os tricomas glandulares apresentam cutícula rompida indicando o fim da atividade secretora, na face abaxial, os tricomas glandulares apresentam atividade secretora ativa (ISOBE, 2012, LUSA *et al*. 2018, ATHAYDE *et al*. 2019).

**Epiderme:** é uniestratificada, com mesofilo compactado dorsiventralmente, nervura média com feixes vasculares colaterais, esclereides ausentes, na face adaxial, a epiderme apresenta células volumosas e quadrangulares cobertas por uma cutícula espessa, na face abaxial, as células da epiderme são achatadas e menos volumosas com cutícula delgada, estômatos presentes, dispostos de forma projetada acima das demais células epidérmicas (ISOBE, 2012, LUSA *et al*. 2018, ATHAYDE *et al*. 2019).

**Comentários**

Nos comentários encontrados em Semir (1991) e Semir *et al*. (2011), *Lychnophora pinaster* é tratada como uma espécie muito semelhante à *Lychnophora ericoides*, sendo estas duas, confundidas frequentemente tanto em materiais disponíveis em coleções de herbários, ou em populações em ambiente natural. No entanto, uma série de características apresentadas por Semir *et al*. (2011), fornecem informações suficiente para distinguir as duas espécies.

Os representantes de *L. pinaster* apresentam características diagnósticas como: folha fortemente rugosas e buladas na face adaxial, indumento curto, tomentoso recobrindo totalmente a face abaxial, com nervuras salientes e evidentes em folhas mais velhas, muitas vezes, em folhas muito finas e revolutas, as nervuras secundárias são de difícil observação, sendo que sempre a nervura principal dorsal está sempre evidente (SEMIR, 1991, SEMIR *et al*. 2011).

*Lychnophora pinaster* apresenta polimorfismo em algumas características morfológicas, contudo, *L. pinaster* é diferenciada de *L. ericoides* por apresentar: folhas fortemente rugosas, ou buladas e ramos mais delgados e delicados. A espécie apresenta um conjunto de características para a anatomia foliar que podem auxiliar na sua distinção se

comparada à *L. ericoides*. Aqui são apresentadas como uma tentativa de esclarecer melhor algumas dúvidas e equívocos que ainda são cometidos por alguns autores ao tratar de morfos próximos a *L. pinaster*, algumas características anatômicas foliares para *L. pinaster*.

Assim, características anatômicas como: ausência de esclereides no tecido parenquimático, feixes vasculares colaterais, células da epiderme achatadas, criptas na face abaxiais das folhas ausentes e estômatos projetados acima das demais células epidérmicas (ISOBE, 2012, LUSA *et al*. 2018, ATHAYDE *et al*. 2019).

Os trabalhos realizados em campo para coletas de materiais botânicos, bem como observações do comportamento dos indivíduos dentro das populações de *L. pinaster* estudados até então, permitiram observar que os processos de floração e dispersão dos frutos desta espécie está acondicionada às características sazonais em função de mudanças climáticas, sendo seu período de floração, entre os meses de agosto e outubro, com dispersão dos frutos nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro (Figura 6).

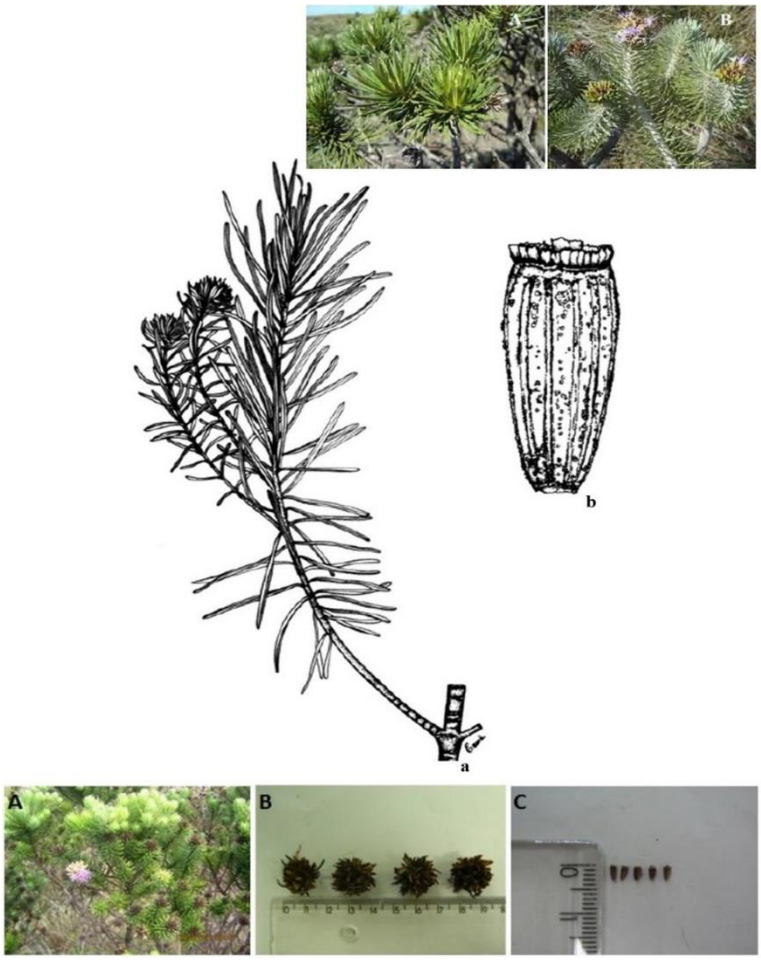



**Figura 6. (**a-b). Ilustração de ramo e fruto; (**A-C).** Imagens do hábito, glomérulos e frutos de *Lychnophora pinaster* Mert. (Ilustrações obtidas de Semir *et al*. (2011) e imagens obtidas de Silva (2013).

### 3.3. Aspectos da composição química dos óleos essenciais de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.

No total, 356 indivíduos foram estudados quanto a composição química dos óleos essenciais. Das 15 populações de *L. pinaster* estudadas, 3 populações oriundas da região do Campo das Vertentes (Sul) de Minas Gerais foram as que mais contribuíram em número de indivíduos analisados (Serra do Salto – SSa com 42 indivíduos, Serra do Sofá – SSo com 28 indivíduos e Estrada Real – ERE com 26 indivíduos cada) estando presentes nos estudos realizados por Silva (2013, 2016); Isobe (2012), Marques (2020), Portella (2021); Haber (2008) e Isobe (2012) respectivamente (Tabela 1).

As substâncias *trans*-cinamato de metila, cedr-8(15)-en-9-α-ol, *trans*-cariofileno, α-humuleno, 14-hidroxi-Z-cariofileno, 14-hidroxi-α-humuleno, ácido-14-oico-α-humuleno, α-pineno, 14-acetoxi-α-humuleno, 14-acetoxi-4,5-dehidro-cariofileno, esquamulosona, 1,7-diepi-α-cedrenal e (Z)-nerolidol, substâncias majoritárias presentes nos óleos essenciais das populações de *L. pinaster* ocorrentes nas mesorregiões Norte de Minas (Distrito de Grão Mogol/Platô de Diamantina), Jequitinhonha (Platô de Diamantina), região Metropolitana de Belo Horizonte (Quadrilátero Ferrífero) e Campo das Vertentes (Sul) no estado de Minas Gerais (Tabela 3).

**Tabela 3.** Substâncias majoritárias presentes nos óleos essenciais de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.

| Classe | Substâncias | Populações | Referências |
|---|---|---|---|
| **Fenilpropanóide** | *trans*-cinamato de metila | AB, ERE, SA, SB, SSa, SSo, PB e ANT | Haber (2008)<br>Isobe (2012)<br>Silva (2013)<br>Silva (2016)<br>Marques (2020)<br>Portella (2021) |
| **Sesquiterpeno** | cedr-8(15)-en-9-α-ol | CTRA, SA, SB e ANT | Haber (2008)<br>Isobe (2012)<br>Silva (2013)<br>Silva (2016)<br>Marques (2020)<br>Portella (2021) |
| **Sesquiterpeno** | *trans*-cariofileno | AB, ERE, SA, SB, SSa, SSo e PB | Haber (2008)<br>Isobe (2012)<br>Silva (2013)<br>Silva (2016)<br>Marques (2020)<br>Portella (2021) |
| **Sesquiterpenos** | α-humuleno | AB, ERE, ANT, DIMa, GM, NLSC, OB, OD, SA, SB, PB, SSa e SSo | Haber (2008)<br>Vieira (2012)<br>Isobe (2012)<br>Silva (2013)<br>Silva (2016)<br>Marques (2020)<br>Portella (2021) |
| **Sesquiterpeno** | 14-hidroxi-Z-cariofileno | CTRA e OB | Silva (2016)<br>Marques (2020)<br>Portella (2021) |
| **Sesquiterpeno** | 14-hidroxi-α-humuleno | CTRA, DIMa, GM, NLSC e OB | Vieira (2012)<br>Silva (2016)<br>Marques (2020)<br>Portella (2021) |
| **Sesquiterpeno** | ácido-14-oico- α-humuleno | DIMa e OD | Vieira (2012)<br>Silva (2016)<br>Marques (2020)<br>Portella (2021) |
| **Sesquiterpeno** | *trans*-cariofileno | GM | Marques (2020)<br>Portella (2021) |
| **Monoterpeno** | α-pineno | AB, CTRA, DIMa, GM, NLSC, OB, SA, SB, SM e SSa | Haber (2008)<br>Vieira (2012)<br>Isobe (2012)<br>Silva (2013)<br>Silva (2016)<br>Marques (2020) |

**Tabela 3.** Continuação.

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | Portella (2021) |
| **Sesquiterpeno** | 14-acetoxi-α-humuleno | CTRA, DIMa, NLSC e OD | Vieira (2012)<br>Silva (2016)<br>Marques (2020)<br>Portella (2021) |
| **Sesquiterpeno** | 14-acetoxi-4,5-dehidro-cariofileno | DIMa | Vieira (2012)<br>Marques (2020)<br>Portella (2021) |
| **Sesquiterpeno** | esquamulosona | OD | Vieira (2012)<br>Marques (2020)<br>Portella (2021) |
| **Sesquiterpeno** | 1,7-diepi-α-cedrenal | CTRA | Marques (2020)<br>Portella (2021) |
| **Sesquiterpeno** | (Z)-nerolidol | CTRA | Marques (2020)<br>Portella (2021) |

AB: Areia Branca; CTRA: Caeté/Rio Acima; DIMa: Diamantina; OD: Olhos D'Água; GM: Grão Mogol; NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada; SA: Serra da Arnica: SB: Serra Branca; SM: Serra da Moeda; SSa: Serra do Salto; SSo: Serra do Sofá; OB: Ouro Branco; PB: Poço Bonito; ANT: Antena; ERE: Estrada Real.

Os estudos já realizados apontaram para uma grande diversidade quanto a composição química dos óleos essenciais dentro e entre as populações de arnica nas mesorregiões de Minas Gerais, sendo um total de mais de 148 substâncias detectadas e muitas delas identificadas dentro das classes dos monoterpenos (19 substâncias), sesquiterpenos (32 substâncias), fenilpropanóides (2 substâncias) e outras classe com (7 substâncias).

As populações das mesorregiões Norte de Minas, Jequitinhonha e região Metropolitana de BH, diferem principalmente das populações dos Campo das Vertentes pela presença de compostos da classe dos sesquiterpenos como constituintes majoritários dos óleos essenciais das populações, sendo identificadas substâncias pertencentes aos grupos dos monoterpenos hidrocarbonetos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbonetos e sesquiterpenos oxigenados (MARQUES *et al.*, 2020; PORTELLA *et al.*, 2021). Em Haber (2008), Isobe (2012) e Silva (2013, 2016) são reportadas a presença de compostos da classe dos fenilpropanóides como substâncias majoritárias, sendo o *trans*-cinamato de metila a substância mais abundante para a maioria das populações ocorrentes nesta mesorregião.

A diversidade química dos óleos essenciais das populações de *L. pinaster* distribuídas pelas mesorregiões de Minas Gerais parece estar sendo influenciada principalmente pelas

condições ambientais particulares de cada região onde se encontram localizadas as populações estudadas até então. Sabe-se que fatores como altitude, condições climáticas, aspectos genéticos, constituição dos solos, além da pressão antrópica (HABER, 2008; ISOBE, 2012; SILVA, 2013, 2016; MARQUES *et al.,* 2020; PORTELLA *et al.,* 2021), estão ligados diretamente ao comportamento das populações de *L. pinaster*, e estes, podem estar influenciando de forma decisiva a composição química dos óleos essenciais dos indivíduos das populações nas diferentes mesorregiões.

O efeito destas condições podem ficar mais claros, quando observamos os resultados que foram encontrados por Haber (2008), Isobe (2012) e Silva (2013, 2016) para a constituição dos óleos essenciais das populações ocorrentes na mesorregião dos Campo das Vertentes (Sul) de Minas Gerais, que diferente das populações das mesorregiões Norte de Minas Gerais, Jequitinhonha e região Metropolitana de Belo Horizonte, apresentando como constituintes majoritários dos óleos essenciais, compostos da classe dos fenilpropanóides que apresenta via de síntese metabólica completamente diferente dos compostos da classe dos sesquiterpenos.

Sabe-se que a constituição química e a biossíntese de diversos metabólitos especializados dos óleos essenciais de *L. pinaster* podem ser influenciados por fatores ambientais ocasionando grandes variações tanto inter quanto intraespecífica (HABER, 2008), apesar da produção de metabolitos especializados ser controlada por aspectos genéticos e epigenéticos (TRAPP, CROTEAU, 2001), fatores como a distribuição geográfica por diferentes regiões, isolamento geográfico, condições de solo, temperatura e disponibilidade hídrica, além de aspectos fenológicos, influenciam na constituição química dos óleos essenciais de *L. pinaster* (HABER, 2008).

Todos estes fatores ambientais, unidos à aspectos genéticos, podem estar influenciando as vias de síntese metabólica dos metabólitos especializados precursores dos compostos presentes nos óleos essenciais de *L. pinaster*. As vias de síntese dos compostos da classe dos sesquiterpenos ocorre a partir da via do mevalonato no citosol, os monoterpenos são sintetizados a partir da via do metil eritritol fosfato (MEP) nos cloroplastos (PERES, 2004; JAKIEMIU, 2008; TAIZ, ZEIGER, 2009; MARQUES *et al.*, 2012; SILVA, 2016). Já a via metabólica dos fenilpropanóides, ocorre pela via do ácido chiquímico, com o precursor originando os aminoácidos aromáticos tirosina, triptofano e fenilalanina, com a ação da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) sobre a fenilalanina, com isso, dar-se origem ao ácido

cinâmico, que por reduções enzimáticas, origina os derivados fenilpropanóides (LORENZO *et al.*, 2002; JAKIEMIU, 2008; MARQUES *et al.*, 2012; SILVA, 2016) (Figura 7).

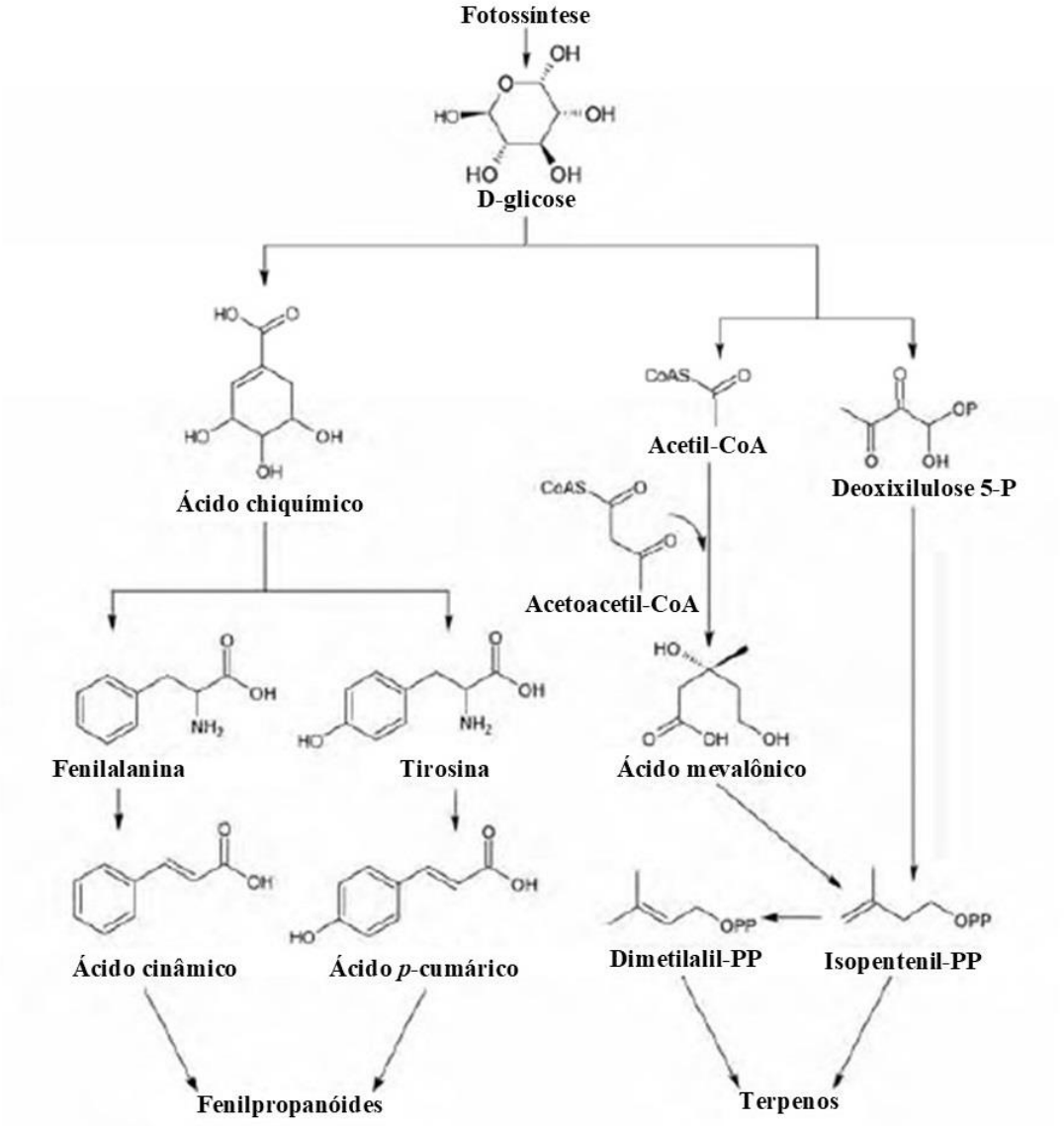



**Figura 7.** Vias metabólicas e substâncias sintetizadas partindo da glicose no metabolismo especializado de plantas. Extraído de DEWICK, 2002 e HABER, 2008.

### 3.4. Diversidade genética de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.: análises com marcadores microssatélites - SSRs

A diversidade genética pode ser definida e caracterizada de acordo com um índice que possa apresentar um conjunto de medidas quantitativas da variabilidade populacional que se reflete sobre o equilíbrio entre mutação e variação da perda genética. Assim, essa diversidade genética e sua distribuição, entre populações ou intrapopulacional, pode ser evidenciada através de micro-processos, tais como história demográfica das populações, seleção natural e fluxo gênico, sendo a sua diversidade, estimada por seus índices de estruturação (CARVALHO *et al*., 2019; MARQUES, 2020).

Estudos que abordaram exatamente características da diversidade genética e estruturação populacional, bem como a diversidade da composição química dos óleos essenciais de populações de *L. pinaster* distribuídas por três regiões do estado de Minas gerais (Norte: Gão Mogol, Diamantina e Olhos D'Água; Região Metropolitana de Belo Horizonte: Caeté/Rio Acima, Nova Lima Serra da Calçada, Ouro Branco e Serra da Moeda e Região do Campo das Vertentes: Antena, Areia Branca, Estrada Real, Poço Bonito, Serra da Arnica, Serra Branca, Serra do Salto e Serra do Sofá), basearam-se na análise dos marcadores moleculares do tipo microssatélite SSR (HABER, 2008; VIEIRA, 2012; SILVA, 2016).

Para as características genéticas das populações de *L. pinaster*, Haber (2008), Haber *et al*. (2009) e Silva (2016), utilizaram em análises, marcadores SSR, sendo um total de 46 indivíduos distribuídos por três populações (Antena, Estrada Real (ERE) e Poço Bonito – Haber (2008)), estudados pela primeira autora, onde que em Haber *et al*. (2009), foram descritos e testados 13 locos SSR, no estudo realizado por Silva (2016), foram utilizados parte do banco de dados criado por Haber (2008) acrescido das populações: AB, PB, OB, SA, SS, SSa, e SB, sendo analisados oito locos SSR para a genotipagem de 186 indivíduos de sete populações, seis da região dos Campo das Vertentes e uma da região Metropolitana de Belo Horizonte.

A diversidade genética e composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster* foi analisada por Vieira (2012), com duas populações ocorrentes na região Norte do estado de Minas Gerais (Diamantina e Olhos D'Água, analisando oito locos para o conjunto de indivíduos disponíveis para a realização do estudo).

Para as análises que verificaram as relações genéticas entre as populações de *L. pinaster* distribuídas pelas três regiões de Minas Gerais partindo de estudos utilizando SSRs, foram observadas principalmente, características como: Número Médio de Alelos por População (A); Alelos Raros ($A_R$); Alelos Privados ($A_P$); Heterozigosidade Observada ($H_O$); Heterozigosidade Esperada ($H_E$); Coeficiente de Endogamia ($F_{IS}$); Diversidade entre Populações ($F_{St}$); Teta de Weir e Cockerham ($\theta$); Smallf de Weir e Cockerham ($f$); Taxa de Cruzamento Aparente ($T_a$);

Riqueza Alélica ($R_A$); Desequilíbrio de Ligação (DL); Número Mais Provável de Clusters Genéticos (K); Intervalo de Confiança (IC); Modelo de Duas Fases (TPM); Modelo de Mutação Stepwise (SMM) e Número Mais Provável de Clusters (K) (Tabela 4).

Foi verificado para as heterozigosidades observada e esperada e o Número Médio de Alelos por População, valores variantes entre as populações em Haber (2008) com $H_O$ = 0,562 e $H_E$ = 0,625; A = 5,07; para Estrada Real - ERE, $H_O$ = 0,480 e $H_E$ = 0,573; A = 5,30; para Antena – ANT e $H_O$ = 0,538 e $H_E$ = 0,562; A = 3,61 para Poço Bonito, os índices de fixação para estas populações estudadas por Haber (2008), foram $F_{St}$ = 0,1008 para Estrada Real - ERE (AB*); $F_{St}$ = 0,1623 para Antena – ANT e $F_{St}$ = 0,0427 para Poço Bonito, para as populações do Norte de Minas Gerais estudadas por Vieira (2012), os valores médios tanto para a heterozigosidade observada quanto para a esperada foram $H_O$ = 0,222 e $H_E$ = 0,307, com índice de fixação de $F_{St}$ = 0,014 indicando uma baixa variabilidade genética entre as populações.

No estudo desenvolvido por Silva (2016) com número maior de populações (7 populações), encontra-se um conjunto mais robustos de informações como: número total de alelos ($A_T$) para cada população; número médio de alelos por população (A); alelos privados ($A_P$); alelos raros ($A_R$); heterozigosidade observada ($H_O$); heterozigosidade esperada ($H_E$); coeficiente de endogamia ($F_{St}$); taxa de cruzamento aparente ($T_a$) e riqueza alélica ($R_A$) (Tabela 4.).

As estimativas de índices de diversidade genética para as nove populações (três analisadas por Haber (2008) e sete por Silva (2016), sendo que a população Poço Bonito – PB está presente nos dois estudos) com emprego de SSRs, apresentaram heterozigosidade observada menor que a heterozigosidade esperada (Tabela 4). Isso foi relatado para outras duas populações de *L. pinaster* ocorrentes na região Norte do estado de Minas Gerais por Vieira *et al.* (2014), onde esta autora reportam uma maior variabilidade genética dentro das populações de *L. pinaster* estudadas.

### 3.5. Estrutura genética de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.: análises com marcadores microssatélites

A estrutura populacional de uma dada espécie pode ser dada e caracterizada por um conjunto de subpopulações intrínsecas à população, por meio da frequência de alelos diferentes de cada subpopulação ou até mesmo pelo seu grau de isolamento genético (CHAKRABORTY, 1993; SILVA, 2016), tratando-se assim, de uma atribuição aleatória dos alelos em dada escala espacial, resultante de uma dispersão limitada de indivíduos, seleção, deriva gênica e da própria história da população (ALBERTO *et al*., 2005; SILVA, 2016).

Nesse sentido, populações de *L. pinaster* foram testadas com o intuito de se investigar os graus de estruturação populacional de nove populações do estado de Minas Gerais. Em Haber (2008), foi constatado que a estrutura populacional naquele momento não se encontrava comprometida, em seu estudo o índice estimado de migrantes por geração encontra-se em 2,40, o que significa que há pelo menos dois migrantes por geração, o que indica estruturação. A endogamia encontrada por Haber (2008) foi considerada baixa, cerca de 8,99% de variação entre populações com $F_{st}$ = 0,0899, indicando que as três populações estudadas, sofreram diferenciação devido à antropização, sendo que este fator, não interferiu nos graus de estruturação das populações.

O índice que infere sobre o grau de diferenciação entre as populações ($F_{st}$) foi coerente de acordo com a distribuição geográfica das populações estudadas por Haber (2008), ficando evidenciado ainda, o quanto os alelos são compartilhados entre as populações de uma mesma região, notando-se assim, a intensidade do fluxo gênico entre as três populações estudadas por esta autora (Figura 8).

Silva (2016) realizou um estudo com maior abrangência de populações em detrimento ao estudo realizado por Haber (2008) e Vieira (2012). Utilizando sete populações, seis da região do Campo das Vertentes (AB, PB, SA, SB, SSa e SS) e uma da região Metropolitana de Belo Horizonte (OB), Silva (2016) analisou por meio dos marcadores SSRs, a diversidade e estruturação genética das sete populações de *L. pinaster*. Neste estudo, foi observado um grau de diferenciação entre as populações com $F_{st}$ = 0,266 com intervalo de confiança (IC) variante entre IC = 0,454 – 0,08, o que indicou uma grande variação genética entre as populações estudadas, estes índices foram corrigidos para a presença de alelos nulos, sendo o valor reduzido para 0,193.

Comparando o $F_{st}$ para cada população estudada (Figura 9), Silva (2016) observou que a diferenciação genética aumenta de forma demasiada, quando se compara a população Ouro Branco (OB) oriunda da região Metropolitana de Belo Horizonte, com as demais populações localizadas na região do Campo das Vertentes (Sul) do estado de Minas Gerais.

Quando comparadas todas as populações à Ouro Branco - OB, os valores de $F_{st}$ variou entre um mínimo de 0,3140 e um máximo de 0,3600 sendo a distância geográfica (cerca de aproximadamente 172 km) entre as populações. O provável fator que reflete essa grande diferenciação genética entre estas populações seria este aspecto de distribuição e localização geográfica que foi observado por Haber (2008) anteriormente onde as três populações de uma mesma região geográfica, apresentam grande compartilhamento de alelos e uma maior intensidade no fluxo gênico. No estudo realizado por Silva (2016) nota-se que a distância geográfica entre as populações dos Campo das Vertentes e a população Ouro Branco situada na

região Metropolitana de Belo Horizonte limita e restringe o fluxo gênico entre as sete populações estudadas, sendo observado o oposto quando os três menores valores de $F_{st}$ foram apresentados Serra Branca - SB x Areia Branca - AB com 0,0813, Serra do Sofá - SS x Serra da Arnica - SA com 0,0742 e Poço Bonito - PB x SS com 0,0971 indicando um maior fluxo gênico entre as populações que estão localizadas na mesma região geográfica (Figura 9).

Através de análise Bayesiana, tanto no estudo desenvolvido por Haber (2008) quanto no estudo realizado por Silva (2016), buscou-se determinar o mais provável número de *clusters* (K), sendo que em Haber (2008) foi tomado como parâmetro o (K = 3) (Figura 8), e em Silva (2016) o (K = 2) sendo que foram testado os *clusters* para (K = 3 e K = 4), onde podem ser observadas as relações genéticas entre as populações distribuídas de acordo com a sua localização geográfica (Figura 10).

**Tabela. 4.** Índices de diversidade genética das populações de *Lychnophora pinaster* Mart. analisadas em estudos realizados com base em marcadores microssatélites.

| **Parâmetros** | **Populações –** HABER (2008) | | | | | | | | | **Médias** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ANT | AB | ERE | PB | OB | SA | SB | SSa | SS | |
| $A_T$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A | 5,30 | - | 5,07 | 3,61 | - | - | - | - | - | 4,66 |
| $A_P$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| $A_R$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| $H_O$ | 0,480 | - | 0,562 | 0,538 | - | - | - | - | - | 0,526 |
| $H_E$ | 0,573 | - | 0,625 | 0,562 | - | - | - | - | - | 0,586 |
| $F_{IS}$ | 0,1623 | - | 0,1008 | 0,0427 | - | - | - | - | - | 0,1019 |
| $T_a$ | 0,72 | - | 0,82 | 0,92 | - | - | - | - | - | 0,82 |

$A_T$: número total de alelos; A: número médio de alelos por população; $A_P$: alelos privados; $A_R$: alelos raros; $H_O$: heterozigosidade observada; $H_E$= heterozigosidade esperada; $F_{IS}$: coeficiente de endogamia; $T_a$: Taxa de cruzamento aparente; $R_A$: riqueza alélica.
ANT: Antena; AB: Areia Branca; ERE: Estrada Real; PB: Poço Bonito; AS: Serra da Arnica; SB: Serra Branca; SSa: Serra do Salto; SS: Serra do Sofá.

**Tabela. 4.** Continuação.

| **Parâmetros** | **Populações –** SILVA (2016) | | | | | | | | | **Médias** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ANT | AB | ERE | PB | OB | SA | SB | SSa | SS | |
| $A_T$ | - | 45 | - | 42 | 36 | 39 | 44 | 31 | 43 | 40 |
| A | - | 5,63 | - | 5,25 | 4,5 | 4,88 | 5,50 | 3,88 | 5,38 | 5,00 |
| $A_P$ | - | 3 | - | 4 | 7 | 1 | 2 | 1 | 0 | 2,57 |
| $A_R$ | - | 17 | - | 10 | 10 | 10 | 17 | 8 | 10 | 11,71 |
| $H_O$ | - | 0,405 | - | 0,431 | 0,353 | 0,551 | 0,387 | 0,363 | 0,485 | 0,425 |
| $H_E$ | - | 0,527 | - | 0,664 | 0,484 | 0,614 | 0,510 | 0,527 | 0,647 | 0,567 |
| $F_{IS}$ | - | 0,231 | - | 0,321 | 0,283 | 0,105 | 0,236 | 0,306 | 0,247 | 0,247 |
| $T_a$ | - | 0,625 | - | 0,514 | 0,559 | 0,810 | 0,618 | 0,531 | 0,604 | 0,608 |

$A_T$: número total de alelos; A: número médio de alelos por população; $A_P$: alelos privados; $A_R$: alelos raros; $H_O$: heterozigosidade observada; $H_E$= heterozigosidade esperada; $F_{IS}$: coeficiente de endogamia; $T_a$: Taxa de cruzamento aparente; $R_A$: riqueza alélica.
ANT: Antena; AB: Areia Branca; ERE: Estrada Real; PB: Poço Bonito; AS: Serra da Arnica; SB: Serra Branca; SSa: Serra do Salto; SS: Serra do Sofá.

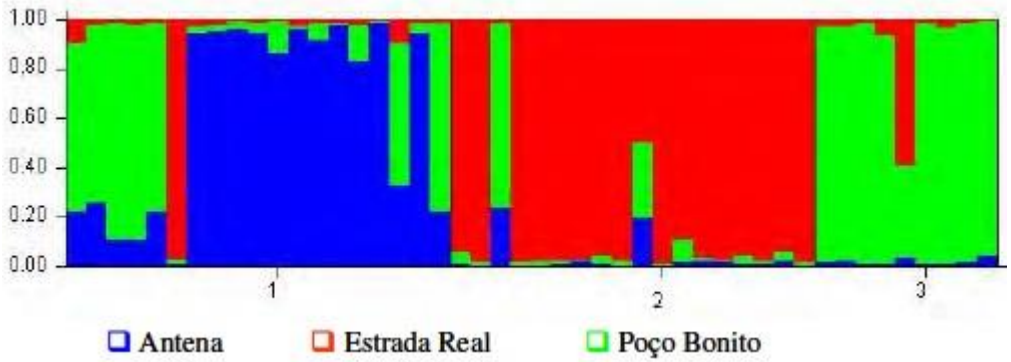



**Figura 8.** Análise de agrupamento utilizando genótipos multilocos de *Lychnophora pinaster* Mart. *Admixture* model contendo 3 populações de *L. pinaster* (admitindo k=3), demonstradas pelas cores verde, azul e vermelha. Obtido de Haber (2008).

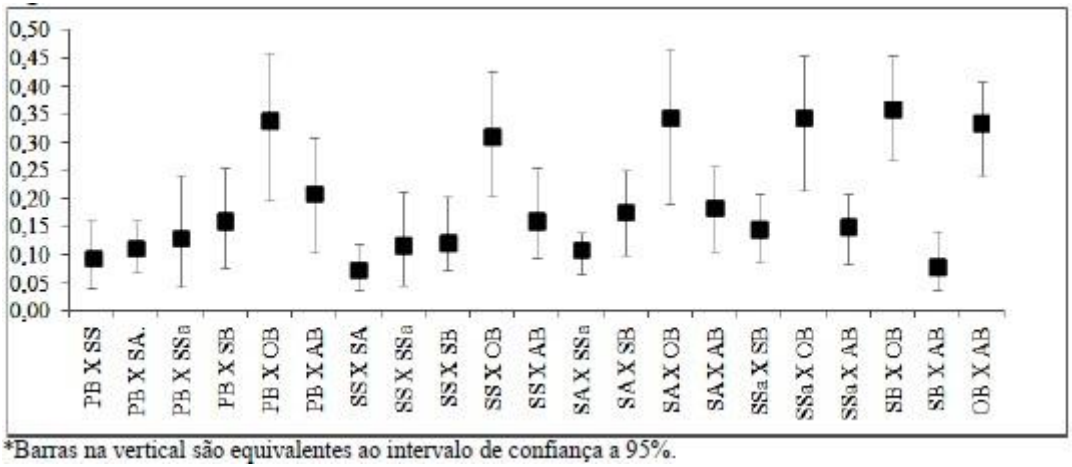



**Figura 9.** Fst par a par entre as sete populações de *Lychnophora pinaster* analisadas. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil. Obtido de Silva (2016). OB: Ouro Branco, PB: Poço Bonito, SS: Serra do Sofá, SA: Serra da Arnica, SSa: Serra do Salto, SB: Serra Branca, AB: Areia Branca.

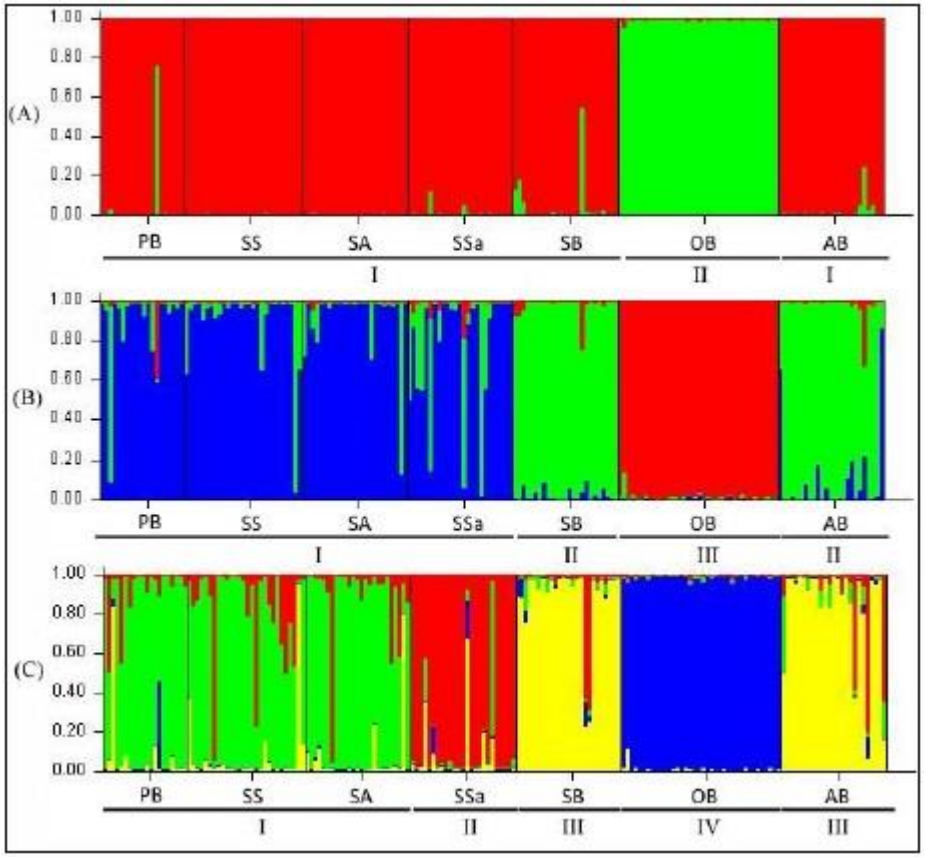



**Figura 10.** Atribuição Bayesiana de 186 indivíduos de *Lychnophora pinaster* em (A) K=2, (B) K=3 e (C) K=4 *clusters* utilizando o software STRUCTURE v.2.3.4. As populações PB, SS, SA, SSa, SB e AB são provenientes da região sul e a população OB da região sudeste do Estado de Minas Gerais – Brasil. Obtido de Silva (2016). OB: Ouro Branco, PB: Poço Bonito, SS: Serra do Sofá, SA: Serra da Arnica, SSa: Serra do Salto, SB: Serra Branca, AB: Areia Branca.

## 4. CONCLUSÃO

As características morfológicas e anatômicas de *L. pinaster* descritas e revisadas neste estudo compõem um interessante conjunto de marcadores que auxiliam na identificação inequívoca dessa espécie, separando-a de *L. ericoides* e demais espécies do gênero *Lychnophora*.

Os estudos dos aspectos da composição química dos óleos essenciais de 307 indivíduos distribuídos por 15 populações de *L. pinaster* em 3 regiões do estado de Minas Gerais, indicaram para uma grande diversidade química entre as populações de diferentes regiões, estando esta diversidade presente entre muitas populações dentro de uma mesma região, o que pode ser observado entre as populações da região Metropolitana de Belo Horizonte e Grão Mogol, e as populações Diamantina e Olhos D'Água situadas na região Norte de Minas Gerais.

As populações do Campo das Vertentes (Sul) de Minas Gerais, compartilham unicamente entre si, compostos da classe dos fenilpropanóides, o que evidencia uma grande similaridade química entre todas as populações desta região, sendo observada a formação de um único agrupamento entre quase todos os representantes dessas populações.

De acordo como os estudos realizados para diversidade e estrutura genética populacional utilizando-se SSRs, as populações até então estudadas, apresentaram-se estruturadas, com uma grande diversidade genética entre as populações, alguma dessas apresentando diferenciação genética maior em função da distância geográfica e outras como fluxo gênico mais frequente, estando estas populações muito próximas geograficamente.

## 5. REFERÊNCIAS

ABREU, V.G.C; TAKAHASHI, J.A; DUARTE, L.P; PILÓ-VELOSO, D; JÚNIOR, P.A.S; ALVES, R.O; ROMANHA, A.J; ALCÂNTARA, A.F.C. Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21(4), p. 615-621, 2011.

ABREU, V.G.C; CORREA, G.M; SILVA, T.M; FONTOURA, H.S; CARA, D.C; PILÓ-VELOSO, D; ALCÂNTARA, A.F.C. Anti-inflammatory effects in muscle injury by transdermal application of gel with *Lychnophora pinaster* aerial parts using phonophoresis in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13(270), p. 2-8, 2013.

ALBERTO, F; GOUVEIA, L; ARNAUD-HAOND, S; PÉREZ-LLORÉNS, J.L; DUARTE, C.M; SERRÃO, E.A. Within-population spatial genetic structure, neighbourhood size and clonal subrange in the seagrass *Cymodocea nodosa*. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2669-2681, 2005.

ALCÂNTARA, A.F.C; SILVEIRA, D; CHIARI, E; OLIVEIRA, A.B; GUIMARÃES, J.E; RASLAN, D.S. Comparative analysis of the trypanocidal activity and chemical properties of *E*-lychnophoric acid and its derivatives using theoretical calculations. **Eclética Química**, v. 30(3), p. 37-45, 2005.

ATHAYDE, A.L; RICHETTI, E; WOLFF, J; LUSA, M.G; BIAVATTI, M.W. "Arnicas" from Brazil: comparative analysis among ten species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29(4), p. 401-424, 2019.

BARROS, C.H; MATOSINHOS, R.C; BERNARDES, A.C.F.P.F; ARAÚJO, M.C.P.M; BEZERRA, J.P; SACHS, D; SOARES, R.D.O.A; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Efeitos de *Lychnophora pinaster* na inflamação e dor na gota aguda. **Journal of Etnopharmacology**, v. 280, e114460, 2021.

BERNARDES, A.C.F.P.F; COELHO, G.B; ARAÚJO, M.C.P.M; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. In vivo anti-hyperuricemic activity of sesquiterpene lactones from *Lychnophora* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29(2), p. 241-245, 2019.

BERNARDES, A.C.F.P.F; MATOSINHOS, R.C; ARAÚJO M.C.P.M; BARROS, C.H; SOARES R.D.O.A; COSTA, D.C; SACHS, D; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Lactonas sesquiterpene da espécie *Lychnophora*: vias antinociceptivas, anti-inflamatórias e antioxidantes para tratar gota aguda. **Journal of Etnopharmacology**, v. 6(269), p. 113738, 2021.

CARVALHO, Y.G.S; VITORINO, L.C; DE SOUZA, U.J.B; BESSA, L.A. Recent trends in research on the genetic diversity of plants: implications for conservation. **Diversity**, v. 11, p. 62, 2019.

CERQUEIRA, M.B.S; SOUZA, J.T; JUNIOR, R.A; 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, p. 551-553, 1987.

CHAKRABORTY, R. Analysis de genetic structure of populations: meaning, methods and implications. In: MAJUNDER, P. P. (Org). Human population genetics. San Francisco: **Plenum Press**. 1993.

CHAVES, T.L; RICARDO, L; PAULA-SOUZA, J.D; BRANDÃO, M.D.G.L. Plantas brasileiras úteis sob a visão do escritor-naturalista João Guimarães Rosa. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 437-444, 2015.

CHIARI, E; DUARTE, D.S; RASLAN, D.S; SAÚDE, D.A; PERRY, K.S.P; BOAVENTURA, M.A.D; GRANDI, T.S.M; STEHMANN, J.R; ANJOS, A.M.G; OLIVEIRA, A.B. *In vitro* screening of asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytotherapy Research**, v. 10(7), p. 636-638, 1996.

CRAVEIRO, A.A; FERNANDES, A.G; ANDRADE, C.H.S; MATOS, F.J.A; ALENCAR, J.W; MACHADO, M.I.L. **Oleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, p. 210, 1981.

COLLI-SILVA, M; VASCONCELOS, T; PIRANI, J.R. Níveis proeminentes de endemismo de plantas apoiam fortemente o reconhecimento das províncias de campo rupestre nos cumes das montanhas do leste da América do Sul. **Biogeography**, v. 46, p.1723-1733, 2019.

CORNUET, J.M; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144(4), p. 2001-2014, 1996.

CUPOLILO, S.M.N; GOLLNER, A.M; SOUZA, R.L.P; TIAGO, D.A.G; LIMA, V.B.R; LIMA, T.S. Investigation of damage effects by antiinflammatory and immunosuppressive doses of dexamethasone on mice's gastric mucosal. **HU Revista**, v. 33, p. 17-22, 2007.

DOYLE, J.J; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

EXCOFFIER, L; LAVAL, G; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.

EARL, D. A; VON HOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER. A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, p. 359-361, 2012.

FERRAZ-FILHA, Z. S; LOMBARDI, J. A; GUZZO, L. S; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) bioassay of extracts from *Lychnophoriopsis candelabrum* and different *Lychnophora* species. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14(2), p. 358-361, 2012.

FERREIRA, S.A. **Avaliação da toxicidade e das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* (arnica)**. UFOP, Ouro Preto, 2010.

GOUDET, J. Fstat version 1.2: a computer program to calculate F statistics. **Journal of Heredity**, v.86(6), p.485-486, 1995.

GUZZO, C.A; LAZARUS, G.S; WERTH, V. Dermatologycal Pharmacology. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDON, R. W.; GILMAN, A. G. (Org.). **Goodman & Gilman's the pharmacological basis phytotherapeutics**, v. 9, p. 1604-6, 1996.

GUZZO, L.S; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A; SILVA, A.C.A; LOMBARDI, J.A; GUIMARÃES, H.N; GRABE-GUIMARÃES, A. Antinociceptive and antiinflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 120–124, 2008.

HABER, L.H. **Caracterização da diversidade genética, via marcador microssatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart**. Tese. Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, p. 151, 2008.

HABER, L.H; CAVALLARI, M.M; SANTOS, F.R; MARQUES, M.O; GIMENES, M.A; ZUCCHI, M.I. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites para *Lychnophora pinaster*: um estudo para a conservação de uma planta medicinal nativa. **Molecular Ecology Resources**, v. 9(3), p. 811-4, 2009.

ISOBE, M.T.C. **Anatomia foliar e influência da sazonalidade no óleo essencial de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.** Dissertação (Mestrado em Agronomia – Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p. 93, 2012.

JAKIEMIU, E.A.R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus Vulgaris* L.).** Universidade Federal do Paraná - Setor de Tecnologia, Curitiba, p. 89, 2008.

JOMBART, T. Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, v. 24, p. 1403-1405, 2008.

KEENAN, K; McGINNITY, P; CROSS, T.F; CROZIER, W.W; PRODÖHL, P.A. diveRsity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors. **Methods in Ecology and Evolution**, 2013.

LEWIS, P; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data (software) version 1.1(d12), 2002. Disponivel em: http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/.

LORENZO, D; GONZALEZ, G; ROSSINI, C. **Farmacognosia y Productos Naturales**. Contenido del curso teórico, Apostila 04: Aceites Esenciales, Montevideo, p. 14-18, 2002.

LUQUE, R.E.M; LUIZA, N; SEMIR, J. Anatomia foliar de *Lychnophora* Mart. (Vernonieae: Asteraceae). **Plantula**, v. 2(3), p. 141-152, 1999.

LUSA, M.G; LOEUILLE, B.F.P; CICCARELLI, D; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Evolution of stem and leaf structural diversity: a case study in Lychnophorinae (Asteraceae). **The Botanical Review**, v.84, p. 201-241, 2018.

MARQUES, M.O.M; FACANALI, R; HABER, L.L; VIEIRA, M.A.R**.** Essential Oils: History, Biosynthesis, and Agronomic Aspects. Medicinal Essential Oils: Chemical, Pharmacological and Therapeutic Aspects. New York: **Nova Science Publishers**, p. 3-22, 2012.

MARQUES, A.P.S. **Diversidade química e genética de populações naturais de *Lychnophora pinaster* Mart**. Tese. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Instituto de Biociências, Botucatu – SP, p. 125, 2020.

MARQUES, A.P.S; BONFIM, F.P.G; SANTOS, D.G.P.O; LIMA, M.P; SEMIR, J; MARTINS, E.R; ZUCCHI, M.I; HANTAO, L.W; SAWAYA, A.C.H.F; MARQUES, M.O.M. Chemical diversity of essential oils from the Brazilian medicinal plant *Lychnophora pinaster* Mart from different environments. **Industrial Crops & Products**, v. 156, e112856. 2020.

MÜLLER, C.M.S; COELHO, G.B; DE PAULA, C; ARAÚJO, M.C.P.M; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Extrato etanol *Lychnophora pinaster* e seus componentes químicos amenizam hiperuricemia e inflamação relacionada. **Journal of Etnopharmacology**, v. 242, p. 112040, 2019.

OLIVEIRA, A.B; SAÚDE, D.A; PERRY, K.S.P; DUARTE, D.S; RASLAN, D.S; BOAVENTURA, M.A.D; CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytotherapy Research**, v. 10(4), p. 292-295, 1996.

PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

PINHEIRO, P.T.S.G. **Avaliação da atividade anti-inflamatória de formulações de uso tópico contendo extratos de *Lychnophora pinaster* e *Symphytum officinale***. UFOP, Ouro Preto, 2010.

PIRY, S; LUIKART, G; CORNUET, J.M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 502-503, 1999.

PORTELLA, R.O. **Efeito da altitude na diversidade química e genética de *Lychnophora pinaster* Mart**. Tese. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Instituto de Biociências, Botucatu, p. 39, 2021.

PRITCHARD, R; STEPHENS, M; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

RODRIGUES, V.E.G; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência Agrotecnica**, v. 25(1), p.102-123, 2001.

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae: Compositae)**. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, Campinas, p. 515, 1991.

SEMIR, J; REZENDE, A.R; MONGE, M; LOPES, N.P. **As arnicas endêmicas das Serras do Brasil: Uma visão sobre a biologia e a química das espécies de *Lychnophora* (Asteraceae).** Ouro Branco (MG): UFOP, p. 212, 2011.

SILVA, P.S.S. **Caracterização da composição química dos óleos essenciais de *Lychnophora pinaster* Mart. em função da sazonalidade**. Dissertação. Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, p. 167, 2013.

SILVA, P.S.S. **Caracterização da diversidade genética e composição química de *Lychnophora pinaster* Mart.** Tese. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu – SP. 178p. 2016.

SILVEIRA, D; WAGNER, H; CHIARI, E; LOMBARDI, J.A; ASSUNÇÃO, A.C; OLIVEIRA, A.B; RASLAN. D.S. Biological activity of the aqueous extract of *Lychnophora pinaster* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15(4), p. 294-297, 2005a.

SILVEIRA, D; SOUZA FILHO, J.D; OLIVEIRA, A.B; RASLAN, D.S. Lychnophoric acid from *Lychnophora pinaster*: a complete and unequivocal assignment by NMR spectroscopy. **Eclética Química**, v. 30(1), p. 37-41, 2005b.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 4. ed. p. 819, 2009.

TRAPP, S.C; CROTEAU, R.B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, v.158, p.811-832, 2001.

VIEIRA, M.A.R. 2012. **Diversidade genética e constituição química dos óleos essenciais de populações de *Lychnophora ericoides* Mart. E *Lychnophora pinaster*** Mart. Tese. Faculdade de Ciências Agronômicas/Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p. 118, 2012.

VIEIRA, M.A.R; MARQUES, M.O.M; HABER, L.L; VIGNA, B.B.Z; BAJAY, M.M; PINHEIRO, J.B; SOUZA, M.P; SEMIR, J; ZUCCHI, M.I. New loci of Lychnophora ericoides and transferability to *Lychnophora pinaster*, endangered medicinal species from Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 13(4), p. 10878-10882, 2014.

## V. CAPÍTULO II

# Estrutura genética populacional e componentes químicos de óleos essenciais compartilhados entre dezesseis populações de *Lychnophora pinaster* Mart.

## 1. INTRODUÇÃO

*Lychnophora* Mart. é um gênero pertencente à família Asteraceae (Compositae) (SEMIR *et al*., 2011). O gênero é endêmico do Brasil com distribuição confirmada para os estados de Minas Gerais, Goiás, Bahia e São Paulo, possuindo cerca de 29 espécies descritas (BFG, 2018).

Os representantes de *Lychnophora* podem apresentar hábito variando desde arvoretas a arbustos ou subarbustos candelabriformes ou subdicotômicos, com ramos cilíndricos, cobertos por indumento variado podendo ser velutinos, pubérulos, tomentosos, vilosos ou lanosos. As folhas são imbricadas e ascendentes no ápice, alternas ou raramente opostas. As inflorescências seguem um padrão básico e são consideradas como glomérulos simples, o fruto é uma cipsela que pode ser glabra, glandulosa ou costada (SEMIR *et al*., 2011).

As espécies circunscritas para *Lychnophora* apresentam uma série de características morfológicas, anatômicas e químicas com grau elevado de complexidade quanto a diferenciação destas dentro dos grupos que compreendem este gênero (SEMIR, 1991; LUQUE *et al.*, 1999; SEMIR *et al.*, 2011; LUSA *et al.*, 2018; ATHAYDE *et al.*, 2019).

No Brasil as espécies do gênero são conhecidas como “arnica brasileira”, “arnicão brasileiro”, “arnica da serra” ou “arnica mineira” e são geralmente utilizadas no tratamento de dores, inflamações, feridas e reumatismos (SAÚDE *et al*., 1998; BERNARDES *et al*., 2021). Na medicina popular do Brasil, as espécies de *Lychnophora* mais utilizadas foram *Lychnophora ericoides* Mart. e *Lychnophora. pinaster* Mart., devido a semelhanças destas espécies com a espécie europeia (*Arnica montana* L.) que já tinha o seu potencial medicinal reconhecido na Europa (CERQUEIRA *et al*., 1987; CHAVES *et al*., 2015; BERNARDES *et al*., 2021).

*Lychnophora pinaster* Mart., “arnica mineira” espécie endêmica dos campos rupestres no Cerrado do estado de Minas Gerais, é uma planta medicinal tradicionalmente utilizada como agentes anti-inflamatório e cicatrizantes, analgésicos, contra pancadas e contusões, hematomas e até mesmo contra picadas de insetos (RODRIGUES, CARVALHO, 2001; HABER *et al*., 2009; SEMIR *et al*., 2011; SILVA, 2016).

Populações de *L. pinaster* tem sido exploradas sem nenhum plano de manejo ao longo do tempo, além disso, a progressiva fragmentação do habitat tem contribuído para o reduzido número de indivíduos presentes nas populações remanescentes o que confere à espécie, o *status* de ameaçada de extinção na Lista de Espécies Ameaçadas do Estado de Minas Gerais (COPOM, 1997; MENDONÇA, LINS, 2000; SILVA, 2016; MARQUES, 2020).

As características do perfil químico de *L. pinaster*, principalmente relacionado aos óleos essenciais de diversos indivíduos pertencentes às populações desta espécie distribuídas por três regiões de Minas Gerais, foram estudadas por Haber (2008), onde foi verificada a presença do

(*E*)-cinamato de metila e do cedr-8(15)-en-9-α-ol como substâncias majoritárias componentes dos óleos essenciais de populações naturais de *L. pinaster* do sul de Minas Gerais (Campos das Vertentes), Isobe (2012) e Silva (2013) também relataram como substâncias majoritárias para populações desta mesma região o *trans*-cinamato de metila e o *trans*- cariofileno, Silva (2016) confirmou o *trans*-cinamato de metila como substância predominante para as populações ocorrentes na região do Campo das Vertentes (sul de Minas Gerais) e a predominância de compostos do grupo dos sesquiterpenos para uma população da região Metropolitana de Belo Horizonte.

Para as populações das regiões Norte de Minas Gerais e região Metropolitana de Belo Horizonte, Marques (2020) e Portella (2021) relataram a ocorrência das substâncias 14-acetoxi-α-humuleno, 14-hidroxi-4,5-dehidro-cariofileno, esquamulosona, 14-hidroxi-α-humuleno e cedr-8(15)-en-9-α-ol em populações ocorrentes no norte de Minas Gerais, e os compostos 1,7-diepi-α-cedrenal, (*Z*)-nerolidol, 14-acetoxi-α-humuleno e o 4-*oxo*-15-nor-eudesman-11-eno como substâncias majoritárias dos óleos essenciais de populações da região Metropolitana de Belo Horizonte.

*Lychnophora pinaster* em sua complexidade química, tem mostrado padrões de compartilhamento de substâncias em função da região de ocorrência das diversas populações investigadas, as distâncias geográficas ou o padrão de isolamento destas populações, sugerem que existe similaridade química entre as populações do sul de Minas Gerais e que os aspectos de diversidade genética e estrutura populacional podem estar relacionados diretamente com a segregação regional das populações (HABER, 2008; SILVA, 2016).

Os aspectos relacionados à estrutura populacional e diversidade genética de espécies nativas sofrem interferência direta de atividades como agricultura intensiva e mineração que causam fragmentação de habitats, formando muitas vezes, barreiras que impedem a comunicação e troca de informações genéticas entre muitas populações de espécies que vão se isolando. A fragmentação e o isolamento podem limitar o fluxo gênico entre populações afetando assim, a estrutura populacional de muitas espécies vegetais devido aos efeitos da endogamia, isolamento e deriva genética, interferindo diretamente na dinâmica metapopulacional (FISCHER, STÖCKLIN, 1997; DANNEMANN, 2000; HANSKI, GAGGIOTTI, 2004; POSCHLOD *et al.*, 2005; STADLER *et al.*, 2010; GEMEINHOLZER *et al.*, 2012).

Estudos como os realizados por Li *et al.* (2013), Bravo-Monzón *et al.* (2014), Younsi e*t al.* (2018), Pacheco-Hernández *et al.* (2021) e Ruan *et al.* (2021), destacam características genéticas e químicas de populações de diversas espécies pertencentes a gêneros da família Asteraceae e relacionam muitas vezes, fatores ecológicos, variações ambientais e distribuição

geográfica ao comportamento das diversas características apresentadas por as populações vegetais estudadas.

Em *L. pinaster*, estudos realizados mais recentemente por Marques (2020) e Portella *et al.* (2021), trazem os principais resultados relacionados às características de diversidade genética e composição química de populações desta espécie distribuídas em três regiões do estado de Minas Gerais (Regiões: Norte, Metropolitana de Belo Horizonte e Campo das Vertentes no sul de Minas Gerais).

A constante ameaça de extinção, a fragmentação progressiva do habitat, o extrativismo sem plano de manejo e o reduzido número de indivíduos por população, sinalizam para a realização de estudos que complementem e ampliem o rol de conhecimentos acerca das características químicas e genéticas das populações de *L. pinaster* já estudadas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo principal, verificar a estruturação populacional de populações de *L. pinaster* ocorrentes em quatro mesorregiões do estado de Minas Gerais através de análises de marcadores SNPs, verificando ainda, grupos de compostos químicos compartilhados entre populações de uma mesma região ou de regiões diferentes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Extração de DNA

Para extração do DNA das amostras foi empregado o método CTAB (DOYLE, 1990; PORTELLA *et al.*, 2021). Os 255 indivíduos de *L. pinaster* tiveram seu DNA extraído neste trabalho. Para cada indivíduo foi utilizado 10 mg de folhas trituradas à consistência de pó e cada amostra foi adicionada a um Eppendorf contendo 1 mL de solução-tampão de extração CTAB 2 % a 65 ºC (água Milli-Q 100 mM; TRIS-HCl 100 mM; pH 8,0; NaCl 1,42 mM; CTAB 2 %; EDTA 20 mM pH 8,0; β-mercaptoetanol 0.2 %; PVP 2 %).

As amostras foram colocadas em banho-maria à 65 ºC por 60 minutos, com intervalos de 15 minutos para agitação das amostras (MARQUES, 2020; PORTELLA, 2021).

Após o procedimento acima, foi adicionado a cada amostra 900 µL de chlorofórmio-isoamil (24:1) e as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para outro Eppendorf e foi adicionado 500 µL de isopropanol; o mesmo Eppendorf foi colocado em freezer a temperatura de -20 ºC durante 30 minutos e depois centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos. O precipitado, ou pellet, foi deixado para secar em bancada a temperatura ambiente, depois lavado com 500 µL de etanol 70 % e centrifugado a 12000 rpm por sete minutos.

Após secagem do precipitado, ele foi novamente lavado com 500 µL de etanol 95 % e centrifugado a 12000 rpm por sete minutos. Os precipitados finais foram ressuspendidos com 60 µL de solução-tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0; e 2 µL RNAse (10 mg/mL). As amostras foram levadas a banho-maria por 37 ºC durante 60 minutos e deixadas para secar em overnight à temperatura ambiente. O material genético extraído foi armazenado em biofreezer a -80 ºC até seu uso (PORTELLA *et al*., 2021).

### 2.2. Quantificação e Normalização de DNA

A quantificação do DNA extraído das 255 amostras foi realizada pela observação em eletroforese com gel de agarose utilizando SYBERtm Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) após passagem do gel em transiluminador ultravioleta e pela comparação com concentrações conhecidas de fago Lambda (25, 30, 50 and 100 ng/µL). As amostras de DNA foram normalizadas a 20 ng/µL e purificadas com o kit QIAquick PCR Purification of Qiagen®.

### 2.3. Preparação das Bibliotecas Genômicas

A produção das bibliotecas genômicas via *Genotyping-by-sequencing* (GBS) foi realizada em parceria com o Departamento de Genética da Universidade de Campinas (Unicamp), a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (Esalq/USP) e a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pólo de Piracicaba-SP. O protocolo da construção das bibliotecas genômicas GBS foi realizado de acordo com as informações no trabalho de Poland *et al*. (2012), com adaptações de Zucchi *et al*. (2019) e Portella *et al*. (2021).

Foram utilizados 20 ng/µL de DNA de cada indivíduo, o qual foi normalizado a 10 µL, cujas amostras foram distribuídas em placas contendo 96 poços. Cada poço da placa apresenta adaptadores comuns e adaptadores do tipo *barcode*, sendo eles utilizados nas análises a *posteriori*. O primeiro estágio no protocolo GBS se trata da reação de Restrição, com a adição de 2,0 µL de solução tampão NEB 4; 0,4 µL PstI-HF (20 U/µL); 0,4 µL MspI (20 U/µL); e 10,2 µL de água Milli-Q.

O segundo passo da reação de GBS se dá com a reação de Ligação, com a adição de 2,0 µL de solução-tampão NEB 4; 1,0 µL ATP (10 mM); 0,5 µL T4 DNA Ligase (200 U/µL); 11,5 µL de água Milli-Q. O terceiro passo se trata da condução de PCR Multiplex com o seguinte programa de temperatura: 16 ciclos a 95 ºC por 10 s, 62 ºC por 20 s, 72 ºC por 30 s); 72 ºC por 5 min; 4 ºC indefinidamente. O sequenciamento do tipo Next-Generation Sequencing (NGS) das amostras foi realizado em plataforma *Illumina* pelo *Illumina* Miseq, com fragmentos de tamanho de 90 nt de comprimento.

### 2.4. Genotipagem de descoberta de marcadores SNP

Os procedimentos de demultiplexação, construção dos loci RAD, descoberta e anotação dos marcadores SNP foram conduzidos via *pipeline* no STACKS v.2.45 (CATCHEN *et al.,* 2013; ZUCCHI *et al.,* 2019; PORTELLA *et al.,* 2021). As *reads* obtidas das amostras de DNA de *L. pinaster* foram, primeiramente, demultiplexadas utilizando o *software radtags* e individualizadas em diferentes arquivos no formato *fastq* baseadas nos *barcodes* (6-8pb) de cada amostra.

Diversos filtros foram aplicados nessa primeira etapa com a finalidade de selecionar os *reads* das amostras com alta qualidade. Dentre os filtros, foram aplicados o filtro de *score* de qualidade (-q), o filtro para eliminação de leituras com função baseada em não-chamada (-c) e a função que impede a seleção de *barcodes* com mais de um mismatch (-r). Após esse procedimento, as sequências com comprimento de 90pb foram selecionadas e sequências com baixa qualidade foram descartadas.

A segunda etapa da genotipagem consistiu na construção de um catálogo de SNP pelo uso do *software ustacks*. Neste *software*, foi aplicado o método de novo para a seleção de SNP pois a espécie não apresenta genoma de referência, seguido dos seguintes parâmetros: distância máxima permitida entre as pilhas, ou *stacks* (M=2); distância máxima permitida para alinhamentos secundários (N=4, M + 2); e cobertura mínima com três sequências para cada locus RAD (m=3). A terceira etapa consistiu na criação de um catálogo comum de SNP pelo uso do *software cstacks*.

### 2.5. Diversidade e estrutura genética

Os procedimentos para a descrição da diversidade genética das populações de *L. pinaster* foram realizadas via STACKS v.2.45, utilizando o *software ctacks* (ZUCCHI *et al.,* 2019; PORTELLA *et al.,* 2021). A diversidade nucleotídica ($\pi$), os alelos privados (Ap), a frequência alélica dos alelos mais frequentes por locus (P), a heterozigosidade observada (Ho), a heterozigosidade esperada (He), e o coeficiente de endogamia intrapopulacional ($F_{IS}$) foram estimados via *software cstacks*.

Para a descrição da estrutura populacional, o índice de fixação par-a-par ($F_{ST}$) foi estimado pela função *stamppFst* do pacote *dartR* (MIJANGOS *et al.,* 2022) e expresso via *heatmap* pelo pacote *ComplexHeatmap* (GU *et al.,* 2016). O modelo PCAdapt foi empregado para avaliar a separação de grupos populacionais (PORTELLA *et al.,* 2021). O software ADMIXTURE v1.2 foi utilizado, cujo melhor valor de *K* que descreve os *clusteres* genéticos das populações de *L. pinaster* foi implementado via método de validação cruzada, ou *cross-validation* (ALEXANDER *et al.,* 2009). Também foi realizado a análise discriminante de

componentes principais (DAPC) via pacote adegenet, com a finalidade da descrição de clusters genéticos (JOMBART, 2011).

### 2.6. Análises dos componentes químicos dos óleos essenciais de *L. pinaster*

Todas as análises da composição química dos óleos essenciais dos indivíduos das populações estudadas foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais Unidade de Fitoquímica do Centro de Pesquisa e Desenvolvimentos de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico, Campinas - SP.

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger (CRAVEIRO *et al.*, 1981) por duas horas, e, posteriormente, armazenados em frascos de vidro transparente devidamente identificados e mantidos no freezer a 4 ºC até a análise da composição química, conduzida em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu, QP-5000), operando a 70 eV, dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 um), helio como gás de arraste (1,7 mL/min), injetor a 240ºC, detector a 230ºC e o seguinte programa de temperatura: 80ºC – 150ºC, 6ºC/min; 150ºC – 190ºC, 2ºC/min; 190ºC – 280ºC, 10ºC/min; 280ºC (6 min.) e split 1/20.

As técnicas empregadas para as análises quantitativas e qualitativas da composição química dos óleos essenciais das 15 populações amostradas pelos diversos estudos desenvolvidos foram: para análises qualitativas, o emprego de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e para as análises quantitativas, se empregou a cromatografia a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC) (HABER, 2008; ISOBE, 2012; SILVA, 2013, 2016; MARQUES, 2020; PORTELLA, 2021).

### 2.7. Análise de agrupamentos em função dos componentes químicos dos óleos essenciais de *L. pinaster*.

Ao todo foram analisadas 15 populações de quatro mesorregiões do estado de Minas Gerais sendo contabilizadas 154 substâncias componentes dos óleos essenciais dos indivíduos das populações de *L. pinaster*, e a composição química dos óleos essenciais de duas populações de *L. ericoides* como grupo externo para as análises multivariadas. As substâncias foram corrigidas e editadas manualmente com o auxílio do software XLSTAT implementado no Execel, em seguida, os compostos filtrados e analisados utilizando PAST 4.30 (HAMMER *et al*., 2001). Utilizando o MESQUITE 3.70 (MADDISON, MADDISON, 2021), 307 indivíduos das quinze populações de *L. pinaster* foram alinhados com as 154 substâncias componentes dos óleos essenciais, as correções foram feitas manualmente, e em seguida foi gerado o arquivo NEXUS para posterior análises de agrupamentos. Os agrupamentos foram realizados com o

auxílio do software PAUP 4.0, empregando o algoritmo de máxima verossemenlhaça, e com o emprego do PAST 4.30 (HAMMER *et al*., 2001) utilizando o algoritmo Paired Group (UPGMA) para verificar agrupamentos entre as populações das diferentes regiões de Minas Gerais.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Populações de *Lychnophora pinaster*, descoberta de SNPs e processamento de dados

Os indivíduos de *L. pinaster* analisados neste estudo, são oriundos de coletas realizados entre os anos de 2011 (populações do Campo das Vertentes) e 2017 (populações do Norte de Minas, Jequitinhonha e região Metropolitana de BH). Foram construídas bibliotecas GBS utilizando-se indivíduos de 16 populações distribuídas por quatro Mesorregiões de Minas Gerais (Norte de Minas, Jequitinhonha, Metropolitana de BH e Campos das Vertentes (Figura 11). As bibliotecas reteram um total de 544481 loci durante o processamento de dados realizados nos passos de demultiplexação e checagem de qualidade de *reads*.

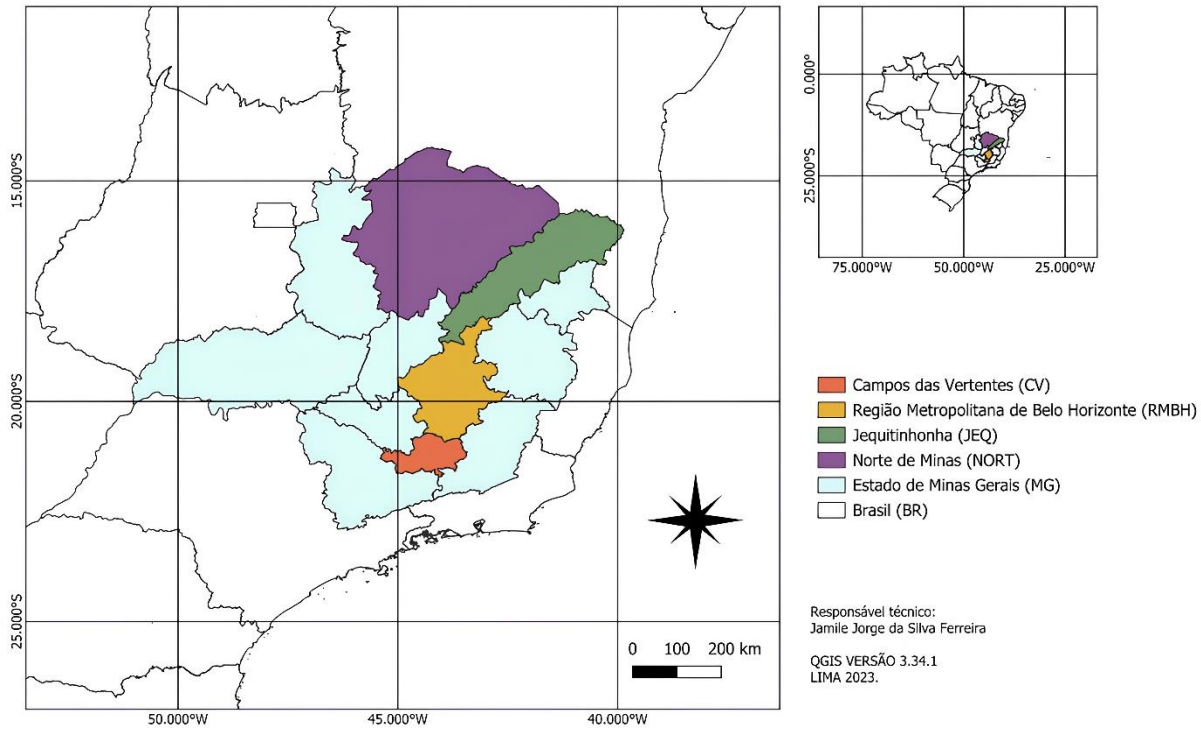



**Figura 11.** Quatro mesorregiões do estado de Minas Gerais, áreas de distribuição das 16 populações de *Lychnophora pinaster*.

Após filtragem dos dados, segundo os métodos já descritos (item "*2.4. Genotipagem de descoberta de marcadores SNP*" do tópico Material e Métodos), foram encontrados um total de 10585 loci contendo marcadores SNP de alta qualidade com 9589pb (stdev ± 0.05, *gstacks*). Esses marcadores foram usados nas análises de diversidade genética e de estrutura genética das populações de *L. pinaster*, sendo utilizados um total de 255 indivíduos selecionados dentre as 16 populações (Tabela 5).

A população com menor número de indivíduos selecionados para análises foi AB com (n=6) se comparada ao número de indivíduos selecionados para as demais populações que tiveram número superior a 10 indivíduos selecionados (Tabela 5), porém isso não implica em fator limitante com relação a qualidade da amostra em uso para estudo de genética de populações baseado em SNPs. Marques (2020) em seu estudo sobre diversidade e estrutura genética populacional de *L. pinaster*, utilizou as populações AB com (n=6) e MG com (n=7) indivíduos selecionados, o que segundo a autora, se mostrou suficiente para proceder com as análises genéticas devido ao número elevado de SNPs (3441). Nazareno (2017), constatou em estudo, que se utilizados a partir de 1500 SNPs é possível se obter um índice $F_{st}$ bastante acurado mesmo se utilizado apenas (n=2) indivíduos por população. Neste estudo, contamos com 10000 SNPs para um tamanho amostral de 16 populações o que nos assegura a qualidade das análises.

**Tabela 5.** Número de indivíduos de dezesseis populações de *Lychnophora pinaster* sequenciados e selecionados.

| Mesorregiões de Minas Gerais | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Campo das Vertentes** | | | | | **Metropolitana de BH** | | | | | **Jequitinhonha** | | **Norte de Minas** | | | |
| **Populações** | AB | SA | SB | SS | SSa | CTRA | NLSC | OB | SM | SRM | DIMa | DI | GM | ITBO | OD | ODMa |
| **Sequenciados (n)** | 11 | 14 | 17 | 13 | 17 | 16 | 18 | 19 | 25 | 21 | 23 | 16 | 16 | 19 | 15 | 15 |
| **Selecionados (n)** | 6 | 14 | 17 | 13 | 14 | 16 | 16 | 19 | 25 | 21 | 23 | 16 | 15 | 14 | 14 | 12 |
| | | | **Total** | **=** | **255** | **indivíduos** | | | | | | | | | | |

+

AB = Areia Branca; SA= Serra da Arnica; SB= Serra Branca; SS= Serra do Sofá; SSa= Serra do Salto; CTRA= Caeté/Rio Acima; NLSC= Nova Lima Serra da Calçada; OB= Ouro Branco; SM= Serra da Moeda; SRM= Serra do Rola Moça; DIMa= Diamantina; DI = Diamantina; GM= Grão Mogol; ITBO= Itacambira/Botumirim; OD= Olhos D'Água; ODMa= Olhos D'Água/Diamantina.

### 3.2. Diversidade Genética de Populações de *L. pinaster*

Os índices de diversidade genética analisados para as dezesseis populações de *L. pinaster* apresentaram valores médios de heterozigosidade observada ($H_O$ = 0,030) e heterozigosidade esperada ($H_E$ = 0,030) aproximados e semelhantes, indicando assim, que as populações de *L. pinaster* encontram-se em equilíbrio (Tabela 6).

Os resultados demonstram que *L. pinaster* apresenta elevada diversidade genética interpopulacional. As análises indicaram a presença de muitos homozigotos, fato que pode ser explicado pelos valores elevados de homozigotos no conjunto total de populações analisadas. Os baixos valores de diversidade nucleotídica expressam baixa variação genética entre as populações, indicando alto grau de polimorfismos genéticos interpopulacional.

Nossos resultados mostram que todas as populações de *L. pinaster* apresentam baixos valores de diversidade nucleotídica, indicando que *L. pinaster* passa por processos de fragmentação populacional. O índice de endogamia intrapopulacional ($F_{IS}$) indicou que as populações estão em equilíbrio. Apesar disso, as análises genéticas com SNPs podem expressar valores muito baixos de $F_{IS}$.

Os resultados relacionados as heterozigosidades esperada ($H_E$) e observada ($H_O$), que apresentam valores semelhantes, convergem com os resultados encontrados por Portella *et al.* (2021), que ao analisarem a diversidade genética e estrutura populacional de oito populações de *L. pinaster* distribuídas por três mesorregiões do estado de Minas Gerais, encontraram valores de heterozigosidades esperada e observada semelhantes utilizando análises de dados baseados em marcadores SNPs.

Quanto ao número de alelos privados, as populações DIMa – ao norte do Jequitinhonha ($A_P$ = 835), OD – Norte de Minas ($A_P$ = 714), SRM – Região Metropolitana de Belo Horizonte ($A_P$ = 675) e SM – Região Metropolitana de Belo Horizonte com ($A_P$ = 608) foram as populações com maior número de alelos privados, AB – Campo das Vertentes com ($A_P$ = 39), GM - Norte de Minas ($A_P$ = 54) e SA – Campo das Vertentes com ($A_P$ = 63), foram as populações com menor número de alelos privados (Tabela 6).

Marques (2020), analisando a diversidade genética de nove populações de *L. pinaster* das mesorregiões Campo das Vertentes, Jequitinhonha, Metropolitana de Belo Horizonte e Norte de Minas, encontrou médias de alelos privados muito baixas e diferindo entre regiões, sendo $A_P$ = 5,96 para a região Metropolitana de Belo Horizonte a maior média encontrada e $A_P$ = 2,12 para Campo das Vertentes a menor média. Portella *et al.* (2021) encontraram número expressivo de alelos privados principalmente para as populações SRM com ($A_P$ = 153) e SM com ($A_P$ = 498) ambas da região Metropolitana de Belo Horizonte.

**Tabela 6.** Índices de diversidade genética para as dezesseis populações de *L. pinaster* distribuídas por quatro mesorregiões de Minas Gerais.

| Local de coleta | Sigla da população | Mesorregião | $H_O$ | $H_E$ | $F_{IS}$ | $A_P$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Diamantina | DIMa | Jequitinhonha | 0,0399 | 0,0389 | 0,0098 | 835 |
| Diamantina | DI | Norte de Minas | 0,0370 | 0,0380 | 0,0130 | 556 |
| Grão Mogol | GM | Norte de Minas | 0,0165 | 0,0150 | 0,0025 | 54 |
| Itacambira/Botumirim | ITBO | Norte de Minas | 0,0256 | 0,0226 | 0,0048 | 278 |
| Olhos D'Água | OD | Norte de Minas | 0,0399 | 0,0399 | 0,0088 | 714 |
| Olhos D'Água/Diamantina | ODMa | Norte de Minas | 0,0289 | 0,0288 | 0,0025 | 189 |
| Caeté/Rio Acima | CTRA | Metropolitana de BH | 0,0358 | 0,0357 | 0,0120 | 532 |
| Nova Lima | NLSC | Metropolitana de BH | 0,0328 | 0,0328 | 0,0130 | 395 |
| Ouro Branco | OB | Metropolitana de BH | 0,0299 | 0,0299 | 0,0098 | 399 |
| Serra da Moeda | SM | Metropolitana de BH | 0,0367 | 0,0358 | 0,0045 | 608 |
| Serra do Rola Moça | SRM | Metropolitana de BH | 0,0338 | 0,0338 | 0,0097 | 675 |
| Areia Branca | AB | Campo das Vertentes | 0,0248 | 0,0205 | -0,0025 | 39 |
| Serra da Arnica | SA | Campo das Vertentes | 0,0189 | 0,0189 | 0,00015 | 63 |
| Serra Branca | SB | Campo das Vertentes | 0,0287 | 0,0238 | -0,0048 | 213 |
| Serra do Salto | SSa | Campo das Vertentes | 0,0228 | 0,0205 | -0,0018 | 145 |
| Serra do Sofá | SS | Campo das Vertentes | 0,0229 | 0,0218 | 0,00005 | 131 |

$A_P$: Alelos privados; $F_{IS}$: Coeficiente de endogamia intrapopulacional; $H_O$: Heterozigosidade observada; $H_E$: Heterozigosidade esperada. DIMa: Diamantina; DI: Diamantina; GM: Grão Mogol; ITBO: Itacambira/Botumirim; OD: Olhos D'Água; ODMa: Olhos D'Água/Diamantina; CTRA: Caeté/Rio Acima; NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada; OB: Ouro Branco; SM: Serra da Moeda; SRM: Serra do Rola Moça; AB: Areia Branca; SA: Serra da Arnica; SB: Serra Branca; SSa: Serra do Salto; SS: Serra do Sofá.

Todas as populações analisadas apresentaram altos valores de frequências alélicas e valores relativamente baixos para diversidade nucleotídica, indicando assim, uma maior presença de homozigotos dentro das populações de *L. pinaster*. Portella *et al.* (2021) encontraram resultados semelhantes ao analisarem dados genéticos com base em marcadores SNPs de oito populações de *L. pinaster*. Populações de plantas nativas, naturalmente podem apresentar uma alta frequência de homozigotos por consequências causados por mudanças ambientais na paisagem, fragmentação de habitat e fatores que podem limitar parcialmente o fluxo gênico entre populações (ZUCCHI *et al.*, 2019; PORTELLA *et al.*, 2021).

### 3.3. Estrutura Genética de dezesseis populações de *L. pinaster*

As populações de *L. pinaster* apresentaram grande diferenciação genética segundo os valores de $F_{st}$ (0,14-0,78), expressado pelo número total de marcadores SNP (Figura 12).

Os valores de $F_{st}$ expressos no *Dendrograma* e *heatmap* (Figura 12), acusam moderada diferenciação genética entre populações de uma mesma mesorregião, a exemplo temos valores moderados de $F_{ST}$ para as populações DI e OD (Norte de Minas Gerais); SM e SRM (região Metropolitana de BH); SS, AB e SSa (Campo das Vertentes), indicando que há fluxo gênico entre esses grupos populacionais (Figura 12).

Um dos principais motivos é que esses grupos populacionais estão em áreas próximas de uma mesma Mesorregião de Minas Gerais, facilitando o fluxo gênico entre os grupos. Contudo, valores de $F_{ST}$ superiores a 0,25 já indicam que as populações apresentam isolamento entre si, limitando assim, o fluxo gênico entre estas populações, isso ocorre inclusive, com populações de uma mesma mesorregião como é o caso das populações: GM, ITBO, ODMa, OD e DI (Norte de Minas Gerais); CTRA, OB e SM (região Metropolitana de BH); SA, AB, SB, SSa e SS (Campo das Vertentes), sendo que GM, CTRA e SA, são as populações mais isoladas geograficamente em relação às demais populações ocorrentes em uma mesma mesorregião.

Os maiores valores de $F_{st}$ foram verificados entre as populações GM (Norte de Minas Gerais) e SB (Campo das Vertentes) com ($F_{st}$ = 0,88); GM (Norte de Minas Gerais) e SM (região Metropolitana de BH) com ($F_{st}$ = 0,81) e GM (Norte de Minas Gerais) e DIMa (ao norte do Jequitinhonha) com ($F_{st}$ = 0,78) demonstrando uma grande diferenciação genética entre estas populações de diferentes mesorregiões de Minas Gerais (Figura 12).

Os menores valores de $F_{st}$ foram encontrados entre as populações AB e SS (Campo das Vertentes) com ($F_{st}$ = 0,09); AB e SSa (Campo das Vertentes) com ($F_{st}$ = 0,12); DI e OD (Norte de Minas Gerais) com ($F_{st}$ = 0,13); SM e SRM (região Metropolitana de BH) com ($F_{ST}$ = 0,13) e DIMa e OD (ao norte do Jequitinhonha e Norte de Minas Gerais) com ($F_{st}$ = 0,14) indicando

uma baixa e moderada diferenciação genética entre estas populações, com exceção de DIMa e OD que estão muito próximas geograficamente, distantes aproximadamente 16 Km, porém distribuídas em mesorregiões distintas, as demais populações que apresentaram moderado ($F_{ST}$) estão distribuídas por uma mesma mesorregião e próximas geograficamente.

Marques (2020) e Portella *et al.* (2021), também observaram padrões de diferenciação genética entre as populações de *L. pinaster* relacionando essa diferenciação com as mesorregiões de origem das populações estudadas. Marques (2020) observou uma maior diferenciação genética entre as populações GM (Norte de Minas Gerais) e AB (Campo das Vertentes) com ($F_{st}$ = 0,869), sendo que uma menor diferenciação genética ($F_{st}$ = 0,08) foi encontrada entre as populações SM e NLSC, ambas ocorrentes na mesorregião Metropolitana de BH. Portella *et al.* (2021) observaram que as populações de *L. pinaster* distribuídas pelas quatro mesorregiões de Minas Gerais, apresentaram grande diferenciação genética ($F_{st}$ = 0,35) entre as regiões de ocorrência destas populações. Os resultados obtidos neste estudo vão de encontro aos resultados obtidos por Marques (2020) e Portella *et al.* (2021).

Os índices médios de ($F_{st}$) por mesorregião confirmam a grande diferenciação genética interpopulacional de *L. pinaster*. O $F_{st}$ médio para as populações da mesorregião Norte de Minas Gerais foi $F_{st}$ = 0,46 sendo o maior valor por mesorregião, para a população do Norte do Jequitinhonha a média foi de $F_{st}$ = 0,35, para as populações da região Metropolitana de BH foi $F_{st}$ = 0,33 sendo esta, a menor média por mesorregião, e para as populações dos Campos das Vertentes, a média do ($F_{st}$) foi $F_{st}$ = 0,36. Os valores de $F_{st}$ indicam que há forte isolamento populacional em *L. pinaster*, contribuindo com a formação de *clusters* distintos.

As populações GM ($F_{st}$ = 0,67), ODMa ($F_{st}$ = 0,52) e ITBO ($F_{st}$ = 0,48) ambas oriundas da mesorregião Norte de Minas Gerais, apresentaram as maiores medias de ($F_{st}$). A população AB, oriunda da mesorregião dos Campo das Vertentes apresentou a menor média de ($F_{st}$) entre todas as populações com ($F_{st}$ = 0,28). Valores de $F_{st}$>0,2 são considerados altos e refletem em grande diferenciação genética, valores acima de $F_{st}$>0,5 pode significar em casos de populações panmíticas, grande diferenciação genética entre os indivíduos podendo estes, pertencer a unidades evolutivas distintas (MARQUES, 2020).

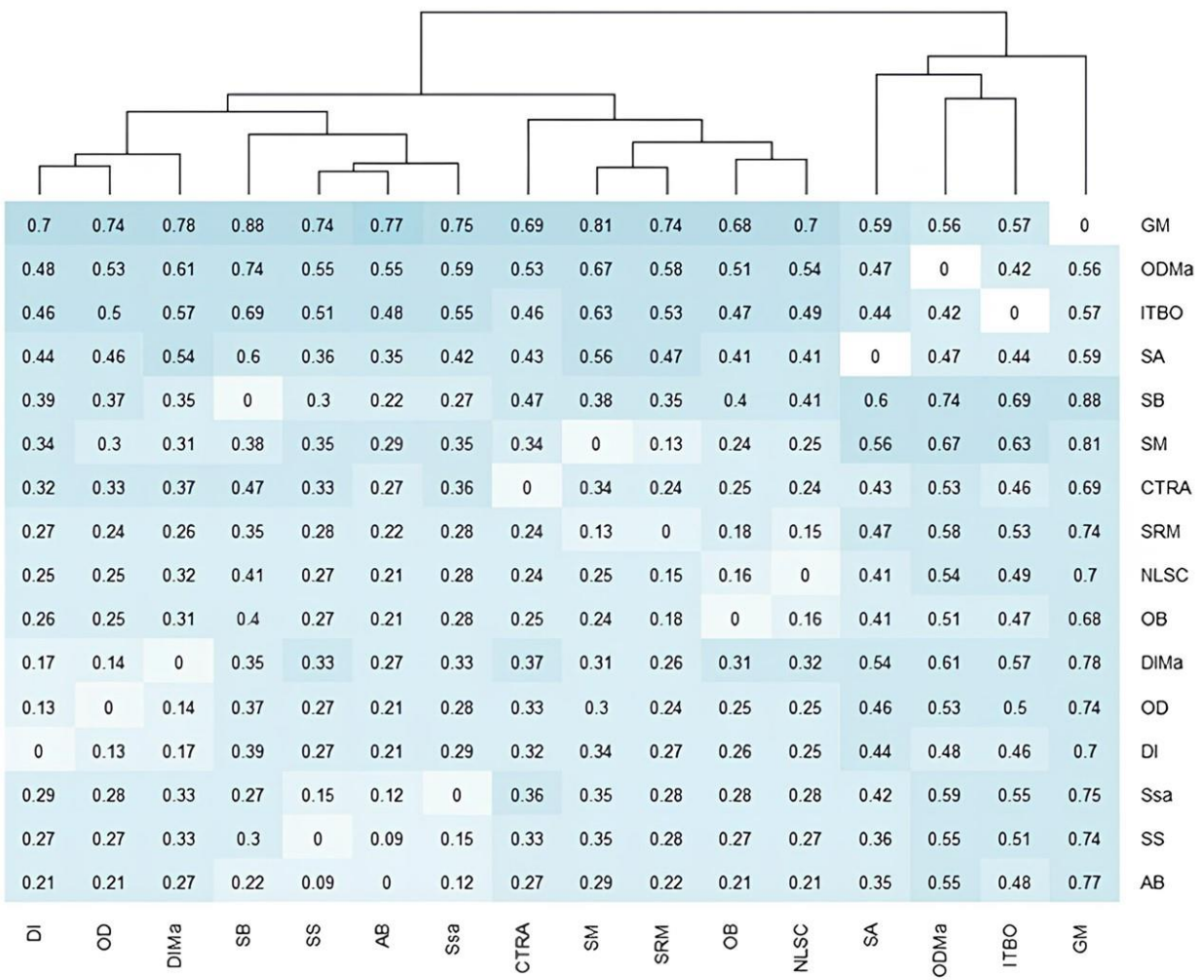



**Figura 12.** Dendograma e *heatmap* baseado no índice de fixação ($F_{st}$) de Wright expressando grande diferenciação entre as populações de *L. pinaster* ocorrentes em 4 mesorregiões do estado de Minas Gerais. GM: Grão Mogol, ITBO: Itacambira/Botumirim, DIMa: Diamantina, DI: Diamantina, OD: Olhos D'Água, ODMa: Olhos D'Água/Diamantina, CTRA: Caeté/Rio Acima, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, OB: Ouro Branco, SM: Serra da Moeda (SM), SEM: Serra do Rola Moça, AB: Areia Branca, SA: Serra da Arnica, SB: Serra Branca, SSa: Serra do Salto e SS: Serra do Sofá

As análises de componentes principais realizada com o intuito de verificar as condições de estruturação populacional de *L. pinaster* resultou no agrupamento das populações em função da distribuição destas populações por mesorregião. A PCAdapt é um pacote do R que expressa modelos de agrupamento e separação entre grupos populacionais funcionando de forma rápida quando se trata de análises de dados em larga escala (LUU *et al.,* 2017; PORTELLA *et al.,* 2021).

Os agrupamentos expressos pelo modelo PCAdapt (Figura 13) corroboram com os resultados encontrados por Marques (2020) que analisando a estrutura genética populacional de nove populações de *L. pinaster*, observou que as populações distribuídas por três mesorregiões, agruparam-se em função da sua distribuição, sendo formado, três grupos: GM, DIMa e OD (Norte de Minas Gerais); CTRA, NLSC e SM (região Metropolitana de BH) e AB, SA e SS (Campo das Vertentes). Portella *et al.* (2021), sugerem resultados de agrupamentos semelhantes para populações de *L. pinaster* de três mesorregiões de Minas Gerais, indicando que a distribuição geográfica destas populações, principalmente em altas altitudes, influenciam diretamente na diversidade e estrutura genética.

Nossos resultados, a partir do modelo PCAdapt, apontam para a formação de quatro grandes grupos genéticos em função da mesorregião de distribuição das populações (Figura 10). Estes padrões de agrupamentos genéticos em populações de espécies naturais e endêmicas, parecem seguir o seu curso natural de distribuição. Estudos realizados com espécies endêmicas dos gêneros *Pityopsis* (YUM, KIM, 2021) e *Saussurea* (HATMAKER *et al.,* 2018), ambos pertencentes a família Asteraceae, evidenciaram agrupamentos genéticos das populações estudadas em função da proximidade de ocorrência destas em suas respectivas regiões de distribuição.

Resultados semelhantes aos encontrados neste estudo e nos estudos realizados por Marques (2020) e Portella *et al.* (2021), foram verificados anteriormente por Haber (2008), que analisando dados de SSRs de três populações do Campo das Vertentes, verificou os padrões de agrupamentos entres as populações observando a diversidade e estrutura genética destas em relação a proximidade geográfica entre as suas áreas de ocorrência. Silva (2016) também analisou SSRs e verificou padrões de agrupamentos entre seis populações dos Campos das Vertentes, resultado semelhante ao encontrado por Haber (2008).

No presente estudo, podemos observar a formação de agrupamentos genéticos entre as populações, principalmente em função da proximidade geográfica de suas áreas de ocorrência independentemente da mesorregião, isso fica claro nos resultados obtidos pela análise realizada a partir do modelo de PCAdapt, onde a população DIMa (ao norte Jequitinhonha) se agrupa às populações DI, GM, OD e ODMa (Norte de Minas Gerais) (Figura 13).

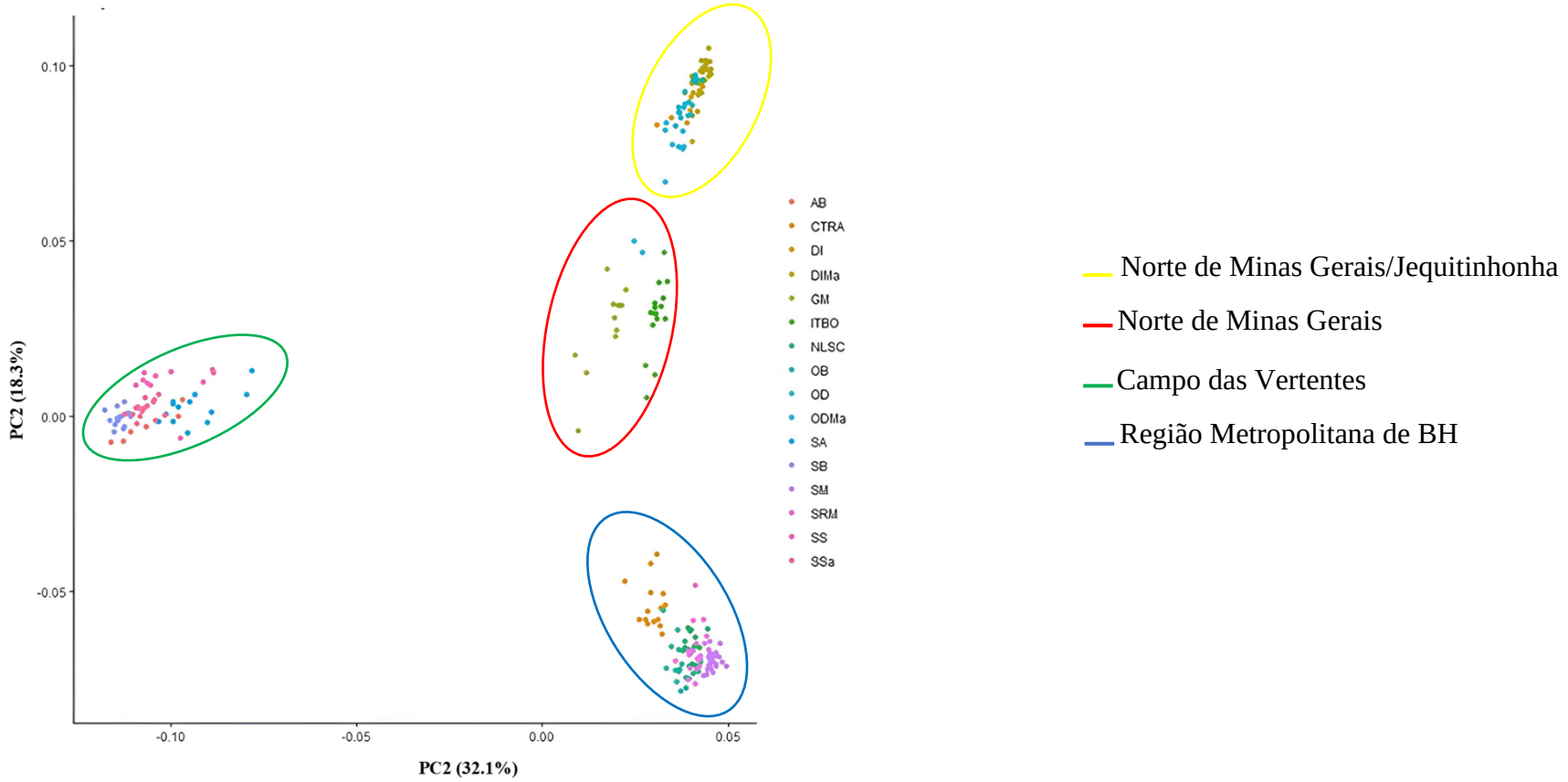



**Figura 13**. Estimativa do *modelo* PCAdapt *para f*ormação de quatro grupos genéticos entre *16* populações de *L. pinaster*. Grão Mogol (MG), Itacambira/Botumirim (ITBO), Diamantina (DIMa), Diamantina (DI), Olhos D'Água/Diamantina (ODMa) e Olhos D'Água (OD); Caeté/Rio Acima (CTRA), Nova Lima/Serra da Calçada (NLSC), Ouro Branco (OB), Serra da Moeda (SM) e Serra do Rola Moça (SRM); Areia Branca (AB), Serra da Arnica (SA), Serra Branca (SB), Serra do Salto (SSa) e Serra do Sofá (SS).

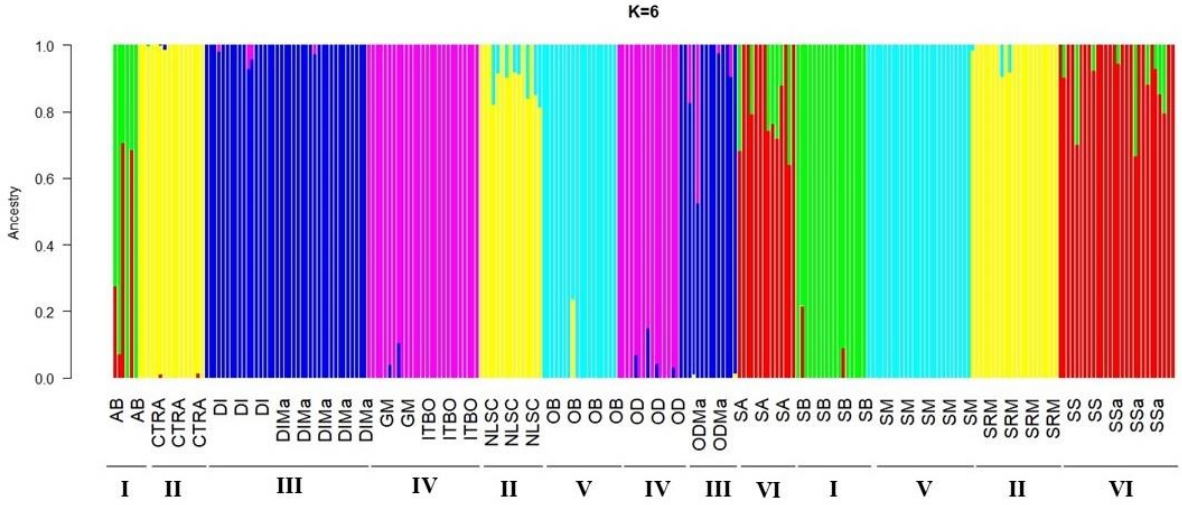
Para uma melhor elucidação da estruturação populacional de *L. pinaster*, foi aplicado o teste de *Admixture* que leva em consideração o coeficiente de ancestralidade. Os resultados obtidos através deste teste traduzem a história evolutiva da espécie, fato que explica a relação de fluxo gênico entre as subpopulações estudadas.

A análise de *Admixture* com o valor de K=6 (A) (Figura 14) é a que melhor explica a distribuição das subpopulações de *L. pinaster* sendo coerente com a distribuição real das populações em suas diferentes áreas de ocorrência. Foram verificados seis grupos genéticos (entre as populações dentro das mesorregiões representados por cada cor visualizada no gráfico (Figura 14)). Observou-se o compartilhamento de alelos de SNPs, principalmente entre as populações de uma mesma mesorregião e áreas próximas como no caso de DIMa que pertence à mesorregião Jequitinhonha (Diamantina) e compartilha alelos com as populações DI e ODMa pertencentes à mesorregião Norte de Minas Gerais (Diamantina/Olhos D'Água (Grupo - III)) apresentando mínimo compartilhamento de alelos com as populações mais distantes geograficamente (GM e ITBO (Grupo - IV)).

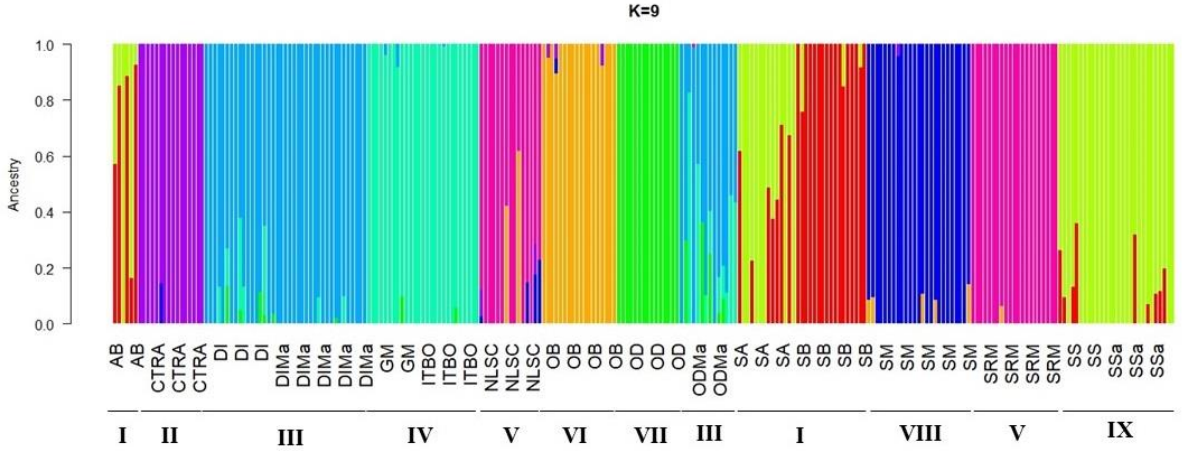
As populações ocorrentes na mesorregião do Campo das vertentes apresentam compartilhamento de alelos e fluxo gênico mais exclusivos entre si, o que pode ser observado pela formação dos grupos genéticos I – AB e SB, e VI – SA, SS e SSa (Figura 14, K=6 (A)). Resultados semelhantes são encontrados para populações desta mesma mesorregião, nos estudos realizados por Haber (2008) e Silva (2016) analisando dados de microssatélites e nos estudos desenvolvidos por Marques (2020) e Portella *et al.* (2021) utilizando dados de marcadores SNPs.

As análises de *Admixture* com K=6 (A) (Figura 14) demonstram neste estudo, um resultado diferente do encontrado por Marques (2020) para as populações ocorrentes na mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte, ao contrário dos resultados encontrados por esta autora. Nossos resultados apresentam um grande compartilhamento de alelos de SNPs entre as populações da mesorregião Metropolitana de Belo Horizonte, o que corrobora com os resultados apresentados por Portella *et al.* (2021) para populações provenientes desta mesma mesorregião do estado de Minas Gerais.

A análise de *Admixture* revela o compartilhamento mínimo ou nulo de alelos de SNPs entre as populações de diferentes mesorregiões do estado de Minas Gerais, estando o fluxo gênico, quase que exclusivo entre populações próximas espacialmente em uma mesma mesorregião (AB e SB – Grupo I, SA, SS e SSa – Grupo VI, K=6 (A)) ou áreas próximas de mesorregiões diferentes (DIMa, DI e ODMa – Grupo III, K=6 (A)) (Figura 14). Adicionalmente, foi realizada uma nova análise de *Admixture* considerando K=9 (B) onde foi observada maior complexidade para a estrutura populacional de *L. pinaster* (Figura 14).




**(A)**




**(B)**

**Figura 14.** Teste *Admixture* de 16 Populações de *Lychnophora pinaster* do estado de Minas Gerais. (**A**). K=6, grupos genéticos de **I-VI** e (**B**). K=9, grupos genéticos de **I-IX**. AB: Areia Branca, CTRA: Caeté/Rio Acima, DI: Diamantina, DIMa: Diamantina, GM: Grão Mogol, ITBO: Itacambira/Botumirim, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, OB: Ouro Branco, OD: Olhos D'Água, ODMa: Olhos D'Água/Diamantina, SA: Serra da Arnica, SB: Serra Branca, Serra da Moeda, SRM: Serra do Rola Moça, SS: Serra do Sofá, SSa: Serra do Salto.

A análise adicional de *Admixture* considerando K=9 (B) (Figura 14), revelou maior complexidade com relação a estruturação populacional de *L. pinaster* para as quatro mesorregiões de Minas Gerais. A análise em questão apresenta uma maior intensidade no fluxo gênico entre as populações de uma mesma mesorregião. Para esta análise foi verificada a formação de nove grupos genéticos distribuídos pelas dezesseis populações estudadas, revelando as relações genéticas por populações distribuídas por áreas próximas dentro de suas mesorregiões de origem.

Em K=9 (B) (Figura 14), é possível observar o isolamento das populações oriundas do Campo das Vertentes, o que corrobora com os resultados obtidos anteriormente por Haber (2008) e Silva (2016), que analisaram dados de microssatélites para populações desta mesorregião, além de convergir com os resultados apresentados por Marques (2020) e Portella *et al*. (2021) que analisaram dados de marcadores SNPs e observaram que as populações ocorrentes no Campo das Vertentes, não compartilham nenhum SNP com outra população de uma mesorregião diferente.

O isolamento e a fragmentação de habitats por ações antrópicas ou geológicas, bem como a estrutura geográfica de habitats, afetam o fluxo gênico e por consequência a frequência alélica (GARNIER-GÉRÉ, CHIKHI, 2013; MARQUES, 2020). As populações que se apresentam mais isoladas são as ocorrentes na região Metropolitana de Belo Horizonte, CTRA e SRM são as populações com maiores altitudes registradas (1498m aproximadamente). As grandes altitudes e áreas acidentadas junto a intensa atividade mineradora, podem ser fatores importantes que limitam o fluxo gênico entre as populações desta mesorregião (MARQUES, 2020).

As distâncias médias entre as populações também podem ser um dos fatores que influem na dinâmica do fluxo gênico entra as populações de uma mesma mesorregião. As populações do Campo das Vertentes são as que apresentam as menores distâncias médias (41,8 Km) e o menor número médio de alelos privados quando comparada as populações de outras mesorregiões ($A_P$=118).

Esse resultado é semelhante ao encontrado por Marques (2020) para populações do Campo das Vertentes. A distância entre populações pode ser um fator fundamental e determinante dos níveis de fluxo gênico. Este fator, interfere dentre muitos aspectos, nos mecanismos de polinização de diversas espécies vegetais. Para Govindaraju (1988), os mecanismos de polinização são uns dos principais fatores para a determinação dos níveis de fluxo gênico entre populações vegetais, os polinizadores, insetos como: moscas, abelhas e borboletas, insetos de voo curto, estão envolvidos diretamente na troca de informações genéticas entre populações espacialmente próximas (MARIOT *et al.*, 2002; MONTANARI,

2011; HOELTGENBAUM *et al.,* 2015). No caso das populações de *L. pinaster* estudadas, Campos (2014) constatou como potenciais polinizadores para populações de *L. pinaster* para a região de Carrancas e Itumirim, as espécies de abelhas *Bombus morio* (Swederus) e *Xylocopa frontalis* (Olivier), bem como outros insetos com potencial comportamento polinizador (MARQUES, 2020).

As populações oriundas da região Metropolitana de BH, apresentam distâncias médias moderadas (51 Km), porém, estas encontram-se em áreas acidentadas, antropizadas e com grandes altitudes. Isso pode ter contribuído para que as populações desta mesorregião apresentassem o maior número médio de alelos privados ($A_P$=534). Marques (2020) também encontrou resultados semelhantes para estas populações.

Portella *et al.* (2021) afirmam que as grandes altitudes encontradas nas áreas de ocorrência de populações de *L. pinaster* na região Metropolitana de Belo Horizonte podem ser um fator determinante para a grande diferenciação genética entre estas populações e as demais populações oriundas de outras mesorregiões do estado de Minas Gerais.

Para tentar compreender melhor as características e dinâmica da estrutura populacional de *L. pinaster*, foi realizada uma análise discriminante de componentes principais (DAPC) que revelou a formação de nove grupos genéticos (Figura 15).

Os resultados observados após a Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC), expressaram maior complexidade na composição da estrutura genética das populações de *L. pinaster*, como na análise adicional de *Admixture* com K=9 (B) (Figura 14). Podemos observar a formação de um número maior de grupos genéticos com maior complexidade para a estrutura populacional. A análise de DAPC, assim como em resultados obtidos por Marques (2020) para um conjunto de dados genéticos a partir da análise de marcadores SNPs em populações de *L. pinaster* de 4 mesorregiões de Minas Gerais, a análise (DAPC) maximiza as diferenças entre as populações amostradas comportando-as em grupos genéticos distintos.

Neste estudo, após as análises realizadas, tanto os resultados observados via *Admixture* (considerando K=6 ou K=9), ou estimativas a partir do PCAdapt com análise de componentes principais e análise discriminante de componentes principais (DAPC), pode-se observar que as populações de *L. pinaster* se distribuem em função das mesorregiões do estado de Minas Gerais. Estes resultados corroboram fortemente com os resultados presentes nos estudos realizados por Haber (2008) e Silva (2016) que analisaram dados de microssatélites, e Marques (2020) e Portella *et al.* (2021) que analisaram dados de marcadores SNPs.

Nossos resultados reforçam a importância do desenvolvimento de estudos que visem o acréscimo de conhecimentos sobre as características da composição e estruturação genética das populações de *L. pinaster* ocorrentes nas quatro mesorregiões de Minas Gerais estudadas. A

forte estruturação destas populações e a grande diferenciação genética expressa pelos índices de diversidade genética e o $F_{st}$ evidenciam o comportamento das diversas populações dentro de suas áreas de origem, os padrões de agrupamentos genéticos por região e proximidade geográfica sinalizam para os possíveis fatores, tais como altitude, temperatura, clima, ação antrópica por meio da fragmentação de habitats, condições geológicas e ecológicas que podem estar pressionando as grupos de populações a se adaptarem às condições ambientais em suas áreas de ocorrência.

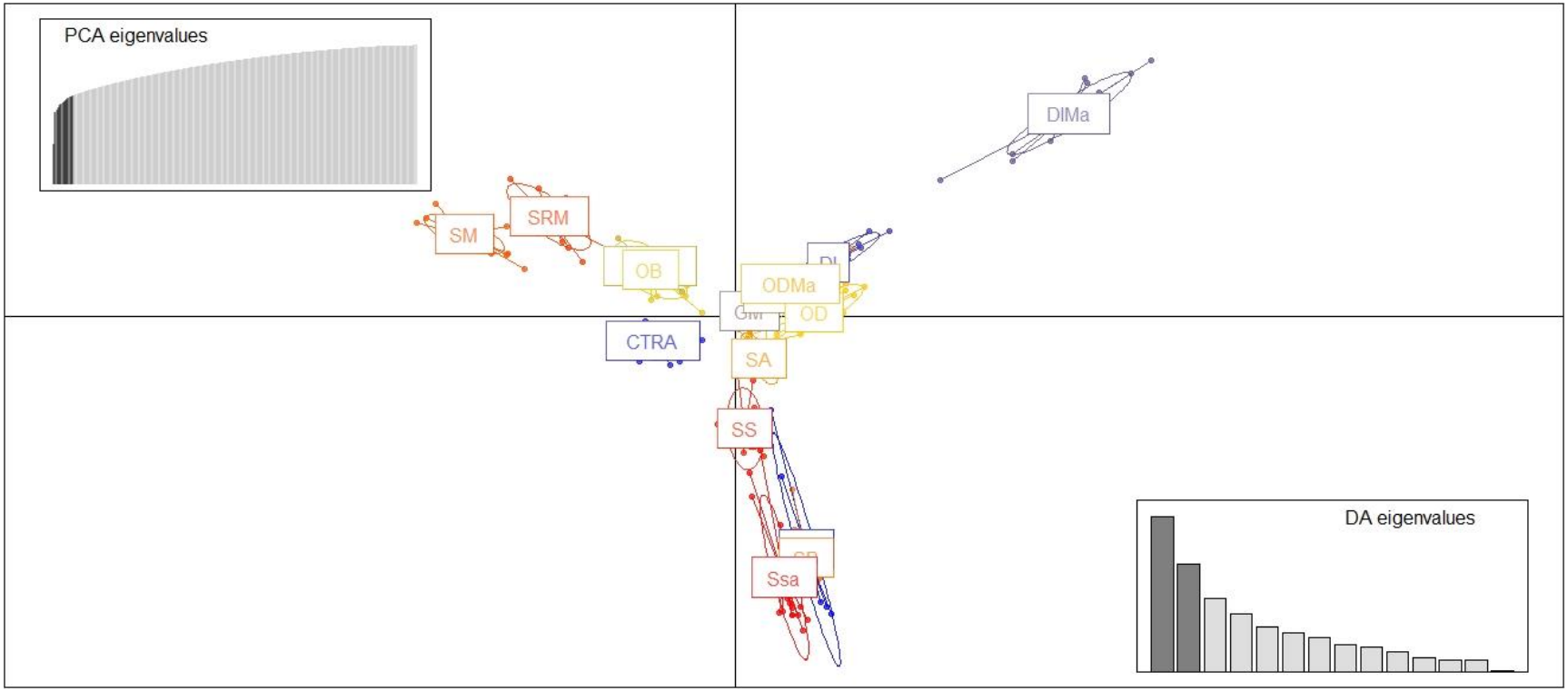



**Figura 15.** Análise discriminante (DAPC) a partir de SNPs de 16 populações de *Lychnophora pinaster*. AB: Areia Branca, CTRA: Caeté/Rio Acima, DI: Diamantina, DIMa: Diamantina, GM: Grão Mogol, ITBO: Itacambira/Botumirim, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, OB: Ouro Branco, OD: Olhos D'Água, ODMa: Olhos D'Água/Diamantina, SA: Serra da Arnica, SB: Serra Branca, SM: Serra da Moeda, SRM: Serra do Rola Moça, SS: Serra do Sofá, SSa: Serra do Salto.

### 3.4. Compostos químicos de óleos essenciais compartilhados entre populações de *Lychnophora pinaster Mart.*

Os estudos já realizados apontaram para uma grande diversidade quanto a composição química dos óleos essenciais dentro e entre as populações de arnica em quatro mesorregiões de Minas Gerais (HABER, 2008; ISOBE, 2012; SILVA, 2013; SILVA, 2016; MARQUES, 2020; PORTELLA *et al.*, 2021).

As populações se agrupam de acordo com as suas afinidades químicas, sendo que para todas as populações ocorrentes na mesorregião Campo das Vertentes, foram observadas a presença de compostos da classe dos fenilpropanóides como substâncias majoritárias, enquanto para as populações ocorrentes nas mesorregiões Jequitinhonha, Norte de Minas e Metropolitana de Belo Horizonte, foram reportados compostos da classe dos sesquiterpenos como substâncias majoritárias (Figura 16).

Foram estudadas um total de oito populações oriundas da mesorregião do Campo das Vertentes, quatro populações da região Metropolitana de Belo Horizonte, duas populações oriundas da mesorregião Norte de Minas Gerais e uma população da mesorregião Jequitinhonha (Figura 16).

A população que menos compartilhou compostos foi a população Serra da Moeda (SM) compartilhando apenas uma substância (o α-pineno) com outras nove populações das quatro mesorregiões. As populações do Campo das Vertentes foram as que mais compartilharam compostos entre si (dois), Areia Branca (AB) foi a população que mais compartilhou compostos com as demais populações desta mesorregião, sendo cinco compostos compartilhados com Serra do Salto (SSa), quatro compostos com Serra da Arica (SA) e Serra Branca (SB), três compostos com as populações: Antena (ANT), Poço Bonito (PB), Estrada Real (ERE) e Serra do Sofá (SSo) (Tabela 7).

As populações das mesorregiões Jequitinhonha e Norte de Minas compartilharam apenas um composto entre si (α-humuleno), o que também foi observado para as populações da região Metropolitana de Belo Horizonte, que compartilham entre si, apenas um composto, o (α-pineno) (Tabela 7).

Cinco substâncias majoritárias foram restritas, estando presentes exclusivamente em quatro populações: duas populações da mesorregião Norte de Minas (Grão Mogol – GM com a substância *trans*-cariofileno e Olhos D'Água – OD com a substância esquamulosona), uma população ocorrente ao norte do Jequitinhonha (Diamantina – DIMa com a substância 14-acetoxi-4,5-dehidro-cariofileno) e uma população oriunda da mesorregião região Metropolitana de Belo Horizonte (Caeté/Rio Acima – CTRA com as substâncias 1,7-diepi-α-cedrenal e o (Z)-nerolidol) (Tabela 7).

As substâncias mais compartilhadas entre as populações independente de sua região de ocorrência foram o (α-humuleno), compartilhado por 13 populações, distribuídas pelas quatro mesorregiões, e o (α-pineno) que foi compartilhado por 10 populações das quatro mesorregiões de Minas Gerais, para o Campo das Vertentes (Sul) de Minas Gerais, o *trans*-cinamato de metila foi a substâncias restritas, exclusivamente compartilhada entre as populações ocorrentes nesta mesorregião. A substância (14-hidroxi-Z-cariofileno) está presente apenas em duas populações da região Metropolitana de BH, e a substância (ácido-14-oico-α-humuleno) foi compartilhada apenas por duas populações, uma ao norte do Jequitinhonha e a outra do Norte de Minas (Tabela 7).

As populações ocorrentes nas mesorregiões Jequitinhonha, Norte de Minas e região Metropolitana de Belo Horizonte, compartilham substâncias das classes dos monoterpenos e sesquiterpenos, sendo que, foram identificadas cinco substâncias únicas para quatro populações das três mesorregiões (Tabela 7), sendo estes compostos, pertencentes à classe dos sesquiterpenos.

As populações oriundas do Campo das Vertentes, apresentam substâncias da classe dos fenilpropanóides compartilhadas exclusivamente entre si (Tabela 7). Esse resultado também foi encontrado nos estudos realizados por Haber (2008), Reis *et al.* (2010), Isobe (2012), Resende (2013) e Silva (2013, 2016), que relatam a ocorrência de compostos da classe dos fenilpropanóides como constituintes majoritários dos óleos essenciais de populações de *L. pinaster* do Campo das Vertentes.

As 15 populações de *L. pinaster* estudadas, compartilham entre si ao menos uma substância majoritária. Estes compostos apresentam variação em função das populações, sendo que em muitos casos, estes são incomuns entre populações de uma mesma região. Este padrão de composição química para os óleos essenciais de *L. pinaster* foi observado por Marques (2020). As populações do Norte de Minas, Jequitinhonha e região Metropolitana de Belo Horizonte compartilham quatro compostos o que reflete o agrupamento destas, observados na Figura 16.

As populações DIMa e OD, e AB e SSa, populações das mesorregiões Jequitinhonha, Norte de Minas Gerais e Campo das Vertentes respectivamente, compartilharam um número maior de substâncias entre si dentro dos seus grupos por mesorregião e proximidade geográfica, por isso, estas formam os únicos grupos irmãos relacionados diretamente ao compartilhamento de substâncias majoritárias (Figura 16).

Os agrupamentos observados nas Figuras 16 e 17 se assemelham aos resultados encontrados após análises de estrutura e genética de populações para dezesseis populações, com as populações do Campo das Vertentes apresentando padrão de compartilhamento de

características em função da sua mesorregião de ocorrência, proximidade geográfica, além de suas afinidades químicas e genéticas. As populações DIMa, OD, GM, CTRA, OB, NLSC e SM oriundas das mesorregiões Jequitinhonha; Norte de Minas Gerais e região Metropolitana de Belo Horizonte respectivamente, apresentam compartilhamento de substâncias, porém não agrupam-se em função de sua distribuição geográfica. Marques (2020) observou as mesmas características para o agrupamento destas populações, onde estas não apresentaram padrão em função da região geográfica, apesar de compartilharem muitos compostos cada população apresentou um grupo de substâncias diferentes que não foram compartilhadas com as demais.

Fatores ambientais e distribuição geográfica podem exercer influência direta na composição química de óleos essenciais (EL ALAM *et al.*, 2019; SUGIER *et al.*, 2019). Isso pode explicar a variação da composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster*, principalmente para as populações de diferentes regiões geográficas.

Portella *et al.* (2021) observaram a influência direta dos gradientes de altitudes na composição química dos óleos essenciais de populações de *L. pinaster* distribuídas pelas mesorregiões Norte de Minas e região Metropolitana de Belo Horizonte, evidenciando divergências na composição química das populações destas duas mesorregiões. Estudos realizados com outras espécies e gêneros pertencentes a família Asteraceae como *Helichrysum italicum* (Roth) Don. em Tundis *et al.* (2005), *Artemisia saharae* Pomel. em Zauri *et al.* (2014), *Matricaria* sp. em Sharifi-Rad *et al.* (2018) e *Arnica montana* L. em Sugier *et al.* (2019), também buscaram evidenciar a influência de fatores ambientais e distribuição geográfica na composição química do óleo essencial de indivíduos de diversas populações distribuídas por regiões diferentes.

Populações oriundas das mesorregiões Norte de Minas, Jequitinhonha e região Metropolitana de Belo Horizonte se agrupam (Figura 16) por compartilharem um maior número de compostos se comparadas a região dos Campos das Vertentes (Tabela 7), mesmo estas apresentando divergências químicas como visto em Portella *et al.* (2021).

As populações da região Metropolitana de Belo Horizonte não apresentam agrupamento, estas apresentam divergência na composição química dos óleos essenciais segundo Marques (2020) e Portella *et al.* (2021). DIMa, OD e NLSC, mesmo estando localizadas em regiões distintas se mostraram quimicamente similares isolando-se e agrupando-se (Figuras 16 e 17), Marques (2020) observou o mesmo comportamento para estas mesmas populações.

O único grupo de populações que realmente se mostram quimicamente similares são as populações oriundas do Campo das Vertentes. Estas formam grupos isolados em relação as populações das outras regiões (Figuras 16 e 17). Em Haber (2008), Isobe (2012) e Silva (2013,

2016) foram verificados resultados semelhantes, onde as populações da região do Campo das Vertentes compartilham entre si, compostos da classe dos fenilpropanóides (Figura 16).

**Tabela 7.** Substâncias majoritárias compartilhadas entre quinze populações de *Lychnophora pinaster* Mart., ocorrentes em quatro mesorregiões de Minas Gerais.

| **Substâncias/compostos** | **Mesorregião: CV** | | | | | | | | **Mesorregião: JEQ** | **Mesorregião: N/MG** | | **Mesorregião: RMBH** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **ANT** | **AB** | **PB** | **SA** | **SB** | **SSa** | **SSo** | **ERE** | **DIMa** | **GM** | **OD** | **CTRA** | **OB** | **NLSC** | **SM** |
| *trans*-cinamato de metila | x | x | x | x | x | x | x | x | a | a | a | a | a | a | a |
| α-humuleno | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | a | x | x | a |
| cedr-8(15)-en-9-α-ol | x | a | a | x | x | a | a | a | a | a | a | x | a | a | a |
| *trans*-cariofileno | a | x | x | x | x | x | x | x | a | x | a | a | a | a | a |
| 14-hidroxi-Z-cariofileno | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | x | x | a | a |
| 14-hidroxi-α-humuleno | a | a | a | a | a | a | a | a | x | x | a | x | x | x | a |
| α-pineno | a | x | a | x | x | x | a | a | x | x | a | x | x | x | x |
| ácido-14-oico-α-humuleno | a | a | a | a | a | a | a | a | x | a | x | a | a | a | a |
| esquamulosona | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | 1 | a | a | a | a |
| 14-acetoxi-4,5-dehidro-cariofileno | a | a | a | a | a | a | a | a | 1 | a | a | a | a | a | a |
| (Z)-nerolidol | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | 1 | a | a | a |
| 14-acetoxi-α-humuleno | a | a | a | a | a | a | a | a | x | a | x | x | a | x | a |
| 1,7-diepi-α-cedrenal | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | 1 | a | a | a |

x= substância/composto compartilhado; a=substância/composto ausente; 1=substância/composto única(o)/restrita(o). **CV=** Campo das Vertentes - ANT: Antena, AB: Areia Branca, PB: Poço Bonito, SA: Serra da Arnica, SB: Serra Branca, SSa: Serra do Salto, SSo: Serra do Sofá, ERE: Estrada Real; **JEQ=** Jequitinhonha - DIMa: Diamantina; **N/MG=** Norte de Minas Gerais - GM: Grão Mogol, OD: Olhos D'Água; **RMBH=** Região Metropolitana de Belo Horizonte - NLSC: CTRA: Caeté/Rio Acima, OB: Ouro Branco, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, SM: Serra da Moeda.

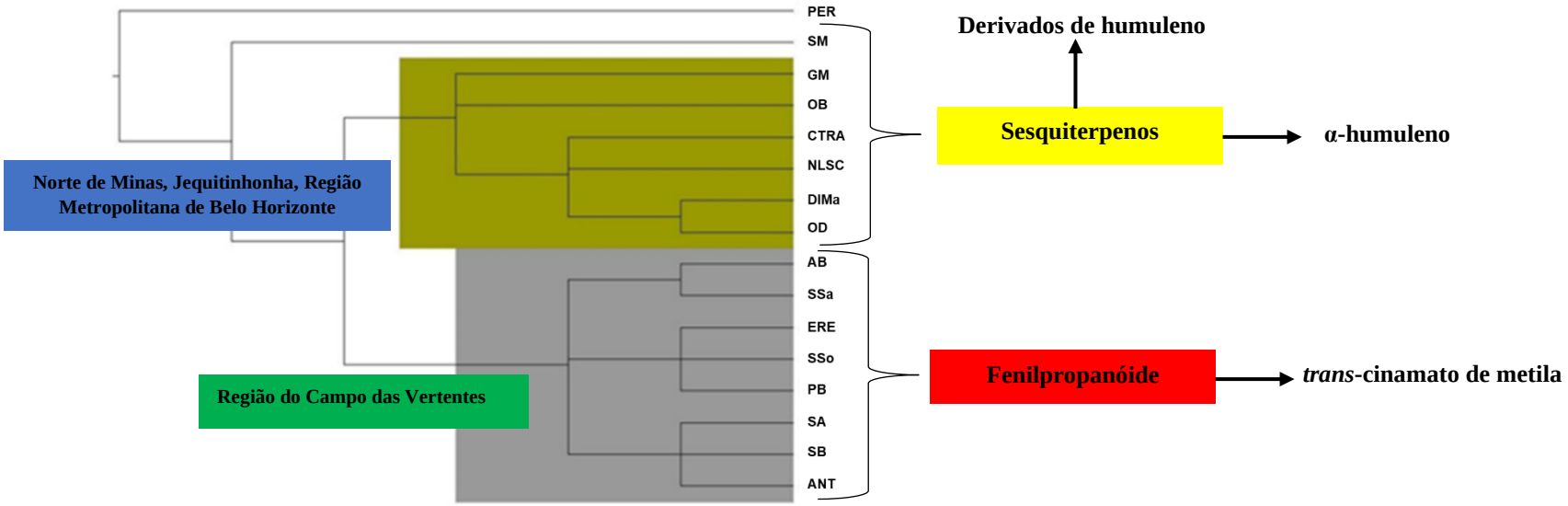



**Figura 16.** Dendrograma de similaridade química dos óleos essenciais de 15 populações de *Lychnophora pinaster* Mart.. ANT: Antena, AB: Areia Branca, ERE: Estrada Real, CTRA: Caeté/Rio Acima, DIMa: Diamantina, GM: Grão Mogol, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, OB: Ouro Branco, OD: Olhos D'Água, PB: PER: *L. ericoides* – Grupo externo, Poço Bonito, SA: Serra da Arnica, SB: Serra Branca, SM: Serra da Moeda, SSa: Serra do Salto, SSo: Serra do Sofá.

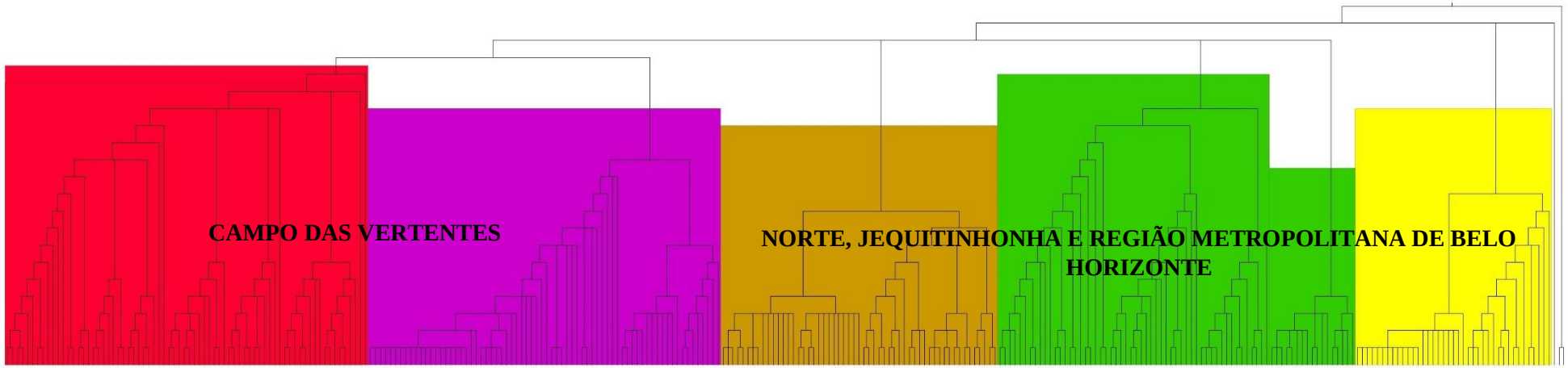



**Figura 17.** Dendrograma baseado em 154 compostos químicos presentes nos óleos essenciais de 15 populações de *Lychnophora pinaster* Mart. das regiões Norte, Metropolitana de Belo Horizonte e Campo das Vertentes do estado de Minas Gerais. Os agrupamentos refletem o compartilhamento de substâncias entre as populações.

A análise de agrupamento (Figura 18), apresentou a formação de dois grupos distintos entre as populações com CTRA se isolando das demais populações (Figuras 18 e 19). Nos estudos realizados por Marques (2020) e Portella *et al*. (2021), foram observados resultados muito próximos ao resultado apresentado neste estudo, com as populações da região Metropolitana de Belo Horizonte não se agrupando entre si. Em nosso estudo, observamos que CTRA, SM e GM se mostram quimicamente diferentes das demais populações ocorrentes em suas respectivas regiões, o mesmo resultado foi observado por Marques (2020).

As populações SM e GM, apesar de serem diferentes quimicamente, foram agrupadas em um grupo contendo populações do Norte de Minas, Jequitinhonha e região Metropolitana de Belo Horizonte não se dispersando como CTRA que permaneceu isolada das demais (Figura 18). As populações da região dos Campos das Vertentes são as que mais se assemelham quimicamente, elas se agrupam em um grande grupo que abriga populações que se sobrepõem quimicamente (Figura 18).

Haber (2008) e Silva (2013, 2016) demonstraram que as populações do Campo das Vertentes são similares quimicamente, sendo totalmente diferentes das populações das mesorregiões Jequitinhonha, Norte de Minas e região Metropolitana de Belo Horizonte.

Portella *et al.* (2021) observou grande divergência química na composição dos óleos essenciais de populações ocorrentes nas mesorregiões Norte de Minas e região Metropolitana de Belo Horizonte. Em nosso estudo, as populações da região Metropolitana de Belo Horizonte se mostram as mais dissimilares em aspectos químicos dos óleos essenciais, não agrupando-se em função da distribuição geográfica (Figura 19). Este aspecto pode estar relacionado diretamente a fatores ambientais que afetam não só as características químicas, mas também as características genéticas, no caso destas populações, fatores como altitude variando entre 1366m a 1497m, variáveis climáticas e pressão antrópica em suas áreas de ocorrência, parecem exercer grande influência em suas dinâmicas (MARQUES, 2020, PORTELLA *et al*., 2021).

A população NLSC da região Metropolitana de Belo Horizonte se mostrou próxima quimicamente das populações ocorrentes nas mesorregiões Jequitinhonha e Norte de Minas. Marques (2020) observou o mesmo resultado para as populações DIMa, OD e NLSC que ficam em três mesorregiões distintas, com distância aproximada entre elas de 273Km.

A análise de componentes principais (PCA) (Figura 19) revelou um resultado muito próximo ao observado na análise de agrupamento (Figura 18). As populações se posicionaram em função dos principais compostos compartilhados ou compostos unicamente presentes em uma determinada população independentemente de sua distribuição por região ou até mesmo por proximidade geográfica. Assim, pode-se observar a população CTRA novamente mantendo-se isolada em função da presença de duas substâncias o 1,7-diepi-α-cedrenal e o (Z)-

nerolidol que são restritas a esta população. A população GM que está localizada na região Norte de Minas se posicionou próxima as populações NLSC e OB com as quais compartilha um maior número de substâncias se comparada com as demais populações da região Norte de Minas e Jequitinhonha (DIMa e OD) que se aproximam em função do compartilhamento do ácido-14-oico-α-humuleno.

As populações ocorrentes nas mesorregiões Norte de Minas Gerais, Jequitinhonha e região Metropolitana de Belo Horizonte, compartilham entre si muitos compostos derivados do (humuleno) e compostos da classe dos sesquiterpenos. Silva (2016) encontrou como resultado a formação de três grupos quando analisou a dissimilaridade química entre populações do Campo das Vertentes e uma população da região Metropolitana de Belo Horizonte sendo dois sesquiterpenos não identificados, os compostos majoritários que diferem as populações das duas regiões.

Marques (2020) também reporta a predominância de compostos da classe dos sesquiterpenos como constituintes predominantes nos óleos essenciais de populações de *L. pinaster* das regiões Norte de Minas e região Metropolitana de Belo Horizonte, muitos destes compostos, são compartilhados entre as populações destas regiões.

Assim como na análise de agrupamento, as populações do Campo das Vertentes se sobrepõem na análise de componentes principais (PCA) (Figura 19). Estas compartilham unicamente entre si o *trans*-cinamato de metila substância da classe dos fenilpropanóides. As populações oriundas da mesorregião do Campo das Vertentes (Sul) de Minas Gerais, estão localizadas em áreas de relevo mais ameno e apresentam a menor distância média (41,8Km) entre as populações dentro das mesorregiões. Estes fatores podem favorecer a grande similaridade e compartilhamento de compostos químicos presentes no óleo essencial das populações desta região. Haber (2008) e Silva (2013, 2016) estudaram a composição química dos óleos essenciais de populações de *L. pinaster* da região do Campo das Vertentes, indicando que estas são similares quimicamente.

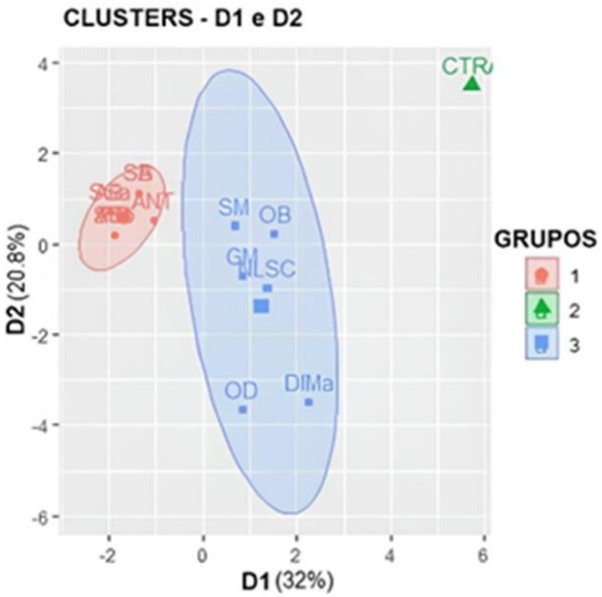



**Figura 18.** Análise de *clusters* baseada no Algorítimo de Agrupamento *Kmeans* para populações de *Lychnophora pinaster*, sendo tomado como quantidade ótima de *clusters*, o K=3. ANT: Antena, AB: Areia Branca, ERE: Estrada Real, PB: Poço Bonito, SA: Serra da Arnica, SSa: Serra do Salto, SS: Serra do Sofá; CTRA: Caeté/Rio Acima, DIMa: Diamantina, OD: Olhos D'Água, GM: Grão Mogol, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, OB: Ouro Branco e SM: Serra da Moeda.

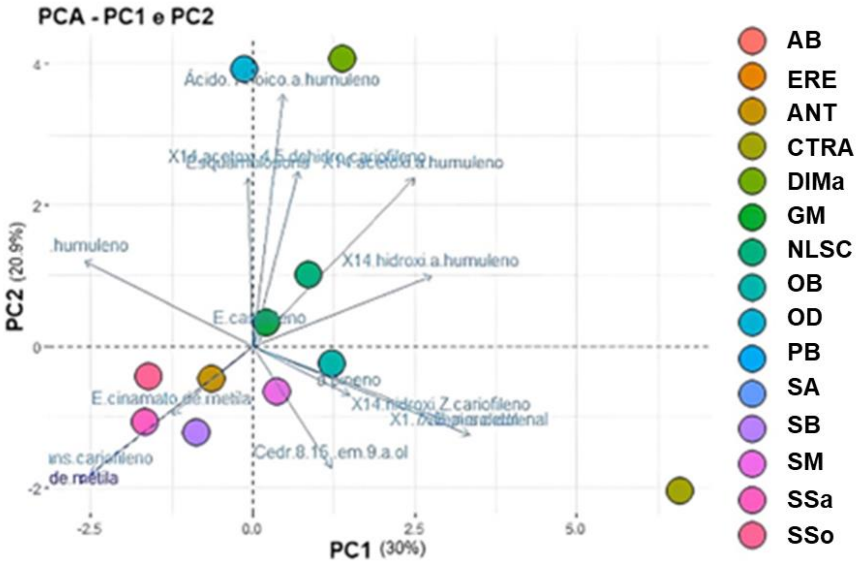



**Figura 19.** Análise de componentes principais (PCA) a partir das substâncias majoritárias compartilhadas pelas 15 populações de *Lychnophora pinaster* Mart. ANT: Antena, AB: Areia Branca, ERE: Estrada Real, PB: Poço Bonito, SA: Serra da Arnica, SSa: Serra do Salto e Serra do Sofá, CTRA: Caeté/Rio Acima, NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, OB: Ouro Branco, SM: Serra da Moeda, OD: Olhos D'Água, GM: Grão Mogol, DIMa: Diamantina.

## 4. CONCLUSÃO

Os estudos realizados para diversidade e estrutura genética populacional utilizando-se análises de marcadores microssatélites – SSRs ou SNPs para as dezesseis populações de *Lychnophora pinaster* Mart. estudadas até então, apontam para populações muito bem estruturadas, e com grande diversidade genética interpopulacional.

As populações de *L. pinaster* apresentam uma diferenciação genética maior em função da distância geográfica por conta do fluxo gênico mais frequente, estando estas populações muito próximas geograficamente dentro de uma mesma região.

Para as dezesseis populações apresentadas neste estudo, as características de estrutura e diversidade genética evidenciam uma forte separação entre as populações dos campos das vertentes (Sul), das demais populações ocorrentes nas regiões Norte de Minas Gerais, Jequitinhonha e Região Metropolitana de Belo Horizonte.

Os estudos dos aspectos da composição química dos óleos essenciais de 307 indivíduos distribuídos por 15 populações de *L. pinaster* ocorrentes em quatro regiões do estado de Minas Gerais, indicaram para uma grande diversidade química entra as populações de diferentes regiões, estando esta diversidade presente entre muitas populações dentro de uma mesma região, o que pode ser observado entre as populações da região Metropolitana de Belo Horizonte, e Grão Mogol em relação às populações Diamantina e Olhos D'Água situadas na região Norte de Minas Gerais.

A composição química dos óleos essenciais das populações do Campo das Vertentes apresentou similaridade. Os seus indivíduos compartilham diversos compostos químicos o que evidencia a grande similaridade química entre as populações desta região, sendo observada em formação de um único agrupamento.

As populações apresentaram comportamentos similares quando comparadas para agrupamentos em função de suas regiões de ocorrências, tanto para características químicas, quanto genéticas. Estas parecem se comportar por afinidades e similaridades compartilhadas em sua grande maioria, por grupos de indivíduos que ocupam uma mesma região geográfica em áreas próximas distribuídas pelas quatro regiões de Minas Gerais.

Espera-se que os resultados encontrados até o momento possam sugerir a realização de novas pesquisas que visem acrescentar maiores contribuições acerca do conhecimento sobre *L. pinaster*, e assim, futuramente novos projetos para o manejo desta espécie endêmica do estado de Minas Gerais, possam ser propostos.

## 5. REFERÊNCIAS

ALEXANDER, D.H; NOVEMBRE, J; LANGE, K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome Research**, v.19(9), 2009.

ATHAYDE, A.L; RICHETTI, E; WOLFF, J; LUSA, M.G; BIAVATTI, M.W. "Arnicas" from Brazil: comparative analysis among ten species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29(4), p. 401-424, 2019.

BERNARDES, A.C.F.P.F; MATOSINHOS, R.C; ARAÚJO M.C.P.M; BARROS, C.H; SOARES R.D.O.A; COSTA, D.C; SACHS, D; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Lactonas sesquiterpene da espécie *Lychnophora*: vias antinociceptivas, anti-inflamatórias e antioxidantes para tratar gota aguda. **Journal of Etnopharmacololy**, v. 6(269), p. 113738, 2021.

BFG - Brazilian Flora Group. **Brazilian Flora 2020 project - Projeto Flora do Brasil 2020**. v. 393, p. 274, 2021.

BRAVO-MONZÓN, A.E; RÍOS-VÁSQUEZ, E; DELGADO-LAMAS, G; ESPINOSA-GARCÍA, F.J. Diversidade química entre populações de *Mikania micrantha*: estrutura geográfica do mosaico e herbivoria. **Oecologia**, v. 174(1), p. 195-203, 2014.

CATCHEN, J; HOHENLOHE, P.A; BASSHAM, S; AMORES, A; CRESKO, W.A. Stacks: An analysis tool set for population genomics. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 3124-3140, 2013.

CERQUEIRA, M.B.S; SOUZA, J.T; JUNIOR, R.A; 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, p. 551-553, 1987.

CHAVES, T.L; RICARDO, L; PAULA-SOUZA, J.D; BRANDÃO, M.D.G.L. Plantas brasileiras úteis sob a visão do escritor-naturalista João Guimarães Rosa. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 437-444, 2015.

COPAM – CONSELHO DE POLÍTICA AMBIENTAL. **Lista das espécies ameaçadas de extinção da flora do Estado de Minas Gerais**. Deliberação COPAM 85/97 . Disponível em: <http://www.biodiversitas.org.br/listas-mg/MG-espécies-Flora-ameaçadas.pdf>. Acesso em: 15 Junho 2011.

CORDEIRO, E.M.G; MACRINI, C.M; SUJII, P.S; SCHWARCZ, K.D; PINHEIRO, J.B; RODRIGUES, R.R; BRANCALION, P.H.S; ZUCCHI, M.I. Diversity, genetic structure, and population genomics of the tropical tree *Centrolobium tomentosum* in remnant and restored Atlantic forests. **Conservation Genetics**, v. 20, p. 1073-1085, 2019.

CRAVEIRO, A.A; FERNANDES, A.G; ANDRADE, C.H.S; MATOS, F.J.A; ALENCAR, J.W; MACHADO, M.I.L. **Oleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza: UFC, p. 210, 1981.

DANNEMANN, A. Der Einfluss von Fragmentierung und Populations größe auf die genetische Variation und Fitness von seltenen Pflanzenarten am Beispiel von Biscutella laevigata (Brassicaceae). **Diss Bot. J. Cramer**, Berlim, Estugarda, 2000.

DOYLE, J.J; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

FISCHER, M; STÖCKLIN, J. Extinções locais de plantas em remanescentes de pastagens calcárias amplamente utilizadas 1950-85. **Conservation Biology**, v. 11, p. 727-737, 1997.

GARNIER-GÉRÉ, P; CHIKHI, L**. Population Subdivision, Hardy–Weinberg Equilibrium and the Wahlun deffect**. In eLS,John Wiley & Sons,Ltd (Ed.), 2013.

GEMEINHOLZER, B; MAY, F; RISTOW, M. Forte diferenciação genética em um gradiente de fragmentação entre populações do heterocárpico anual *Catananche lutea* L. (Asteraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 298, p. 1585-1596, 2012.

GOVINDARAJU, D.R. Relationship between dispersal ability and levels of gene flow in plants. **Oikos**, v. 52, p. 31-35, 1988.

GU, Z; EILS, R; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics** v. 32, p. 2847-2849, 2016.

HABER, L.H. **Caracterização da diversidade genética, via marcador microssatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart**. Tese. Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, p. 151, 2008.

HABER, L.H; CAVALLARI, M.M; SANTOS, F.R; MARQUES, M.O; GIMENES, M.A; ZUCCHI, M.I. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites para *Lychnophora pinaster*: um estudo para a conservação de uma planta medicinal nativa. **Molecular Ecology Resources**, v. 9(3), p. 811-4, 2009.

HAMMER, O; HARPER, D.A.T; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software packages for education and data analisis. **Paleontologia Electronica**, v. 4(1), p. 9, 2001.

HANSKI, I; GAGGIOTTI, O.E. Biologia da metapopulação: passado, presente e futuro. In: HANSKI, I; GAGGIOTTI, O.E (eds). Ecologia, genética e evolução das metapopulações. **Elsevier Academic**, Amsterdã, pp 3-21, 2004.

HATMAKER, E.A; STATON, M.E; DATTILO, A.J; HADZIABDIC, Đ; RINEHART, T.A; SCHILLING, E.E; TRIGIANO, R.N; WADL, P.A. Estrutura Populacional e Diversidade Genética dentro da Espécie Ameaçada *de Extinção Pityopsis ruthii* (Asteraceae). **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 943, 2018.

HOELTGENBAUM, M.P; BERNARDI, A.P; MONTAGNA, T; REIS, M.S. Diversidade e estrutura genética de populações de *Varronia curassavica* Jacq. em restingas da Ilha de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17(4), p. 1083-1090, 2015.

ISOBE, M.T.C. **Anatomia foliar e influência da sazonalidade no óleo essencial de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.** Dissertação (Mestrado em Agronomia – Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p. 93, 2012.

JOMBART, T; AHMED, I. Adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. **Bioinformatics**, 2011.

LI, X; PENG, L.Y; ZHANG, S.D; ZHAO, Q.S; YI, T.S. As relações entre diferenciação química e genética e fatores ambientais através da distribuição de *Erigeron breviscapus* (Asteraceae). **PLoS ONE**, v. 8(11), e74490, 2013.

LOEUILLE, B; SEMIR, J; LOHMANN, L.G; PIRANI, J.R. A. Phylogenetic analysis of Lychnophorinae (Asteraceae: Vernonieae) based on molecular and morphological data. **Systematics Botany**, v. 40(1), p. 299–315, 2015.

LUQUE, R.E.M; LUIZA, N; SEMIR, J. Anatomia foliar de *Lychnophora* Mart. (Vernonieae: Asteraceae). **Plantula**, v. 2(3), p. 141-152, 1999.

LUSA, M.G; LOEUILLE, B.F.P; CICCARELLI, D; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Evolution of stem and leaf structural diversity: a case study in Lychnophorinae (Asteraceae). **The Botany Review**, v. 84, p. 203-241, 2018.

LUU, K; BAZIN, E; BLUM, M.G. pcadapt: um pacote R para realizar varreduras de genoma para seleção com base na análise de componentes principais. **Molecular Ecology Resources**, v. 17(1), p. 67-77, 2017.

MADDISON, W. P; MADDISON, D.R. Mesquite: a modular system forevolutionary analysis. Version 3.70. 2021. http://www.mesquiteproject.org.

MARIOT, A. et al. Genetic Diversity in Natural Populations of *Piper cernuum*. **The Journal of Heredity**, v. 93(5), p. 365-369, 2002.

MARQUES, A.P.S. **Diversidade química e genética de populações naturais de *Lychnophora pinaster* Mart**. Tese. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Instituto de Biociências, Botucatu – SP, p. 125, 2020.

MENDONÇA, M. P; LINS, L.V. **Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas – Fundação Zoo-botânica de Belo Horizonte, p. 157, 2000.

MIJANGOS, J.L; GRUBER, B; BERRY, O; PACIONI, C; GEORGES, A. dartR v2: An accessible genetic analysis platform for conservation, ecology and agriculture. **Methods in Ecology and Evolution, (early access)**, 2022.

MONTANARI, I. Jr. **Variabilidade genética em uma população de *Cordia verbenacea* DC.** Tese. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, p. 88, 2011.

NAZARENO, A.L; BEMMELS, J.B; DICK, C.W; LOHMANN, L.G. Minimum samples sizes for populations genomics: an empirical study from an Amazonian plant species. **Molecular Ecology Resources**, v.17, p.1136-1147, 2017.

PACHECO-HERNÁNDEZ, Y; VILLA-RUANO, N; LOZOYA-GLORIA, E; BARRALES-CORTÉS, C.A; JIMÉNEZ-MONTEJO, F.E; CRUZ-LÓPEZ, M.D.C. Influência de Fatores

Ambientais na Diversidade Genética e Química de Populações de *Brickellia veronicifolia* Crescendo em Arbustos Fragmentados do México. **Plantas (Basileia)**, v. 10(2), p. 325, 2021.

POLAND, A; ENDELMAN, J; DAWSON, J; RUTKOSKI, J; WU, S; MANES, Y; DREISINGACKER, S; CROSSA, J; SÁNCHEZ-VILLEDA, H; SORRELLS, M; JANNINK, J.L. Genomic selection in wheat breeding using genotyping-by-sequencing. **The Plant Genome**, v. 5(3), p. 103-113, 2012.

PORTELLA, R.O. **Efeito da altitude na diversidade química e genética de *Lychnophora pinaster* Mart**. Tese. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Instituto de Biociências, Botucatu, p. 39, 2021.

PORTELLA, R.O; CORDEIRO, E.M.G; MARQUES, A.P.S; MING, L.C; ZUCCHI, M.I; LIMA, M.P; MARTINS, E.R; HANTAO, L.W; SAWAYA, A.C.H.F; SEMIR, J; PINHEIRO, J.B; MARQUES, M.O.M. Evidência de gradiente altitudinal modificando a diversidade genômica e química em populações de *Lychnophora pinaster* Mart. **Phytochemistry**, v. 192, 112898, 2021.

POSCHLOD, P; BAKKER, J.P; KAHMEN, S. Mudando o uso da terra e seu impacto na biodiversidade. **Basic and Applied Ecology**, v. 6, p. 93-98, 2005.

RODRIGUES, V.E.G; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência Agrotecnica**, v. 25(1), p.102-123, 2001.

SAÚDE, D.A; RASLAN, D.S; DE SOUZA, J.D; DE OLIVEIRA, A.B. Constituintes das partes aéreas de *Lychnophora trichocarpha*. **Fitoterapia**, v. 69, p. 90-91, 1998.

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae: Compositae)**. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) – Universidade de Campinas, Campinas, p. 515, 1991.

SEMIR, J; REZENDE, A.R; MONGE, M; LOPES, N.P. **As arnicas endêmicas das Serras do Brasil: Uma visão sobre a biologia e a química das espécies de *Lychnophora* (Asteraceae).** Ouro Branco (MG): UFOP, p. 212, 2011.

SHARIFI-RAD, M; NAZARUK, J; POLITO, L; MORAIS-BRAGA, M.F.B; ROCHA, J.E; COUTINHO, H.D.M; SALEHI, B; TABANELLI, G; MONTANARI, C; DEL, M.A.R; CONTRERAS, M; YOUSAF, Z; SETZER, W.N; VERMA, D.R; MARTORELL, M; SUREDA, A; SHARIFI-RAD, J. Matricaria gênero como fonte de agentes antimicrobianos: da fazenda à farmácia e aplicações alimentares. **Microbiological Research**, v. 215, p. 76-88, 2018.

SILVA, P.S.S. **Caracterização da composição química dos óleos essenciais de *Lychnophora pinaster* Mart. em função da sazonalidade**. Dissertação. Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, p. 167, 2013.

SILVA, P.S.S. **Caracterização da diversidade genética e composição química de *Lychnophora pinaster* Mart.** Tese. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu – SP. 178p. 2016.

STADLER, K; KOCH, M; BERNHARDT, K.G; GREIMLER, J. Arranjo espacial e estrutura genética em *Gentianella aspera* em um contexto regional, local e temporal. **Plant Systematics and Evolution**, v. 286, p. 7-19, 2010.

SUGIER, D; SUGIER, P; JAKUBOWICZ-GIL, J; WINIARCZYK, K; KOWALSKI, R. Óleo essencial de *Arnica Montana* L. Aquênios: Características químicas e atividade anticancerígena. **Moléculas**, v. 24(22), p. 4158, 2019.

TUNDIS, R; STATTI, G.A; CONFORTI, F; BIANCHI, A; AGRIMONTI, C; SACCHETTI, G; MUZZOLI, M; BALLERO, M; MENICHINI, F; POLI, F. Influência de fatores ambientais na composição de constituintes voláteis e atividade biológica de Helichrysum italicum (Roth) Don (Asteraceae). **Natural Product Research**, v. 19(4), p. 379-87, 2005.

YOUNSI, F; RAHALI, N; MEHDI, S; BOUSSAID, M; MESSAOUD, C. Relação entre a diversidade quimiotípica e genética de populações naturais de Artemisia herba-alba Asso crescendo selvagem na Tunísia. **Fitoquímica**, v. 148, p. 48-56, 2018.

YUN, S.A; KIM, S.C. Diversidade genética e estrutura de Saussurea polylepis (Asteraceae) em ilhas continentais da Coreia: Implicações para estratégias de conservação e manejo. **PLoS ONE**, v. 16(4), e0249752, 2021.

ZOUARI, S; AYADI, I; FAKHFAKH, N; JDIR, H; ALOUI, L; KOSSENTINI, M; REBAI, A; ZOUARI, N. Variação de óleo essencial em populações selvagens de Artemisia saharae (Asteraceae) da Tunísia: composição química, propriedades antibacterianas e antioxidantes. **Botanical Studies**, v. 55(1), p. 76, 2014.

ZUCCHI, M.I; CORDEIRO, E.M.G; WU, X; LAMANA, L.M; BROWN, P.J; MANJUNATHA, S; VIANA, J.P.G; OMOTO, C; PINHEIRO, J.B; CLOUGH, S.J. Population genomics of the neotropical brown stink bug, euschistus heros: The most important emerging insect pest to soybean in brazil. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 1-12, 2019.

# CAPÍTULO III

## Populações de *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae): composição repetitiva de sequências do DNA

## 1. INTRODUÇÃO

O genoma dos eucariotos é composto por regiões de sequências não codificadas, estas em sua maioria, incluem o DNA intergênico, elementos repetitivos e introns, sendo os Elementos Transponíveis – TEs, componentes de uma grande parte dos elementos repetitivos presentes no genoma de muitos eucariontes (SAHEBI *et al*., 2018).

Fundamentalmente os TEs são bem diferentes dos genes, estando estes relacionados a sequências de DNA que são enriquecidas por modificações de cromatina associadas ao silenciamento transcricional (SAHEBI *et al*., 2018). Dentro dos genomas dos eucariontes, os TEs são as sequências mais repetitivas, estes são capazes de se mover dentro e entre o genoma, gerar mutações, e amplificar o número de suas cópias (MUSZEWSKA *et al*., 2011; ARANGO-LOPEZ *et al*., 2017; OROZCO-ARIAS *et al*., 2019).

Desde meados do século XX, quando foram descritos pela primeira vez em milho, os TEs, por vários anos, foram considerados como "DNA lixo" ou "parasitas genômicos" sem acrescentar qualquer benefício à composição do genoma dos hospedeiros, porém descobertas indicaram que estes podem ser benéficos, fornecendo elementos genéticos com caráter regulatório, produzindo mudanças genômicas, compondo partes especificas de regiões do genoma como a região do centrômero (BRUNNER *et al*., 2005; LIU *et al*., 2008; RAVINDRAN, 2012; ZHANG, GAO, 2017; HIRSCH, SPRINGER, 2017; NEUMANN *et al*., 2019; COSTA *et al*., 2019).

Em geral, os TEs são classificados de acordo com as regiões que estão envolvidas diretamente na codificação e replicação do elemento, sendo que, os TEs que movem-se através de uma molécula de RNA (os retrotransposons), estão classificados dentro da Classe I, enquanto os TEs que movem-se através de uma molécula de DNA (os transposons), são classificados dentro da Classe II (WICKER *et al*., 2007; CHAPARRO *et al*., 2015; OROZCO-ARIAS *et al*., 2019), dentre estes, os elementos classificados na Classe I, os retrotransposons, são predominantes em genomas de plantas (OLIVER *et al*., 2013; MHIRI *et al*., 2019).

Os retrotransposons ainda são subdivididos e classificados em quatro ordens: LTR-RT; não-LTR; PLEs e DIRS de acordo com suas características estruturais e ciclo de vida do elemento (CASACUBERTA, GONZÁLEZ, 2013; OROZCO-ARIAS *et al*., 2019). A ordem LTR-RT é a mais comum, podendo contribuir em 75% a 80% do tamanho do genoma da planta, como observado na cevada, trigo e seringueira (GAO *et al*., 2012; RAHMAN *et al*., 2013; NEUMANN *et al*., 2019).

Com base na organização interna do domínio de codificação, em plantas, a ordem LTR-RT é composta por duas superfamílias: Copia e Cigana (Gypsy). As duas superfamílias de LTR-

RT, ainda foram subdivididas em linhagens e famílias por meio de análises filogenéticas com base em similaridades de regiões de codificação, muitas delas realizadas através do domínio enzimático conhecido como transcriptase reversa (RT) (LLORENS *et al*., 2009; OROZCO-ARIAS *et al*., 2019).

Os TEs representam uma grande diversidade de elementos repetitivos em seg=quencias do DNA de eucariotos, em genomas vegetais, são descritas as linhagens: Ale (Retrofit), Alesia, Angela, Bianca, Bryco, Lyco, Gymco, Ikeros (Tork sto-4), Ivana (Oryco) e Osser, pertencentes a superfamília Copia, e para a superfamília Cigana (Gypsy), as linhagens Athila, Clamyvir, Galadriel, Selgy, TCnl, Reina, Tekay (Del), CRM, Phygy e TAT (OROZCO-ARIAS *et al*., 2019).

Os retrotransposons de repetições de terminais longos (LTR-RTs), compõem um grande grupo diverso de elementos transponíveis presentes nos eucariotos, sendo abundantes principalmente, em genomas vegetais (NEUMANN *et al*., 2019). De modo geral, os retrotransposons exercem um papel importante na evolução de uma espécie, pois sua mobilidade produz variações genéticas, favorecendo rearranjos cromossômicos por meio de recombinações ilegítimas no mesmo cromossomo entre locais distantes ou em cromossomos diferentes (LISCH, 2013; DEVOS *et al*., 2002; VANGELISTI *et al*., 2021).

Os retrotransposons LTR-RT, atuam como um mecanismo de "cópia e cola" originando novas cópias de elementos aumentando o tamanho do genoma do hospedeiro após a integração, estes replicam-se através de um RNA intermediário, gerando assim, as novas cópias de elementos. Este processo pode estar entre os principais impulsionadores da evolução do tamanho do genoma (VITTE, PANAUD, 2005; GALINDO-GONZÁLEZ *et al*., 2017; GROVER, WENDEL, 2010; WICKER *et al*., 2018; NEUMANN *et al*., 2019).

Uma das características mais importantes apresentadas pelos retrotransposons LTR é a sua alta diversidade de sequências de nucleotídeos, que são no geral, únicas para uma espécie ou para um grupo determinado de espécies que são intimamente relacionadas (NEUMANN *et al.,* 2019). Os retrotransposons LTR-RTs autônomos, ainda possuem domínios internos que estão intimamente ligados a codificação de proteínas que relacionam-se diretamente com a sua transposição sendo os domínios: GAG (Antígeno específico do grupo) e POL (sintetizado como poliproteína contendo PROT, Aspartic Proteinase; INT, Integrase, RT, Transcriptase Reversa e RH, RNAse H) importantes neste processo (COSTA *et al.,* 2019).

As duas superfamílias de retrotransposons LTR-RTs, Copia e Sigana, as mais abundantes em plantas, assim como as outras três superfamílias LTR-RTs, são classificadas e divididas de acordo com inferências filogenéticas baseadas nos domínios das proteínas GAG e

POL (LLORENS *et al.,* 2009; 2011; COSTA *et al.,* 2019). Os elementos componentes das superfamílias Copia e Sigana diferenciam-se pela organização de seus domínios internos (WICKER *et al.,* 2007; BENNETZEN, WANG, 2014, COSTA *et al.,* 2019), tendo as suas diversas linhagens, relações de similaridades sequenciais e organização molecular compartilhadas, sendo a sua identificação e caracterização, um passo fundamental para o entendimento dos mecanismos de transposição e história evolutiva deste sistema LTR-RT (EL BAIDOURI, PANAUD, 2013; OCHOA CRUZ *et al.,* 2016; VICIENT, CASACUBERTA, 2017; COSTA *et al.,* 2019).

Por serem abundantes em genomas vegetais, os TEs LTR-RTs, apresentam importância significativa quando investigados em sua ampla diversidade encontrada nos mais diversos genomas de plantas. Em análises mais aprofundadas sobre estes diversos genomas, estudos tem revelado que os TEs, especialmente contendo os elementos LTR-RT compõem: 8,9/125 Mb, cerca de 6,6% do genoma de *Arabidopsis* (*Arabidopsis* Genoma Initiative, 2000), 146,6/742,3 Mb, 31,1% do genoma da maçã (VELASCO *et al.*, 2010), 1432/2365 Mb, cerca de 70,1% do genoma do milho (RAYBURN *et al.,* 1993; SCHNABLE *et al.*, 2009), e 60,9/430 Mb, 14,5% do genoma do arroz (ECKARDT, 2000; PATERSON *et al.*, 2009).

Apresentando uma alta dinâmica na natureza, os TEs contribuem diretamente para a diversidade intraespecífica do genoma, promovendo variações no tamanho do genoma e expressão genética, sendo ativos na manutenção e estabilização de regiões do centrômero que são críticas, inserindo tipos específicos de TEs (MAKAREVITCH *et al.,* 2015; GAO *et al.,* 2015; FERREIRA DE CARVALHO *et al.,* 2016; SARKAR *et al.,* 2017; JAYASWAL *et al.,* 2020).

Assim, levando em consideração a importância da espécie *L. pinaster* para a medicina popular, o seu potencial uso futuro na composição de insumos para as indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética dentre outras, sua importância ecológica e o seu *status* de conservação, este estudo tem como objetivo principal identificar grupos de TEs retrotransposons componentes de sequências do DNA repetitivo de populações de *Lychnophora pinaster* ocorrentes no estado de Minas Gerais, buscando fornecer novos elementos e subsídios para futuros programas de conservação de populações naturais desta espécie endêmica ameaçada de extinção.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Extração de DNA

O método CTAB foi empregado para processar a extração do DNA das amostras (DOYLE 1990; PORTELLA *et al.,* 2021). O DNA de 255 indivíduos de *L. pinaster* foi extraído de forma que para cada indivíduo foi utilizado 10 mg de folhas trituradas à consistência de pó e cada amostra foi adicionada a um Eppendorf contendo 1 mL de solução-tampão de extração CTAB 2 % a 65 ºC (água Milli-Q 100 mM; TRIS-HCl 100 mM; pH 8,0; NaCl 1,42 mM; CTAB 2 %; EDTA 20 mM pH 8,0; β-mercaptoetanol 0.2 %; PVP 2 %). As amostras foram colocadas em banho-maria à 65 ºC por 60 minutos, com intervalos de 15 minutos para agitação das amostras.

Após a extração do DNA, cada amostra foi tratada com 900 µL de chlorofórmio-isoamil (24:1) e em seguida centrifugadas a 10000 rpm por cinco minutos. O sobrenadante de cada amostra foi transferido para outro Eppendorf e foi adicionado 500 µL de isopropanol; o mesmo Eppendorf foi colocado em freezer a temperatura de -20 ºC durante 30 minutos e depois centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos. O precipitado, ou pellet, foi deixado para secar em bancada a temperatura ambiente, depois lavado com 500 µL de etanol 70 % e centrifugado a 12000 rpm por sete minutos.

Após secagem do precipitado, ele foi novamente lavado com 500 µL de etanol 95 % e centrifugado a 12000 rpm por sete minutos. Os precipitados finais foram ressuspendidos com 60 µL de solução-tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0; e 2 µL RNAse (10 mg/mL)). As amostras foram levadas a banho-maria por 37 ºC durante 60 minutos e deixadas para secar em *overnight* à temperatura ambiente. O material genético extraído foi armazenado em freezer a -80 ºC até seu uso.

### 2.2. Quantificação e Normalização de DNA

A quantificação do DNA por amostra foi realizada pela observação em eletroforese com gel de agarose utilizando SYBERtm Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) após passagem do gel em transiluminador ultravioleta e pela comparação com concentrações conhecidas de fago Lambda (25, 30, 50 and 100 ng/µL). As amostras de DNA foram normalizadas a 20 ng/µL e purificadas com o kit QIAquick PCR Purification of Qiagen®.

### 2.3. Preparação das Bibliotecas Genômicas

A produção das bibliotecas genômicas via *Genotyping-by-sequencing* (GBS) foi realizada em parceria com o Departamento de Genética da Universidade de Campinas (Unicamp), a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (Esalq/USP) e a Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pólo de Piracicaba-SP. O protocolo da construção das bibliotecas genômicas GBS foi realizado de acordo com as informações no trabalho de Poland *et al*. (2012), com adaptações de Zucchi *et al*. (2019) e Portella *et al*. (2021).

Foram utilizados 20 ng/μL de DNA de cada indivíduo, o qual foi normalizado a 10 μL, cujas amostras foram distribuídas em placas contendo 96 poços. Cada poço da placa apresenta adaptadores comuns e adaptadores do tipo *barcode*, sendo eles utilizados nas análises a posteriori. O primeiro estágio no protocolo GBS se trata da reação de Restrição, com a adição de 2,0 μL de solução tampão NEB 4; 0,4 μL PstI-HF (20 U/μL); 0,4 μL MspI (20 U/μL); e 10,2 μL de água Milli-Q. O segundo passo da reação de GBS se trata da reação de Ligação, com a adição de 2,0 μL de solução-tampão NEB 4; 1,0 μL ATP (10 mM); 0,5 μL T4 DNA Ligase (200 U/μL); 11,5 μL de água Milli-Q. O terceiro passo se trata da condução de PCR Multiplex com o seguinte programa de temperatura: 16 ciclos a 95 ºC por 10 s, 62 ºC por 20 s, 72 ºC por 30 s); 72 ºC por 5 min; 4 ºC indefinidamente.

### 2.4. Genotipagem de descoberta de marcadores SNP

Os procedimentos de demultiplexação, construção dos loci RAD, descoberta e anotação dos marcadores SNP foram conduzidos via pipeline no STACKS v.2.45 (CATCHEN *et al.*, 2013; ZUCCHI *et al.*, 2019; PORTELLA *et al.*, 2021). As *reads* obtidas das amostras de DNA de *L. pinaster* foram, primeiramente, demultiplexadas utilizando o software *radtags* e individualizadas em diferentes arquivos no formato *fastq* baseadas nos *barcodes* (6-8pb) de cada amostra. Diversos filtros foram aplicados nessa primeira etapa com a finalidade de selecionar os *reads* das amostras com alta qualidade. Dentre os filtros, foram aplicados o filtro de *score* de qualidade (-q), o filtro para eliminação de leituras com função baseada em não-chamada (-c) e a função que impede a seleção de *barcodes* com mais de um *mismatch* (-r). Após esse procedimento, as sequências com comprimento de 90pb foram selecionadas e sequências com baixa qualidade foram descartadas.

A segunda etapa da genotipagem consistiu na construção de um catálogo de SNP pelo uso do software *ustacks*. Neste software, foi aplicado o método de novo para a seleção de SNP pois a espécie não apresenta genoma de referência, seguido dos seguintes parâmetros: distância

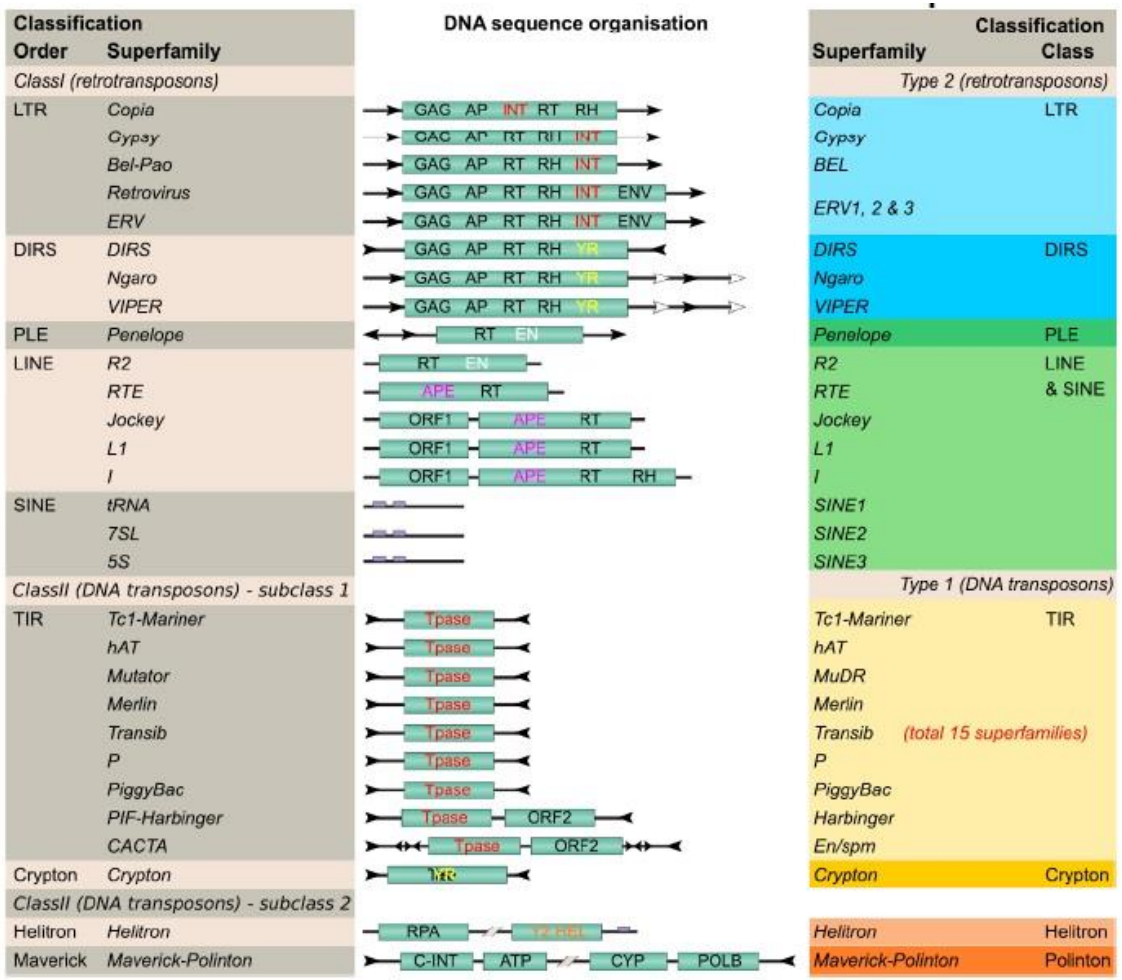
máxima permitida entre as pilhas, ou *stacks* (M=2); distância máxima permitida para alinhamentos secundários (N=4, M + 2); e cobertura mínima com três sequências para cada locus RAD (m=3). A terceira etapa consistiu na criação de um catálogo comum de SNP pelo uso do software *cstacks*.

### 2.5. Identificação e seleção de elementos transponíveis (TEs)

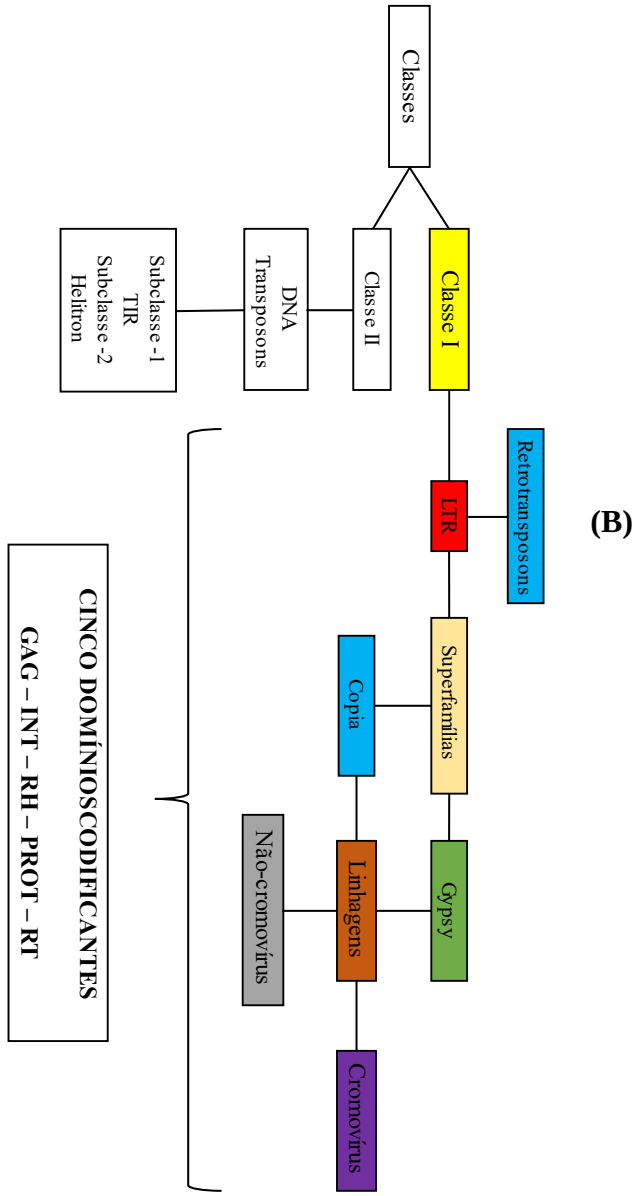
A identificação e classificação dos elementos de transposição do genoma de *Lychnophora* foi realizado via software RepeatExplorer2 (NOVÁK *et al*., 2020). Segundo os autores, o software tem como base a aplicação de um *pipeline* gráfico baseado em sequências gênicas obtidas via metodologia GBS, cuja finalidade se baseia na caracterização de sequência repetitivas de DNA em eucariotos. A classificação e os sistemas adotados, foram os descritos por Wicker *et al*. (2007) e atualizado por Piégu *et al*. (2015) e Neumann *et al*. (2019) (Figura 20).

A seleção dos elementos de transposição em *Lychnophora* foi desenvolvida com relação à hipótese de que a população de Itacambira/Botumirim (ITBO) se trata de uma outra espécie de arnica, denominada *Lychophora salicifolia* Mart. Dessa forma, a caracterização de TEs pode ser uma ferramenta filogenômica eficiente, com a finalidade de descrever a distribuição biogeográfica das espécies do gênero *Lychnophora*. Foi decidido a separação de dois *clusteres*, um deles contendo as sequências das bibliotecas GBS da população de ITBO, identificada como *L. salicifolia*, e um segundo *cluster* contendo as sequências de bibliotecas GBS das demais populações identificadas como *L. pinaster*.

Para a obtenção dos resultados de TEs de *Lychnophora*, foi utilizado duas abordagens (i) a primeira se trata do tratamento de dados dos dois *clusteres* considerando as sequências *single-end* de GBS e aplicação do *pipeline* para espécies distintas descrito por Novák *et al*. (2020); (ii) a segunda, foram criadas as sequências reversas e complementares das sequências *single-end* de GBS via software *Biopython* e depois foi aplicado o *pipeline* para espécies distintas descrito por Novák *et al*. (2020). A sequência de tratamento dos dados foi: (i) filtragem e conversão em .FASTA de sequências de DNA obtidas via sequenciamento GBS de cada cluster via software *bbmap*, utilizando a função ./*reformat*.sh; (ii) formatação dos asquivos .FASTA via software *FastX*, utilizando as funções *./fasta_formatter* e *./fastx_renamer*; (iii) filtragem dos arquivos .FASTA de acordo com o tamanho mínimo de 70 pb via software *bbmap*, utilizando a função ./reformat.sh; e (iv) selecionar o tamanho da amostra de acordo com a capacidade de clusterização do *software RepeatExplorer2*, via *software* bbmap, utilizando a função *samlerate*=0.80.




**(A)**




**(B)**

**Figura 20.** Sistema de classificação para elementos transponíveis. Extraídos de Wicker *et al*. (2007), versão atualizada de Piégu *et al*. (2015). **(A)**. Classificação dos elementos transponíveis de acordo com a ordem, superfamília e classe de elementos segundo a organização das sequências do DNA e os seus domínios codificantes, e **(B)**. Esquema de organização da Classe I – LTR-Retrotransposons e suas duas superfamílias e linhagens de acordo com os seus domínios codificantes.

# 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1. Anotação e identificação preliminar de elementos transponíveis em *Lychnophora pinaster*

Utilizando as ferramentas implementadas no *software RepeatExplorer2*, as sequências repetitivas do DNA de 255 indivíduos de *L. pinaster* foram analisadas, sendo anotados em relatórios preliminares, a formação de 87597 *superclusters* em um total de 1.000.000 *reads* (Figura 21).

Foram identificados 145 *clusters* formados por elementos transponíveis da classe I - LTR (Long Terminal Repeat) distribuídos entre as superfamílias Ty1-copia e Ty3-gypsy. Os TEs classificados dentro da classe I, os retrotransposons LTR-RTs, estão distribuídos dentro das duas superfamílias Ty1-copia e Ty3-gypsy, sendo estes elementos encontrado em abundância nos genomas de plantas (GRANDBASTIEN, 2015; COSTA *et al*., 2019; OROZCO-ARIAS *et al*., 2023).

Dentre os TEs anotados, a superfamília Ty1-copia está representada por 66 elementos/linhagens relacionados de acordo com os domínios de proteínas, sendo estes elementos representados por oito linhagens (Ale, Angela, Bianca, GymcoII, Ivana, SIRE, TAR e Tork) descritas para a superfamília Ty1-copia (Figura 22).

Elementos repetitivos LTR retrotransposons pertencentes a superfamília Ty1-copia, são frequentes em genomas de plantas. As linhagens anotadas neste estudo com sequências do DNA de populações nativas de *L. pinaster*, foram anteriormente identificadas e anotadas para espécies de plantas cultivadas como: *Solanum lycopersicum* (PAZ *et al*., 2017), *Passiflora edulis* (PAMPONÉT *et al*., 2019; COSTA *et al*., 2019), *Brachypodium distachyum* (STRITT *et al*., 2020), *Capsicum annuum* (PARK *et al*., 2012; YAÑEZ-SANTOS *et al*., 2021) e *Arabidopsis lyrata* (ZHANG *et al*., 2020), sendo estes elementos, também identificados em espécies selvagens ou cultivadas de leguminosas (JAYASWAL *et al*., 2020; MATA-SUCRE *et al*., 2020).

Os elementos/linhagens de Ty1-copia, estão intimamente relacionados de acordo com os seus domínios codificantes internos (INT, RH, PROT, GAG e RT), estes se relacionaram por similaridades e agruparam-se formando os 66 diferentes *clusters*/famílias anotados em 8 linhagens distintas.

Os elementos transponíveis pertencentes a superfamília Ty1-copia, apresentam alto grau de similaridade entre si, compartilhando divisões entre suas linhagens, diferentemente dos elementos descritos e classificados dentro da superfamília Ty3-gypsy, que são subdivididos em

duas grandes linhagens (*Chromovírus* e *Não-Chromovírus*) que abrange todos os elementos/linhagens desta superfamília de retrotransposons. Os elementos/linhagens Ty1-copia, apresentam alta similaridade, inclusive com grupos de elementos pertencentes a outros genomas de espécies distantes ou até mesmo distintas (OROZCO-ARIAS *et al*., 2023).

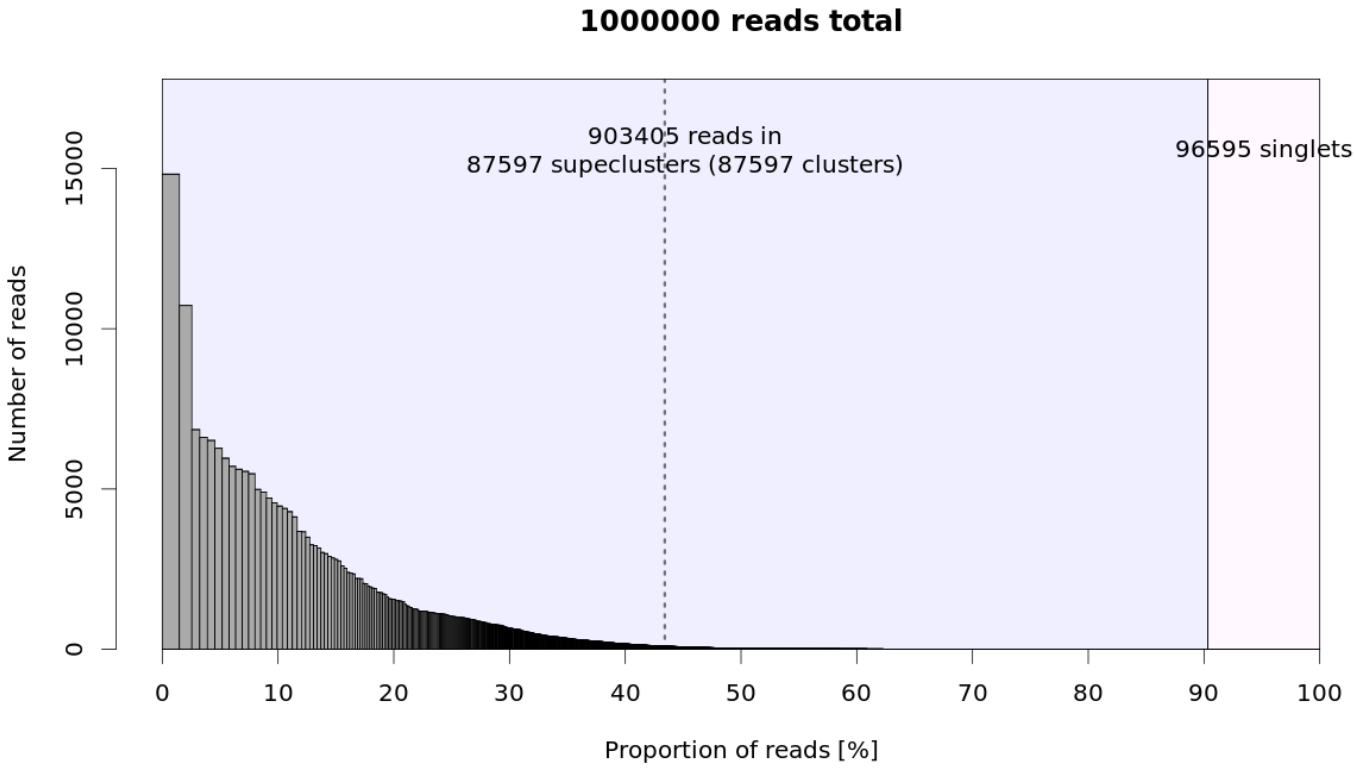



**Figura 21.** Resumo gráfico dos *superclusters* obtidos após análises preliminares da composição repetitiva do DNA de 16 populações de *Lychnophora pinaster* Mart.

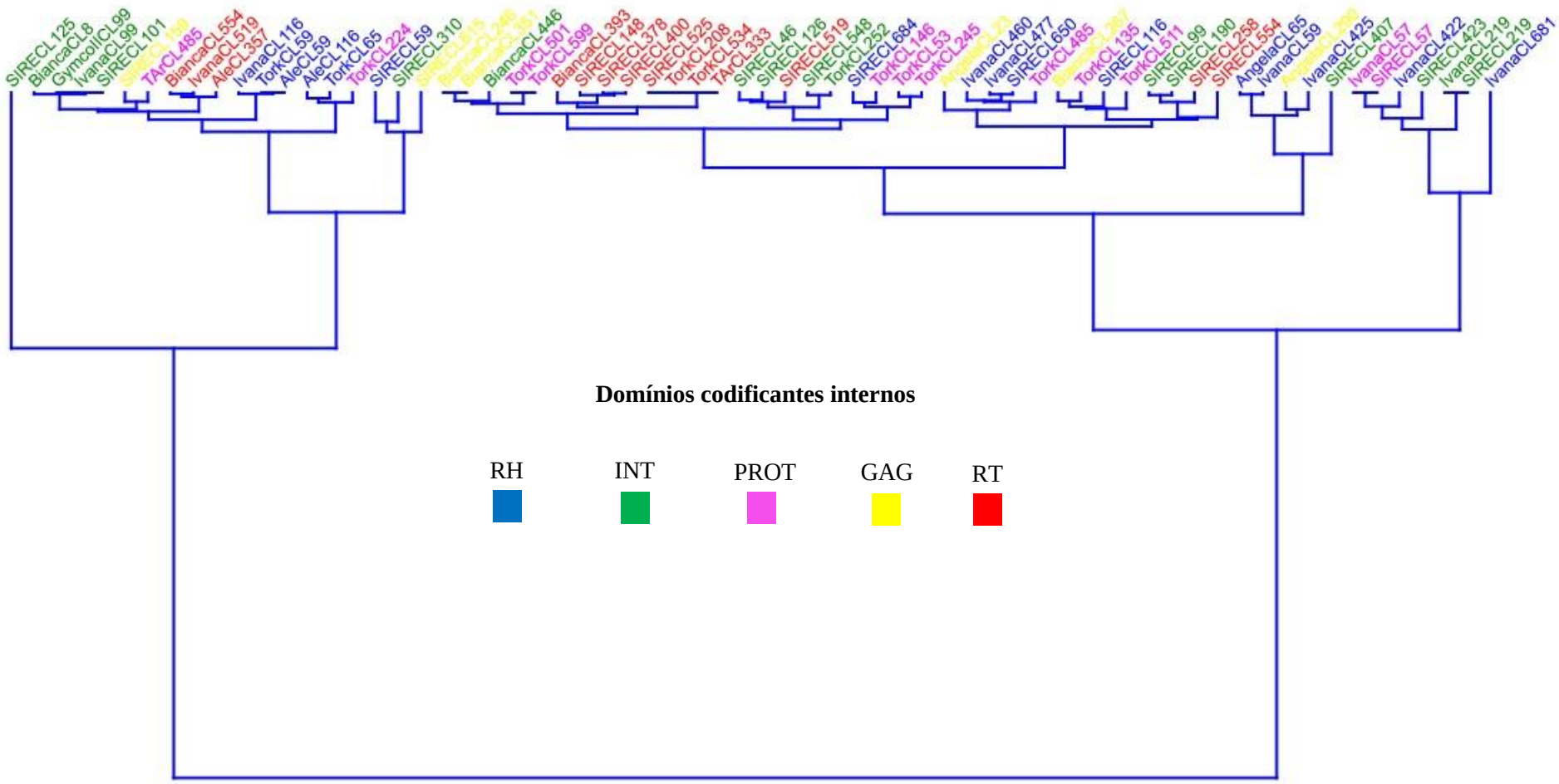



**Figura 22.** Dendrograma baseado em agrupamentos pareados (UPGMA) de 66 elementos/linhagens/famílias Ty1-copia de acordo com formação de *clusters* em cinco domínios codificantes internos: RH, INT, PROT, GAG e RT. Análise preliminar da composição repetitiva do DNA de populações de *Lychnophora pinaster*.

Elementos descritos para a superfamília Ty3-gypsy foram identificados formando 79 clusters relacionados a ocorrência de oito elementos/linhagens distintos entre as linhagens *Chromovírus* e *Não-Chromovírus*. Os TEs descritos para esta superfamília, tem sido relatado como parte componente significativa de genoma de diversas espécies de plantas cultivadas (CHAPARRO *et al*., 2015; PAZ *et al*., 2017; NEUMANN *et al*., 2019).

Assim como em Neumann *et al*. (2019), Costa *et al*. (2019) e Mata-Sucre *et al*. (2020), no presente estudo ficou evidenciada uma grande diversidade de TEs pertencentes a superfamília Ty3-gypsy. São descritas para esta superfamília, cerca de quatorze linhagens de elementos que compõem parte significativa do genoma de plantas, inclusive, muitos destes TEs estão intimamente relacionados ou envolvidos de forma restrita, com poucas espécies conhecidas atualmente (NEUMANN *et al*., 2019; OROZCO-ARIAS *et al*., 2023).

Em nosso estudo, ao todo, foram anotados 11 TEs para linhagens *Não-Chromovírus* e 8 TEs para linhagens *Chromovírus* compreendidos entre linhagens e famílias circunscritas dentro da superfamília Ty3-gypsy (Figura 23).

As linhagens Tekay e Reina, foram as mais diversas em formação de *clusters*, 55 e 10 respectivamente para Ty3-gypsy, as linhagens SIRE, Tork e Ivana, foram as linhagens mais diversas para Ty1-copia formando 25, 14 e 11 *clusters* respectivamente (Tabela 8). Muitas linhagens que foram anotadas para as superfamílias Ty1-copia e Ty3-gypsy (Figura 20), estão presentes apenas como famílias ou compreendem aglomerados de múltiplas famílias. Estas linhagens, como é o caso das Ty1-copia – Ivana – Angela que juntas compreendem 9 famílias de TEs, e as anotações feitas para as linhagens Ty3-gypsy – Retand – CRM que possuem uma diversidade de 12 famílias de retrotransposons (STRETT *et al*., 2020), representam uma porção significativa da composição do DNA de *L. pinaster*.

Com 79 *cluster*/famílias (Figura 24) e 19 linhagens/famílias anotadas (Figura 23), os TEs retrotransposons Ty3-gypsy foram os mais frequentes e diversos nas sequências repetitivas do DNA de indivíduos de populações naturais de *L. pinaster*. Geralmente elementos circunscritos para linhagens/famílias de Ty3-gypsy são mais abundantes que as pertencentes a Ty1-copia, isso, também foi verificado por Du *et al*. (2010) em múltiplas análises para o genoma da soja, Souza *et al*. (2018) analisando a abundância de retrotransposons no genoma de *Eliocharis* R.Br.

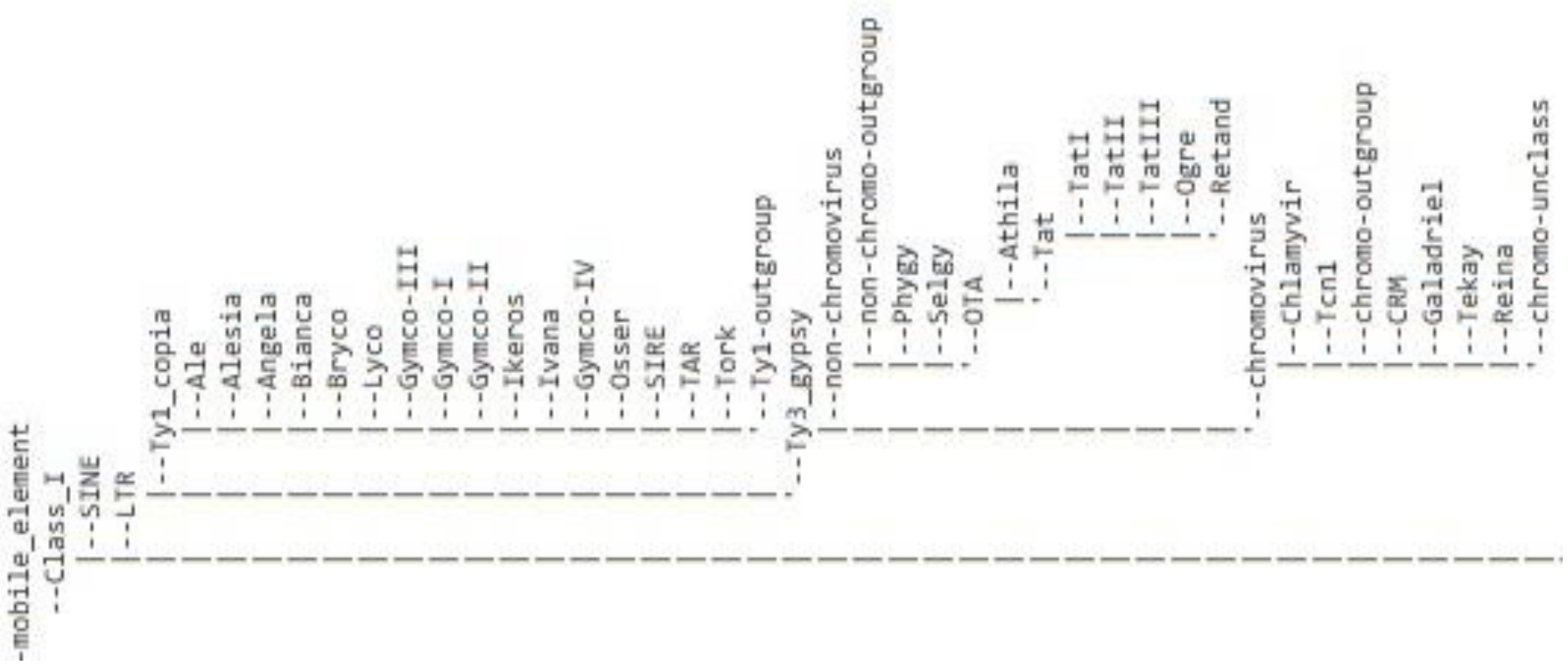



**Figura 23.** Tabela de anotações de elementos transponíveis: Ty1-copia e suas linhagens e Ty3-gypsy e suas linhagens em análise preliminar para a composição do DNA repetitivo de 16 populações de *Lychnophora pinaster* Mart., distribuídas por quatro mesorregiões do estado de Minas Gerais.

**Tabela 8.** Frequências de elementos em *Clusters* e domínios codificantes internos do DNA repetitivo em *Lychnophora pinaster* Mart.

| Superfamília | Elementos anotados | Nº clusters | RH freq (clust) | INT freq (clust) | PROT freq (clust) | GAG freq (clust) | RT freq (clust) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Classe I - LTR/Ty1-copia** | Ale | 3 | 2 | * | * | * | 1 |
| | Angela | 3 | 1 | * | * | 2 | * |
| | Bianca | 7 | * | 2 | * | 3 | 2 |
| | Gymco II | 1 | * | 1 | * | * | * |
| | Ivana | 11 | 7 | 2 | 1 | * | 1 |
| | SIRE | 25 | 4 | 11 | 1 | 2 | 7 |
| | Tork | 14 | 2 | 1 | 9 | * | 2 |
| | TAR | 2 | * | * | 1 | * | 1 |
| **Classe I - LTR/Ty3-gypsy** | Athila | 2 | * | 2 | * | * | * |
| | Chlamyvir | 4 | 4 | * | * | * | * |
| | CRM | 5 | 3 | * | * | 1 | 1 |
| | CROM-outg | 1 | * | * | * | * | 1 |
| | Galadriel | 1 | 1 | * | * | * | * |
| | Reina | 10 | 7 | * | * | * | 3 |
| | Tat | 1 | * | * | * | * | 1 |
| | Tekay | 55 | 27 | 10 | 2 | 9 | 7 |
| **Total** | 16 | 145 | 58 | 29 | 14 | 17 | 27 |

*Não frequente

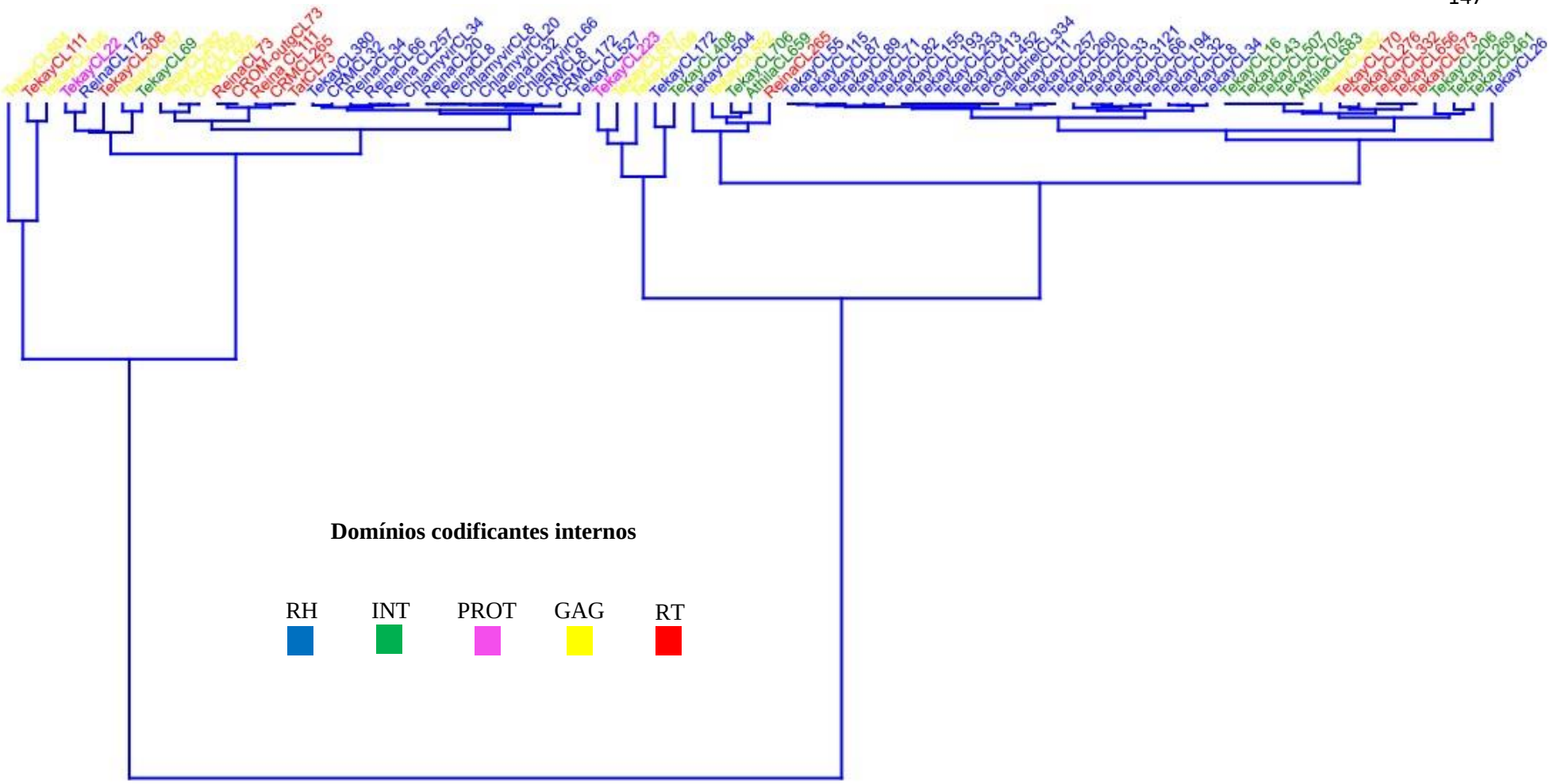



**Figura 24.** Dendrograma baseado em agrupamentos pareados (UPGMA) de 79 elementos/linhagens/famílias Ty3-gypsy de acordo com formação de *clusters* em cinco domínios codificantes internos: RH, INT, PROT, GAG e RT. Análise preliminar da composição repetitiva do DNA de populações de *Lychnophora pinaster*.

### 3.2. Diversidade de elementos retrotransposons Ty1-copia/SIRE/Tork/Ivana em *Lychnophora pinaster* Mart.

As linhagens/famílias SIRE, Tork e Ivana foram as mais diversas em anotações realizadas para a superfamília Ty1-copia, SIRE com 25 elementos agrupados em 25 *clusters* foi a linhagem/família com maior representatividade de elementos Ty1-copia apresentando elementos agrupados em *clusters* formados em todos os cinco domínios codificantes internos (Figura 25).

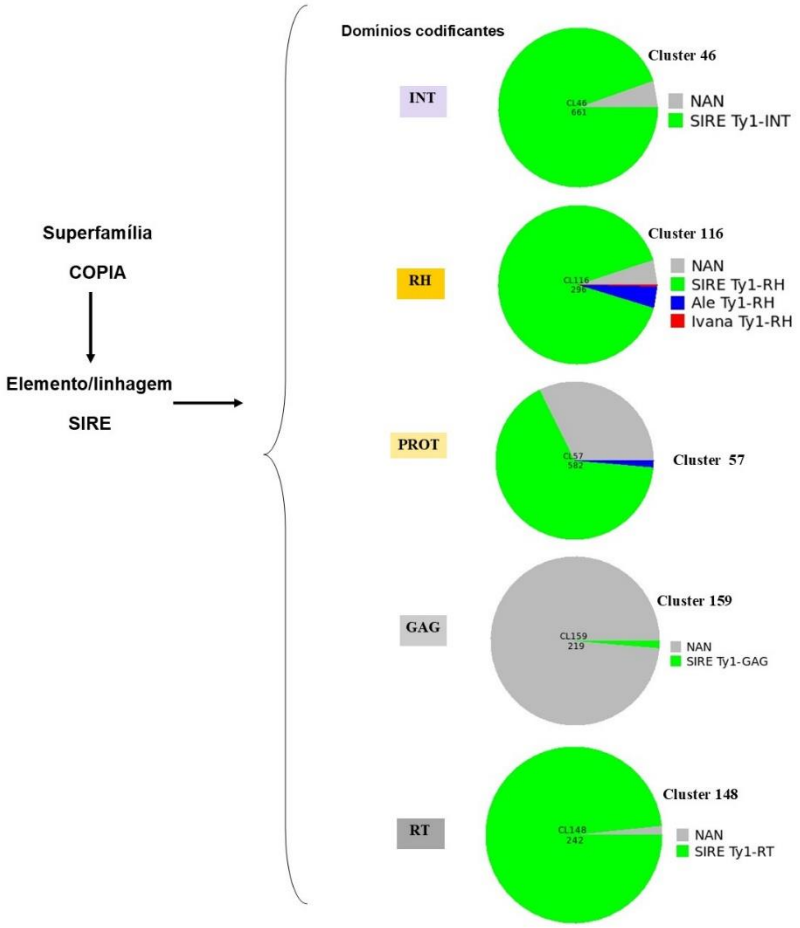



**Figura 25.** Representatividade dos elementos SIRE Ty1-copia nos cinco domínios codificantes internos: Integrase (INT), RNAse H (RH), Protease (PROT), Grupo Antígeno Específico (GAG) e Transcriptase Reversa (RT) na porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.

A linhagem/família SIRE é bem representada no genoma de diversas plantas cultivadas. Sua diversidade foi relatada para *Taraxacum oficinale* por Carvalho *et al*. (2016), em *Erianthus arundinaceus* por Huang *et al*. (2017), como elemento evolutivo do genoma de *Saccharum spontaneum* por Yang *et al*. (2020) e em *Arabidopsis arenosa* por Wos *et al*. (2021) como elemento com potencial responsivo ao estresse.

Os TEs exercem um importante papel na evolução, função e estrutura do genoma de plantas. Estes podem agir como supressores ou promotores da expressão gênica. Em *Gynostemma pentaphyllum* análises mais acuradas sobre a expressão gênica revelou que LTR-RTs dentro de íntrons exercem um poder supressor da expressão gênica, em contra partido, quando os LTR-RTs encontram-se em regiões promotoras, exercem forte influência agindo como promotores da expressão gênica (LI *et al*., 2022).

Os elementos Ty1-copia (Gymco II, TAR, Ale, Angela e Bianca) juntos somaram 16 *clusters*, tendo uma significante expressão na composição das porções repetitivas do DNA de *L. pinaster*. A linhagem/família Tork, foi representada em 14 *clusters*, não sendo frequente no domínio GAG (Figura 26). Sabe-se que esta linhagem compõe o grupo das principais linhagens de elementos repetitivos retrotransposons Ty1-copia (LI *et al*., 2022) estando presente e quase sempre anotados para genomas de plantas.

Os elementos componentes da linhagem/família Tork foram descritos como linhagem Tork/TAR para *Saccharum spontaneum* com grande diversidade de cópias (YANG *et al*., 2020). Em análises de linhagens de Ty1-copia, Orozco-Arias *et al*. (2023) observaram que linhagem envolvendo Tork/TAR/Ikeros apresentaram alta similaridade, porém a distribuição desigual desta linhagem em filogenias de elementos, configura incongruências em topologias de árvores filogenéticas indicando que provavelmente, estas linhagens podem ter se originado de eventos de transferência horizontal (HT) (OROZCO-ARIAS *et al.*, 2023).

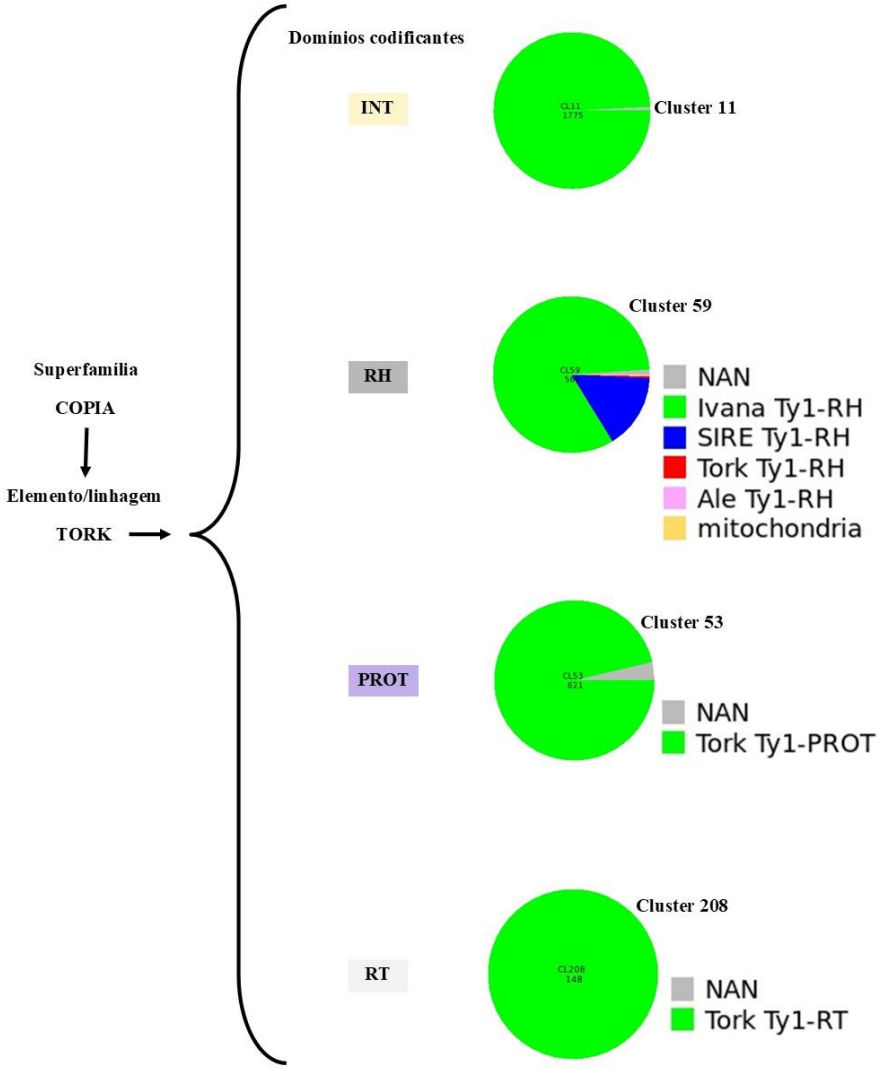



**Figura 26.** Representatividade dos elementos TORK Ty1-copia em quatro domínios codificantes internos: Integrase (INT), RNAse H (RH), Protease (PROT) e Transcriptase Reversa (RT) na porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.

As linhagens/famílias Ivana e Tork, juntas somaram 25 *clusters* com maior frequência nos domínios codificantes internos (INT, RH, PROT e RT). Estas linhagens/famílias não foram anotadas para o domínio codificante interno GAG (Figuras 26 e 27). As outras linhagens/famílias foram anotadas para 1 (GymcoII), 2 (Ale, Angela e TAR) e 3 (Bianca) domínios codificantes internos respectivamente. A linhagem/família Ivana formou 11 *clusters* sendo o terceiro grupo de elementos repetitivos retrotransposons Ty1-copia mais abundante anotados para esta superfamília de elementos.

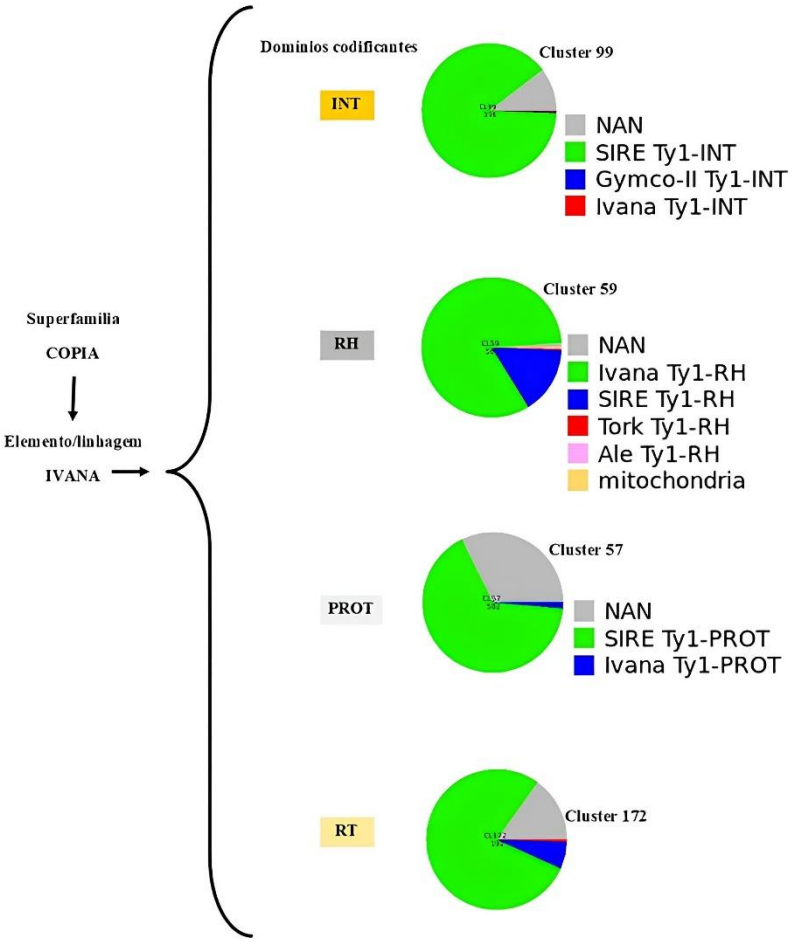



**Figura 27.** Representatividade dos elementos IVANA Ty1-copia em quatro domínios codificantes internos: Integrase (INT), RNAse H (RH), Protease (PROT) e Transcriptase Reversa (RT) na porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.

Elementos descritos para a superfamília Ty1-copia vem sendo caracterizados em diversos estudos na busca por lançar luz acerca dos mecanismos de evolução do genoma de diversas espécies de plantas, principalmente plantas cultivadas, o que tem revelado, uma grande diversidade de elementos Ty1-copia compondo as sequências do DNA repetitivo em plantas. A superfamília Ty1-copia é bem descrita para o genoma da videira realizada por Moisy *et al*., 2008, em *Chenopodium quinoa* (KOLANO *et al*., 2013), na evolução do genoma de coníferas (ZUCCOLO *et al*., 2015), em Plantas LTR (SUGUIYAMA *et al*., 2019), em *Passiflora edulis* (COSTA *et al*., 2019), e na espécie de leguminosa *Lupinus albus* L. (MARQUES *et al*., 2022).

Em estudos realizados para identificar e caracterizar elementos repetitivos, as linhagens/famílias SIRE e Tork de Ty1-copia destacam-se por sua abundância e condição conservada em diversos genomas. Linhagens de SIRE são descritas para o genoma da soja (*Glycine*) em espécies perenes e anuais por Chesnay *et al*. (2007).

Novák *et al*. (2014) destacam a grande diversidade da linhagem Maximus/SIRE no genoma da família Musaceae. Kuo *et al*. (2021) relatam como destaque na composição do genoma do gênero *Sorghum,* sendo ainda a sua diversidade confirmada para espécies de Asteraceae com significativa contribuição na composição da porção repetitiva do DNA de cinco espécies (VANTIMIGLIA *et al*., 2023). Estes resultados, corroboram com os resultados apresentados neste nosso estudo.

A linhagem/família Tork, foi a segunda mais anotada em diversidade para a superfamília Ty1-copia, esta formou 14 *clusters* e foi predominante nos domínios codificantes internos (INT, RH, PROT e RT). A diversidade de elementos componentes da linhagem/família Tork é bem documentada por estudos como os conduzidos por Choi *et al*. (2014), Yang *et al*. (2020) e Vantimiglia *et al*. (2023). Os elementos pertencentes a superfamília Ty1-copia, tal como as linhagens/famílias SIRE e Tork, são diversas na composição de diversos genomas de plantas.

### 3.3. Diversidade de elementos retrotransposons Ty3-Gypsy/Tekay/Reina em *Lychnophora pinaster* Mart.

Os elementos mais abundantes quanto a anotação de linhagens/famílias para a superfamília Ty3-gypsy, foram as linhagens/famílias Tekay e Reina sendo anotados ao todo 8 linhagens (ver Tabela 8) em 79 *clusters*. As linhagens Athila, CHROM-oug, Galadriel e TAT foram as menos anotadas para formação de *clusters* (1 *cluster* formado apenas).

Ty3-gypsy é uma superfamília de retrotransposons LTR-RT muito diversa. Esta é composta por cerca de 14 linhagens e os seus elementos componentes. Em genomas de plantas de diversas famílias botânicas, os elementos Ty3-gypsy são predominantes, sendo elementos presentes dentro da linhagem/família Tekay, o grupo de elementos mais diversos na

composição do DNA repetitivo, como foi observado nos estudos realizados por Zagorski *et al*. (2020) para *Hieracium* um gênero da família Asteraceae, Marques *et al*. (2022) para a espécie de *Lupinus albus* uma leguminosa e Li *et al*. (2022), destacando as contribuições evolutivas para o genoma de Curcubitaceae.

Em nosso estudo, foi observado uma grande diversidade de elementos associados a linhagem/família Tekay, sendo esta a mais diversa em formação de *clusters* (55 *clusters*), tendo frequência nos cinco domínios codificantes internos (INT, RH, PROT, GAG e RT) (Figura 28). Apenas as linhagens/famílias Tekay Ty3-gypsy e SIRE Ty1-copia foram representadas nos cinco domínios. As linhagens/famílias Ivana e Tork pertencentes a Ty1-copia, foram frequentes em quatro domínios codificantes internos.

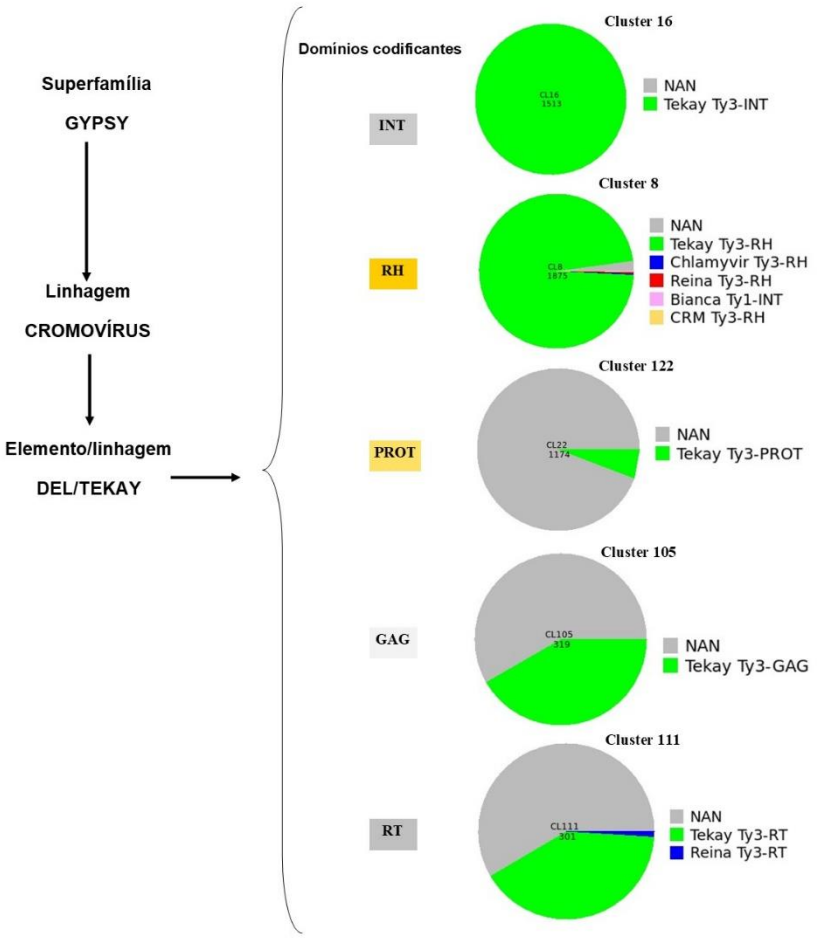



**Figura 28.** Representatividade dos elementos TEKAY Ty3-gypsy em cinco domínios codificantes internos: Integrase (INT), RNAse H (RH), Protease (PROT), Grupo Antígeno Específico (GAG) e Transcriptase Reversa (RT) na porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.

A linhagem/família de retrotransposons Reina, foi a segunda mais diversa para as anotações de *clusters* da superfamília Ty3-gypsy. Foram formados 10 *clusters* relacionados a Reina/elementos relacionados a esta linhagem que está relacionada a agrupamentos unicamente frequentes nos domínios codificantes internos (RH e RT) (Figura 29).

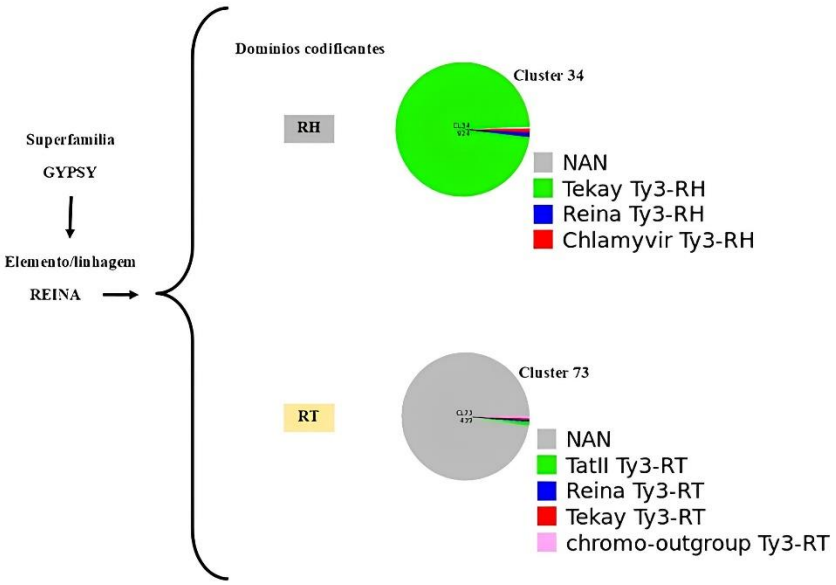



**Figura 29.** Representatividade dos elementos REINA Ty3-gypsy em dois domínios codificantes internos: RNAse H (RH) e Reversa (RT) na porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.

A diversidade de elementos relacionados a linhagem/família Reina Ty3-gypsy foi representada em análises para o genoma de *Passiflora edulis* por Costa *et al*. (2019) bem como foi constatada a predominância da linhagem Del/Tekay, em Zhang *et al*. (2020). Observa-se uma suposta predominância de elementos relacionados a linhagens Reina até mesmo superior aos elementos de Tekay.

Em nosso estudo, as análises preliminares apontam para uma grande diversidade de elementos repetitivos retrotransposons LTR-RTs representando 8 linhagens de Ty3-gypsy distribuídas em dois cromodomínios *Chromovírus* e *Não-Chromovírus*.

### 3.4. Elementos frequentes de Ty1-copia e Ty3-gypsy em *Lychnophora pinaster* Mart.

Foram anotados e identificados 34 elementos (17 Ty1-copia, 17 Ty3-gypsy) distribuídos em 8 linhagens/famílias de Ty1-copia e 8 linhagens/famílias de Ty3-gypsy, sendo formados 145 *clusters* representados por 16 linhagens/famílias que variaram entre 1% (Athila e TAR) e 17% a 38% (SIRE e Tekay) como as mais representativas de cada superfamília de elementos repetitivos (Figura 30).

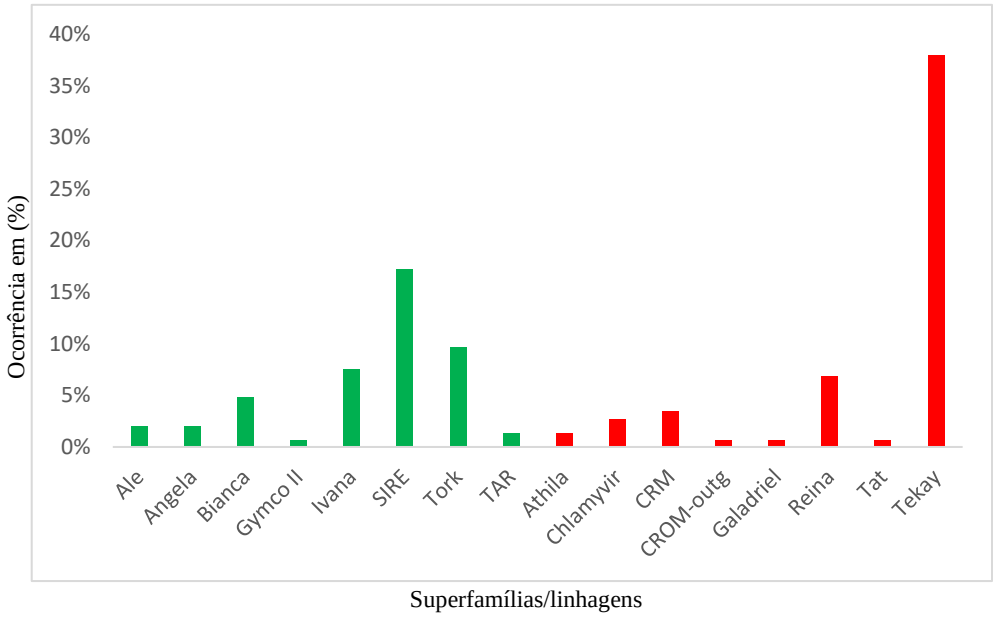



**Figura 30.** Ocorrência de Linhagens/famílias Ty1-copia e Ty3-gypsy na formação de *clusters*. Análise preliminar da porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.

As linhagens/famílias mais frequentes foram SIRE Ty1-copia e Tekay Ty3-gypsy (Figura 31). No total, a superfamília Ty3-gypsy apresentou maior frequência, cerca de 55% dos *clusters* anotados, Ty1-copia foi representada por cerca de 45% dos *clusters* formados.

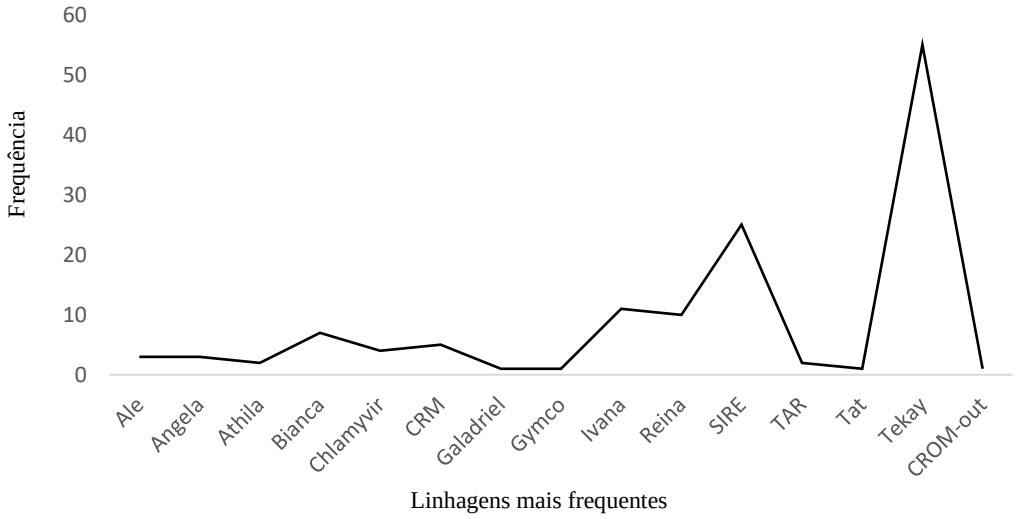



**Figura 31.** Frequência de ocorrências de linhagens/famílias Ty1-copia e Ty3-gypsy na composição da porção repetitiva do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.

SIRE e Tekay são linhagens de elementos repetitivos com ocorrência comprovada em genomas de espécies vegetais estudadas como *Arabidopsis* sp. (ZHANG *et al*., 2020; WOS *et al*., 2021), anotadas como altamente abundante no genoma de *Lupinus albus* (MARQUES *et al*., 2022) ou com larga ocorrência no genoma de espécies da família Curcubitaceae (LI *et al*. 2022).

Os TEs descritos como LTR-RTs, possuem domínios internos específicos que codificam para proteínas que estão intimamente relacionadas ao processo de transposição descritas como: GAG (Group-specific Antigen), POL (Poliproteína contendo PROT, Aspartic Proteinase), e (INT, Integrase, RT, Transcriptase Reversa e RH, RNAse H) (NEUMANN *et al*., 2005, COSTA *et al*., 2019).

Em nossas análises, as linhagens/famílias de TEs SIRE Ty1-copia e Tekay Ty3-gypsy, apresentaram frequência nos cinco domínios codificantes internos (RH, INT, PROT, GAG e RT) (Figura 32).

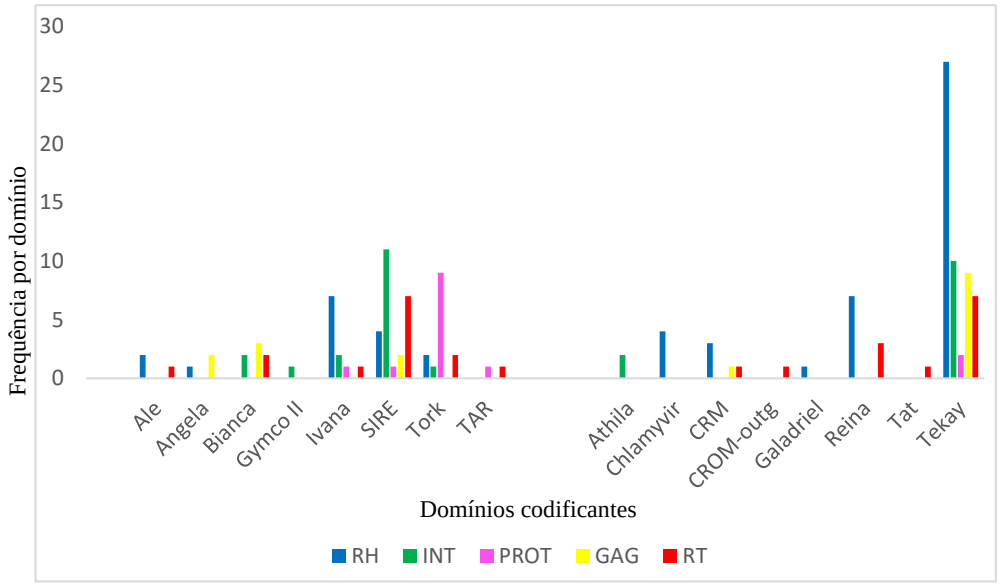



**Figura 32.** Frequência de linhagens/famílias Ty1-copia e Ty3-gypsy por domínio codificante interno. Análise preliminar da composição das sequências repetitivas do DNA de *Lychnophora pinaster* Mart.

Em muitos *clusters* formados contendo elementos SIRE e Tekay, a similaridade para cada domínio variou entre 94% a 100%. Tanto elementos Ty1-copia quanto elementos de Ty3-gypsy possuem relações bem específicas atreladas a funcionalidade de cada domínio codificante interno, no presente estudo, os *clusters* de elementos mais predominantes foram formados dentro dos domínios RH (58 *clusters*), INT (28 *clusters*) e RT (27 *clusters*).

No presente estudo, as análises evidenciam uma maior concentração de elementos SIRE e Tekay relacionados aos domínios INT (11 *clusters* SIRE) e RH (27 *clusters* Tekay). Muitos desses elementos, tanto da superfamília Ty1-copia, quanto da superfamília Ty3-gypsy, são classificados de acordo com a localização dos domínios, geralmente da INT (PEREIRA, 2004; ZHANG *et al*., 2020).

### 3.5. Análise individual e comparativa entre populações de *Lychnophora* sp.

De forma adicional, foi realizada uma análise individual para a caracterização dos tipos de repetições, e em seguida, uma análise comparativa entre 6 populações de *Lychnophora pinaster* e 1 população de *Lychnophora salicifolia* (Tabela 9).

**Tabela 9**. Informações das amostras das populações de *Lychnophora* sp. e códigos utilizados nas análises.

| Amostra/população | Biblioteca | Espécie | Código |
|---|---|---|---|
| UDP0025 = NLSC 06.1 | S36 | *Lychnophora pinaster* | lp25 |
| UDP0026 = NLSC 05P | S37 | *Lychnophora pinaster* | lp26 |
| UDP0027 = SRM 04.1 | S38 | *Lychnophora pinaster* | lp27 |
| UDP0029 = SSa 203 | S56 | *Lychnophora pinaster* | lp29 |
| UDP0030 = SM 10P | S57 | *Lychnophora pinaster* | lp30 |
| UDP0031 = SS 09 | S58 | *Lychnophora pinaster* | lp31 |
| UDP0028 = ITBO 02 | S39 | *Lychnophora salicifolia* | ls28 |

NLSC: Nova Lima/Serra da Calçada, SRM: Serra do Rola Moça, SSa: Serra do Salto, SM: Serra da Moeda, SS: Serra do Sofá, ITBO: Itacambira/Botumirim. (lp: *Lychnophora pinaster*, ls: *Lychnophora salicifolia*).

De acordo com os resultados obtidos após as análises individuais para cada população, as linhagens de DNA repetitivo mais abundantes na composição genômica de todas as populações analisadas foram SIRE pertencente a superfamília Ty1-copia, e a linhagem Tekay pertencente a superfamília Ty3-gypsy (Tabela 10).

**Tabela 10.** Classes/linhagens de DNA repetitivo e suas proporções genômicas (%) identificadas em análises individuais das populações de arnica (*Lychnophora* sp.), utilizando o RepeatExplorer2.

| | Amostra | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Classes de DNA** | **lp25** | **lp26** | **lp27** | **lp29** | **lp30** | **lp31** | **ls28** |
| **Class_I** | 0,03 | 0,1 | 0,13 | 0,04 | 0,01 | 0,03 | 0,05 |
| **LINE** | - | - | - | 0,04 | - | 0,04 | - |
| **LTR** | 0,04 | 0,21 | 0,03 | 0,41 | 0,6 | 1,18 | 3,83 |
| **Ty1_copia** | 0,02 | 0,02 | - | - | 0,01 | 0,02 | 0,01 |
| **Ty1_copia_Ale** | - | - | - | - | - | 0,01 | - |
| **Ty1_copia_Angela** | 1,01 | 1,08 | 1,09 | 0,87 | 1,04 | 0,89 | 0,61 |
| **Ty1_copia_Bianca** | 0,2 | 0,19 | 0,19 | 0,32 | 0,22 | 0,22 | 0,14 |
| **Ty1_copia_Ikeros** | 0,04 | 0,03 | 0,05 | 0,03 | 0,05 | 0,03 | - |
| **Ty1_copia_SIRE** | 10,97 | 4,33 | 11,33 | 10,42 | 11,62 | 10,12 | 7,28 |
| **Ty1_copia_TAR** | 0,11 | 0,08 | 0,11 | 0,05 | 0,08 | 0,03 | - |
| **Ty1_copia_Tork** | 0,74 | 0,74 | 0,85 | 0,74 | 0,75 | 0,79 | 0,76 |
| **Ty3_gypsy** | - | - | - | - | 0,01 | - | - |
| **Ty3_gypsy_Tekay** | 19,72 | 20,23 | 20,75 | 18,43 | 20,7 | 18,57 | 13,85 |
| **Ty3_gypsy_Athila** | 0,62 | 0,65 | 0,67 | 0,46 | 0,63 | 0,15 | 0,81 |
| **EnSpm_CACTA** | 0,57 | 0,49 | 0,58 | 0,62 | 0,56 | 0,47 | 0,32 |
| **hAT** | 0,28 | 0,26 | 0,3 | 0,35 | 0,27 | 0,35 | 0,16 |
| **MuDR_Mutator** | - | 0,03 | 0,03 | 0,02 | - | 0,02 | - |
| **PIF_Harbinger** | 0,01 | - | - | 0,01 | - | 0,03 | - |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Helitron** | 0,37 | 0,22 | 0,32 | 0,40 | 0,28 | 0,29 | 0,18 |
| **45S_rDNA** | 0,53 | 0,37 | 0,45 | 0,51 | 0,56 | 0,38 | 0,5 |
| **5S_rDNA** | 0,08 | 0,04 | 0,05 | 0,05 | 0,1 | 0,47 | 0,19 |
| **Satellite** | 1,12 | 0,97 | 0,49 | 1,01 | 0,95 | 1,31 | 0,5 |
| **Não-classificado** | 9,87 | 17,09 | 10,05 | 10,36 | 9,41 | 7,02 | 9,13 |
| **TOTAL** | 46,33 | 47,12 | 47,48 | 45,14 | 47,84 | 44,53 | 43,97 |

lp: População *Lychnophora pinaster*, ls: População *Lychnophora salicifolia*.

As linhagens SIRE e Tekay estão presentes em genomas de espécies vegetais estudadas como *Arabidopsis* sp. (ZHANG *et al*., 2020; WOS *et al*., 2021), *Lupinus albus* (MARQUES *et al*., 2022) ou com ocorrência comprovada para o genoma de algumas espécies das famílias Curcubitaceae, Asteraceae e Fabaceae (ZAGORSKI *et al*., 2020; LI *et al*., 2022; MARQUES *et al*., 2022). A linhagem SIRE é bem representada no genoma de diversas plantas cultivadas. Sua diversidade foi estudada para *Taraxacum oficinale* por Carvalho *et al*. (2016), em *Erianthus arundinaceus* por Huang *et al*. (2017), para o genoma de *Saccharum spontaneum* por Yang *et al*. (2020) e em *Arabidopsis arenosa* por Wos *et al*. (2021) como elemento com potencial responsivo ao estresse.

As análises individuais ainda indicaram para a predominância das duas principais superfamílias Ty1-copia e Ty3-gypsy como sendo os principais componentes da porção repetitivas do DNA das populações de *Lychnophora* sp. analisadas (Figura 33).

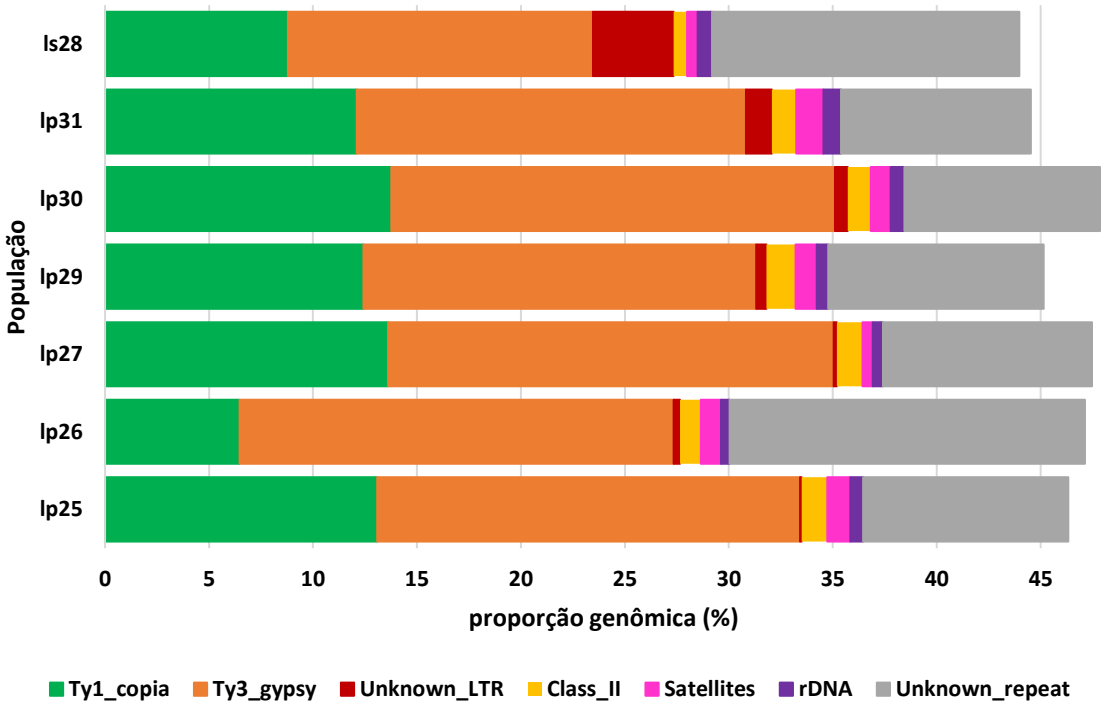



**Figura 33.** Abundância relativa (%) de sequências repetitivas nas populações individuais de arnica (*Lychnophora* sp.) conforme análise usando o RepeatExplorer2. lp. *Lychnophora pinaster*, ls. *Lychnophora salicifolia*.

As duas superfamílias Ty1-copia e Ty3-gypsy são os principais grupos de elementos repetitivos presentes no genoma de plantas (OROZCO-ARIS *et al*., 2019; NEUMANN *et al*., 2019). Elementos repetitivos LTR retrotransposons pertencentes a superfamília Ty1-copia, apresentam expressiva frequência em genomas de plantas.

Espécies de plantas cultivadas como *Solanum lycopersicum* (PAZ *et al*., 2017), *Passiflora edulis* (PAMPONÉT *et al*., 2019; COSTA *et al*., 2019), *Brachypodium distachyum* (STRITT *et al*., 2020), *Capsicum annuum* (PARK *et al*., 2012; YAÑEZ-SANTOS *et al*., 2021) e *Arabidopsis lyrata* (ZHANG *et al*., 2020) apresentam em sua composição repetitiva do DNA, diversas linhagens Ty1-copia, sendo estas também identificadas em espécies selvagens ou cultivadas de leguminosas (JAYASWAL *et al*., 2020; MATA-SUCRE *et al*., 2020).

A superfamília Ty3-gypsy geralmente é mais abundante que a superfamília Ty1-copia, em todas as nossas análises ficou clara a predominância desta superfamília tanto nas análises de anotações preliminares quanto na análise comparativa entre populações de *Lychnophora* sp. (Figura 34). Esse tipo de predominância também foi verificado por Du *et al*. (2010) em múltiplas análises para o genoma da soja, e por Souza *et al*. (2018) analisando a abundância de retrotransposons no genoma de *Eliocharis* R.Br.

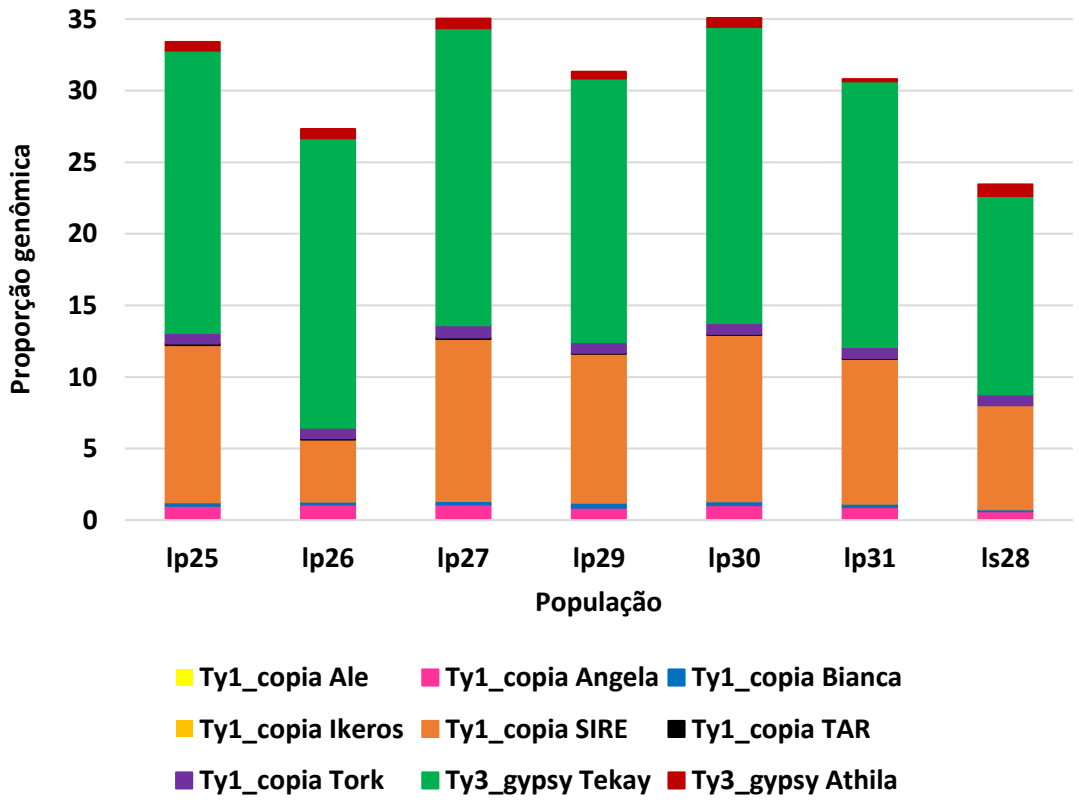



**Figura 34**. Proporção genômica das sequências repetitivas de duas superfamílias da ordem LTR identificadas nas populações de arnica (*Lychnophora* sp.). Ty1-copia e suas linhagens. Ty3-gypsy e suas linhagens. (lp. *Lychnophora pinaster*, ls. *Lychnophora salicifolia*.

As linhagens de DNA repetitivo Ty1-copia/SIRE e Ty3-gypsy/Tekay compõem em termos proporcionais, a maior porção genômica da fração repetitiva do DNA após análise comparativa das populações de *L. pinaster* e *L. salicifolia* (Tabela 11). Este resultado foi similar ao observado para as análises preliminares e posteriores para todo o banco de dados das arnicas.

**Tabela 11.** Classes de DNA repetitivo e suas proporções genômicas (%) identificadas na análise comparativa entre as populações de arnica (*Lychnophora sp.*), utilizando o RepeatExplorer2.

| Tipo de repetição | Proporção |
|---|---|
| **Class_I** | 0,17 |
| **LINE** | 0,04 |
| **LTR** | 0,30 |
| **Ty1_copia** | 0,02 |
| **Ty1_copia/Ale** | 0,23 |
| **Ty1_copia_Angela** | 1,03 |
| **Ty1_copia_Bianca** | 0,28 |
| **Ty1_copia_Ikeros** | 0,06 |
| **Ty1_copia/Ivana** | 0,09 |
| **Ty1_copia_SIRE** | 12,81 |
| **Ty1_copia_TAR** | 0,20 |
| **Ty1_copia_Tork** | 1,03 |
| **Ty3_gypsy/Galadriel** | 0,03 |
| **Ty3_gypsy_Tekay** | 22,55 |
| **Ty3_gypsy_Athila** | 0,91 |
| **Class_I/pararetrovirus** | 0,04 |
| **EnSpm_CACTA** | 0,88 |
| **hAT** | 1,06 |
| **MuDR_Mutator** | 0,47 |
| **PIF_Harbinger** | 0,29 |
| **Helitron** | 0,73 |
| **45S_rDNA** | 0,48 |
| **5S_rDNA** | 0,08 |
| **Satellite** | 1,94 |
| **Não-classificado** | 9,14 |
| **TOTAL** | 54,86 |

Dentro das análises comparativas entre as populações de espécies diferentes de *Lychnophora* sp., as linhagens das superfamílias Ty1-copia/SIRE e Ty3-gypsy/Tekay compõem cerca de 35,36% da composição do genoma das espécies comparadas (Tabela 11). As duas linhagens de DNA repetitivo SIRE e Tekay são em muitos casos, as principais linhagens componentes do DNA repetitivo em muitas espécies vegetais. Para espécies da família Asteraceae, assim como em *L. pinaster* e *L. salicifolia* estas duas linhagens de DNA repetitivo, também foram identificadas como sendo as porções mais abundantes na composição

do genoma de *Erianthus arundinaceus* por Huang *et al*. (2017), e em *Stevia rebaudiana* por Simoni *et al*. (2022).

Os elementos repetitivos retrotransposons representados pelas duas principais superfamílias Ty1-copia e Ty3-gypsy, dominam porções significativas do genoma de diversas espécies, sendo estas duas superfamílias de DNA repetitivo as principais encontradas em genomas de plantas (NEUMANN *et al*., 2019).

Neste estudo, quando comparadas as populações de *L. pinaster* e *L. salicifolia*, observou-se uma grande diferenciação entre a composição do genoma das duas espécies segundo a formação dos *clusters* de acordo com as frações repetitivas do DNA e suas significantes proporções para a composição de cada *cluster* (Figura 35).

Na comparação entre as espécies diferentes de *Lychnophora* sp. ficou clara a predominância das linhagens Ty1-copia/SIRE e Ty3-gypsy/Tekay na composição de uma porção significativa do genoma das espécies, bem como na formação dos *clusters* (Figura 35). Em estudo comparando espécies de *Phaseolus* sp., Ferraz *et al*. (2023) encontraram resultados semelhantes quanto a predominância dos elementos Tekay e SIRE na composição do genoma de espécies do gênero *Phaseolus*, e para espécies de *Cicer* sp., Mokhtar *et al*. (2023) evidenciaram a grande significância das superfamílias Ty1-copia e Ty3-gypsy na composição do genoma de três espécies deste gênero.

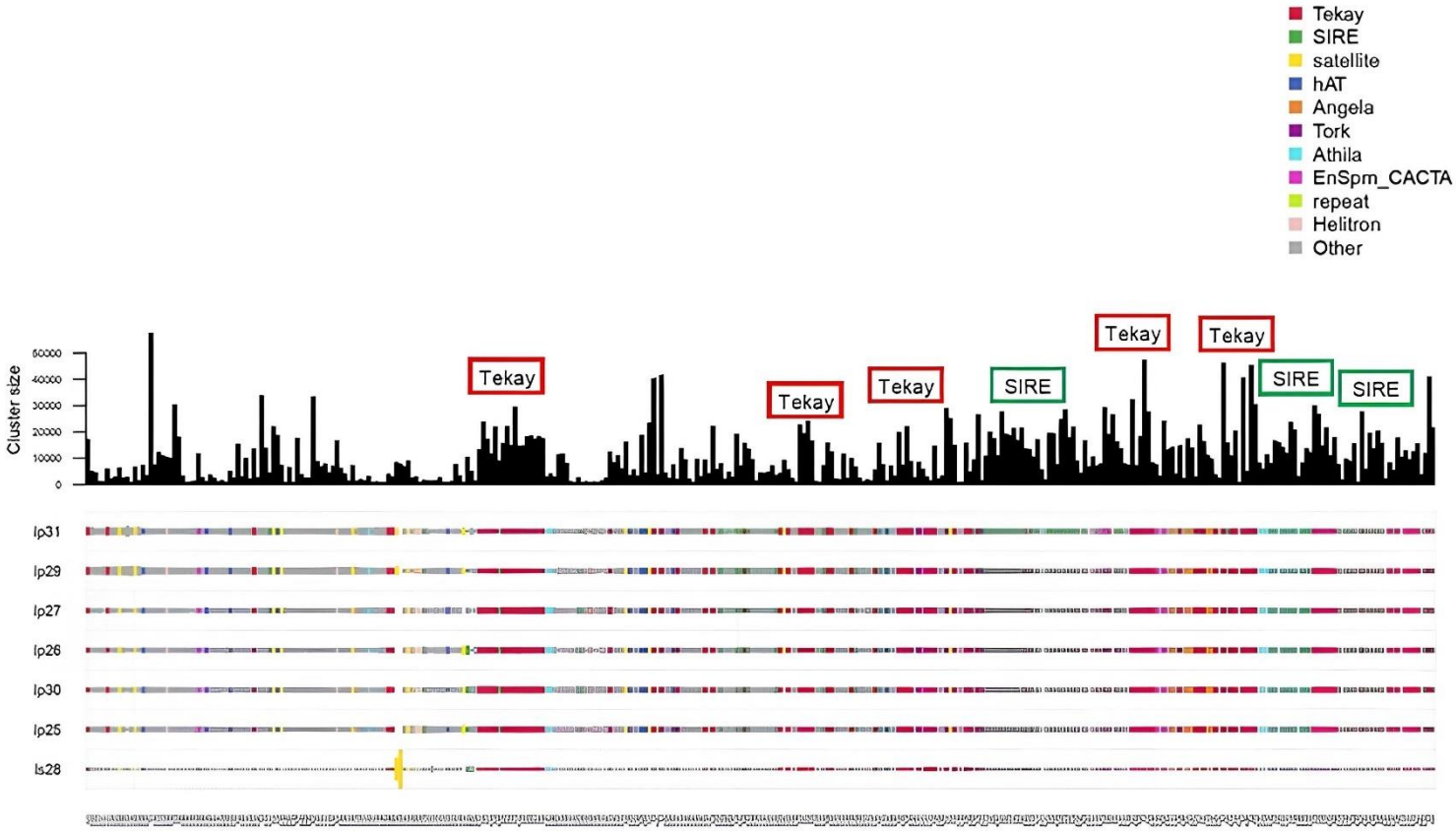



**Figura 35**. Comparação da composição repetitiva entre as populações de arnica (*Lychnophora sp.*) inferida a partir de uma análise comparativa do RepeatExplorer2. As colunas representam diferentes *clusters* e as cores representam diferentes repetições. Em vermelho (Tekay), e em verde (SIRE) representando as principais linhagens de DNA repetitivo componentes dos genomas de *Lychnophora pinaster* e *Lychnophora salicifolia*.

## 4. CONCLUSÃO

As populações de *Lychnophora pinaster* apresentam grande diversidade genética e expressiva diferenciação interpopulacional. As características de distribuição destas populações refletem a sua complexidade genética quando comparadas as populações de regiões diferentes.

Os resultados obtidos a partir das análises de diversidade e estrutura populacional das dezesseis populações serviram como base para o desenvolvimento das análises para o estudo da composição das porções repetitivas do DNA de *L. pinaster* e genômica comparativa com a espécie *L. salicifolia*.

Após análises acerca da composição do DNA repetitivo de *L. pinaster*, os resultados preliminares demonstraram uma diversidade de elementos repetitivos retrotransposons componente das duas superfamílias Ty1-copia e Ty3-gypsy, com duas linhagens/família principais SIRE e Tekay apresentando maior diversidade dentro dos elementos repetitivos identificados até então.

Os grupos de elementos repetitivos identificados e anotados neste estudo, possivelmente poderão colaborar para o acréscimo de conhecimentos e informações acerca da evolução do genoma da espécie, pois sabe-se que os elementos repetitivos são importantes promotores da evolução do genoma em plantas.

Os resultados das análises comparativas e individuais demonstraram a grande predominância das linhagens Ty1-copia e Ty3-gypsy na porção repetitiva do genoma das espécies *L. pinaster* e *L. salicifolia*.

O presente estudo, trata de uma primeira abordagem acerca da composição das sequências do DNA repetitivo do genoma de duas espécies do gênero *Lychnophora*. Os dados e resultados obtidos após análises de sequências repetitivas, poderão fundamentar novos estudos que busquem investigar aspectos fenológicos e químicos relacionados a composição das frações repetitivas de indivíduos das diferentes populações de do gênero distribuídas ao longo da Serra do Espinhaço no estado de Minas Gerais.

Espera-se que, com os esforços empreendidos, e com o uso de novas abordagens, novas pesquisas possam evidenciar a importância do conhecimento das características genéticas da espécie, e que por fim, possa ser propostos e desenvolvidos programas e planos de manejo e conservação para as populações de *L. pinaster*.

## 5. REFERÊNCIAS

ARANGO-LÓPEZ, J; OROZCO-ARIAS, S; SALAZAR, J.A; GUYOT, R. **Colombian Conference on Computing**. Springer; Cham, Switzerland. Application of data mining algorithms to classify biological data: The *Coffea canephora* genome case. p. 156–170, 2017.

BENNETZEN, J.L; WANG, H. The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 505-30, 2014.

BRUNNER, S; FENGLER, K; MORGANTE, M; TINGEY, S; RAFALSKI, A. Evolution of DNA sequence nonhomologies among maize inbreds. **Plant Cell**, v. 17(2), p. 343-60, 2005.

CASACUBERTA, E; GONZÁLEZ, J. O impacto dos elementos transposáveis na adaptação ambiental. **Molecular Ecology**, v. 22(6), p. 1503-17, 2013.

CATCHEN, J; HOHENLOHE, P.A; BASSHAM, S; AMORES, A; CRESKO, W.A. Stacks: An analysis tool set for population genomics. **Molecular Ecology**, v. 22, p. 3124-3140, 2013.

CHAPARRO, C; GAYRAUD, T; DE SOUZA, R.F; DOMINGUES, D.S; AKAFFOU, S; LAFORGA VANZELA, A.L; KOCHKO, A.D; RIGOREAU, M; CROUZILLAT, D; HAMON, S; HAMON, P; GUYOT, R. Retrotransposons de repetição de terminais com domínio GAG em genomas vegetais: um novo testemunho sobre o complexo mundo dos elementos transposáveis. **Genome Biology and Evolution**, v. 7(2), p. 493-504, 2015.

CHESNAY, C; KUMAR, A; PEARCE, S.R. Diversidade genética de retroelementos SIRE-1 em espécies anuais e perenes de *Glycine* revelada usando SSAP. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 12(1), p. 103-110, 2007.

CHOI, HI; WAMINAL, N.E; PARQUE, H.M; KIM, N.H; CHOI, B.S; PARQUE, M; CHOI, D; LIM, Y.P; KWON, S.J; PARQUE, B.S; KIM, H.H; YANG, T.J. Principais componentes de repetição cobrindo um terço do genoma do ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) e evidências de allotetraploidy. **Plant J**, v. 77(6), p. 906-16, 2014.

COSTA, Z.P; CAUZ-SANTOS, L.A; RAGAGNIN, G.T; VAN SLUYS, M.A; DORNELAS, M.C; BERGES, H; DE MELLO VARANI, A; VIEIRA, M.L.C. Descoberta de elementos transponíveis e caracterização de linhagens evolutivas LTR-retrotransposon na espécie frutífera tropical Passiflora edulis. **Molecular Biology Reports**, v. 46(6), p. 6117-6133, 2019.

DEVOS, K.M; BROWN, J.K; BENNETZEN, J.L. Genome size reduction through illegitimate recombination counteracts genome expansion in Arabidopsis. **Genome Research**, v. 12(7), p. 1075-9, 2002.

DOYLE, J.J; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

ECKARDT, N.A. Sequenciamento do genoma do arroz. **Célula vegetal**, v. 12, p. 2011-2017, 2000.

EL BAIDOURI, M; PANAUD, O. Comparative genomic paleontology across plant kingdom reveals the dynamics of TE-driven genome evolution. **Genome Biology and Evolution**, v. 5(5), p. 954-965, 2013.

FERRAZ ME, RIBEIRO T, SADER M, NASCIMENTO T, PEDROSA-HARAND A. Comparative analysis of repetitive DNA in dysploid and non-dysploid *Phaseolus* beans. **Chromosome Research**, v. 31(4), p. 30, 2023.

FERREIRA DE CARVALHO, J; DE JAGER, V; VAN GURP, T.P; WAGEMAKER, N.C; VERHOEVEN, K.J. Elementos transponíveis recentes e dinâmicos contribuem para a divergência genômica sob a assexualidade. **BMC Genomics**, v. 17, p. 884, 2016.

GALINDO-GONZÁLEZ, L; MHIRI, C; DEYHOLOS, M.K; GRANDBASTIEN, M.A. LTR-retrotransposons nas fábricas: Motores de evolução. **Gene**, v. 626, p. 14-25, 2017.

GAO, X; HOU, Y; EBINA, H; LEVIN, H.L; VOYTAS, D.F. Cromodomínios integração direta de retrotransposons à heterocromatina. **Genome Research**, v. 18, p. 359-369, 2008.

GAO, D; JIMENEZ-LOPEZ, J.C; IWATA, A; GILL, N; JACKSON, S.A. Divergência funcional e estrutural de uma incomum família retrotransposon ltr em plantas. **PLos ONE**, v. 7(10), e48595, 2012.

GAO, D; JIANG, N; WING, R.A; JIANG, J; JACKSON, S.A. As transposons desempenham um papel importante na evolução e diversificação dos centrosmers entre espécies intimamente relacionadas. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 216, 2015.

GRANDBASTIEN, M.A. Retrotransposons LTR, caroneiros úteis da regulação de plantas e resposta ao estresse. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1849(4), p. 403-416, 2015.

GROVER, C.E; WENDEL, J.F. Insights recentes sobre mecanismos de variação do tamanho do genoma nas plantas. **Journal Botany**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

HIRSCH, C.D; SPRINGER, N.M. Transposable element influences on gene expression in plants. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1860(1), p. 157-165, 2017.

HUANG, Y; LUO, L; HU, X; YU, F; YANG, Y; DENG, Z; WU, J; CHEN, R; ZHANG, M. Caracterização, Organização Genômica, Abundância e Distribuição Cromossômica de Retrotransposons Ty1-copia em *Erianthus arundinaceus*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7(8), p. 924, 2017.

JAYASWAL, P.K; SHANKER, A; SINGH, N.K. Genoma ampla anotação e caracterização de jovens, intactos longos terminais repetitivos retrotransposons (In-LTR-RTs) de sete espécies de leguminosas. **Genética**, v. 148, p. 253-268, 2020.

KOLANO, B; BEDNARA, E; WEISS-SCHNEEWEISS, H. Isolamento e caracterização de fragmentos de transcriptase reversa de retrotransposons LTR do genoma de Chenopodium quinoa (Amaranthaceae). **Plant Cell Reports**, v. 32(10), p. 1575-88, 2013.

KUO, Y.T; ISHII, T; FUCHS, J; HSIEH, W.H; HOUBEN, A; LIN, Y.R. A dinâmica evolutiva do DNA repetitivo e seu impacto na diversificação genômica do gênero *sorgo*. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, e729734, 2021.

LI, S.F; ELA, H.B; YANG, L.L; LAN, L.N; ZHANG, X.Y; WANG, L.Y; ZHANG, Y.L; LI, N; DENG, C.L; QIAN, W; GAO, W.J. Impacto dos retrotransposons LTR na estrutura, evolução e função do genoma em espécies de Curcurbitaceae. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23(17), e10158, 2022.

LISCH, D. How important are transposons for plant evolution? **Nature Reviews Genetics**, v. 14(1), p. 49-61, 2013.

LIU, Z; YUE, W; LI, D; WANG, R.R; KONG, X; LU, K; WANG, G; DONG, Y; JIN, W; ZHANG, X. Structure and dynamics of retrotransposons at wheat centromeres and pericentromeres. **Chromosoma**, v. 117(5), p. 445-56, 2008.

LLORENS, C; MUÑOZ-POMER, A; BERNAD, L; BOTELLA, H; MOYA, A. Dinâmicas de rede de retroelements eucarióticos ltr além de árvores filogenéticas. **Biology Direct**, v. 4, p. 41, 2009.

LLORENS, C; FUTAMI, R; COVELLI, L. The Gypsy database (GyDB) of mobile genetic elements: release 2.0. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. D70-D74, 2011.

MAKAREVITCH, I; WATERS, A.J; WEST, P.T; STITZER, M; HIRSCH, C.N; ROSS-IBARRA, J. Elementos transposáveis contribuem para a ativação de genes de milho em resposta ao estresse abiótico. **PLoS Genetics**, v. 11, e1004915, 2015.

MARQUES, A; HUFNAGEL, B; SORIANO, A; PÉRET, B. Os centrômeros altamente diversos (peri) de tremoço branco (*Lupinus albus* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 13, e862079, 2022.

MATA-SUCRE, Y; SADER, M; VAN-LUME, B. et al. Qual a diversidade da heterocromatina no grupo Caesalpinia? Caracterização citogenômica de *Erythrostemon hughesii* Gagnon & G.P. Lewis (Leguminosae: Caesalpinioideae). **Planta**, v. 252, p. 49, 2020.

MHIRI, C; PARISOD, C; DANIEL, J; PETIT, M; LIM, K.Y; DORLHAC DE BORNE, F; KOVARIK, A; LEITCH, A.R; GRANDBASTIEN, M.A. As cargas de elementos transposáveis dos pais influenciam sua dinâmica em híbridos e aotostraploides jovens nicotiana. **Novo Fitol**, v. 221(3), p. 1619-1633, 2019.

MOISY, C; GARRISON, K.E; MEREDITH, C.P; PELSY, F. Caracterização de dez novas famílias de retrotransposon Ty1/copia-like do genoma da videira. **Genômica BMC**, v. 9, p. 469, 2008.

MOKHTAR MM, FOUAD AS, ABD-ELHALIM HM, EL ALLALI A. CicerSpTEdb2.0: An Upgrade of *Cicer* Species Transposable Elements Database. **Methods in Molecular Biology**, v. 2703, p. 71-82, 2023.

MUSZEWSKA, A; HOFFMAN-SOMMER, M; GRYNBERG, M. LTR retrotransposons em fungos. **PLos ONE**, v. 6(12), e29425, 2011.

NEUMANN, P; POŽÁRKOVÁ, D; KOBLÍŽKOVÁ, A; MACAS, J. PIGY, um novo retrotransposon LTR da classe envelope da planta. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 273, p. 43-53, 2005.

NEUMANN, P; NOVÁK, P; HOŠTÁKOVÁ, N; MACAS, J. Levantamento sistemático de plantas LTR-retrotransposons elucida relações filogenéticas de seus domínios de poliproteínas e fornece uma referência para classificação de elementos. **Mobile DNA**, v. 10(1), p. 1, 2019.

NOVÁK, P; HŘIBOVÁ, E; NEUMANN, P; KOBLÍŽKOVÁ, A; DOLEŽEL, J; MACAS, J. Análise genômica ampla da diversidade repetida em toda a família Musaceae. **PLoS ONE**, v. 9(6), e98918, 2014.

NOVÁK, P; NEUMANN, P; MACAS, J. Análise global de DNA repetitivo a partir de leituras de sequências não montadas usando RepeatExplorer2. **Nature Protocols**, v. 15(11), p. 3745-3776, 2020.

OCHOA CRUZ, E.A; CRUZ, G.M.Q; VIEIRA, A.P; VAN SLUYS, M.A. Virus-like attachment sites as structural landmarks of plants retrotransposons. **Mobile DNA**, v. 7, p. 14, 2016.

OLIVER, K.R; MCCOMB, J.A; GREENE, W.K. Elementos transposáveis: poderosos contribuintes para a evolução e diversidade do angiosperm. **Genome Biology and Evolution**, v. 5(10), p. 1886-901, 2013.

OROZCO-ARIAS, S; ISAZA, G; GUYOT, R. Retrotransposons em Genomas Vegetais: Estrutura, Identificação e Classificação através de Bioinformática e Machine Learning. **International Journal of Molecular Science**, v. 20(15), p. 3837, 2019.

OROZCO-ARIAS, S; DUPEYRON, M; GUTIÉRREZ-DUQUE, D; TABARES-SOTO, R; GUYOT, R. Alta similaridade nucleotídica de três retrotransposons LTR da linhagem *Copia* entre genomas vegetais. **Genoma**, v. 66(3), p. 51-61, 2023.

PARK, M; PARK, J; KIM, S et al. A evolução do genoma grande em Capsicum annuum ocorreu através do acúmulo de retrotransposons de repetição terminal longa de tipo único e seus derivados. **Plant Journal**, v. 69, p. 1018-1029, 2012.

PATERSON, A.H; BOWERS, J.E; BRUGGMANN, R; DUBCHAK, I; GRIMWOOD, J; GUNDLACH, H. O genoma bicolor do Sorgo e a diversificação das gramíneas. **Natureza**, v. 457, p. 551-556, 2009.

PAZ, R.C; KOZACZEK, M.E; ROSLI, H.G. et al. Diversidade, distribuição e dinâmica de retroelementos Copia e Gypsy LTR completos em *Solanum lycopersicum*. **Genética**, v. 145, p. 417-430, 2017.

PEREIRA, V. Viés de inserção e seleção purificadora de retrotransposons no genoma de *Arabidopsis thaliana*. **Genome Biology**, v. 5, p. 79, 2004.

PIÉGU, B; BIRE, S; ARENSBURGER, P; BIGOT, Y. A survey of transposable element classification systems--a call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 86, p. 90-109, 2015.

PORTELLA, R.O; CORDEIRO, E.M.G; MARQUES, A.P.S; MING, L.C; ZUCCHI, M.I; LIMA, M.P; MARTINS, E.R; HANTAO, L.W; SAWAYA, A.C.H.F; SEMIR, J; PINHEIRO, J.B; MARQUES, M.O.M. Evidência de gradiente altitudinal modificando a diversidade genômica e química em populações de *Lychnophora pinaster* Mart. **Phytochemistry**, v. 192, e112898, 2021.

RAHMAN, A.Y; USHARRAJ, A.O; MISRA, B.B; THOTTATHIL, G.P; JAYASEKARAN, K; FENG, Y; HOU, S; ONG, S.Y; NG, FL; LEE, LS; TAN HS, SAKAFF MK, TEH, BS; KHOO, B.F; BADAI, S.S; AZIZ, N.A; YURYEV, A; KNUDSEN, B; DIONNE-LAPORTE, A; MCHUNU, N.P; YU, Q; LANGSTON, B.J; FREITAS, T.A; YOUNG, A.G; CHEN, R; WANG, L; NAJIMUDIN, N; SAITO, J.A; ALAM, M. Rascunho sequência de genoma da seringueira Hevea brasiliensis. **Genômica BMC**, v. 14, p. 75, 2013.

RAVINDRAN, S. Barbara McClintock and the discovery of jumping genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 20198-20199, 2012.

RAYBURN, A.L; BIRADAR, D.P; BULLOCK, D.G; MCMURPHY, L.M. Conteúdo de DNA nuclear em híbridos F1 de milho. **Heredidade**, v. 70, p. 294-300, 1993.

SARKAR, D; MAHATO, A.K; SATYA, P; KUNDU, A; SINGH, S; JAYASWAL, P.K. O genoma do rascunho de *Corchorus olitorius* cv. JRO-524 (Navin). **Genomics Data**, v. 12, p. 151-154, 2017.

SAHEBI, M; HANAFI, M.M; VAN WIJNEN, A.J; RICE, D; RAFII, M.Y; AZIZI, P; OSMAN, M; TAHERI, S; BAKAR, M.F.A; ISA, M.N.M; NOOR, Y.M. Contribuição de elementos transposáveis no genoma da planta. **Gene**, v. 665, p. 155-166, 2018.

SCHNABLE, P.S; WARE, D; FULTON, R.S; STEIN, J.C; WEI, F; PASTERNAK, S. O genoma do milho B73: complexidade, diversidade e dinâmica. **Ciência**, v. 326, p. 1112-1115, 2009.

SIMONI S, CLEMENTE C, USAI G, VANGELISTI A, NATALI L, TAVARINI S, ANGELINI LG, CAVALLINI A, MASCAGNI F, GIORDANI T. Characterisation of LTR-Retrotransposons of *Stevia rebaudiana* and Their Use for the Analysis of Genetic Variability. **International Journal of Molecular Science**, v. 23(11), p. 6220, 2022.

STRITT, C; WYLER, M; GIMMI, E.L; PIPPEL, M; ROULIN, A.C. **Novo Phytol**, 227(6):1736-1748, 2020.

SUGUIYAMA, V.F; VASCONCELOS, L.A.B; ROSSI, M.M; BIONDO, C; DE SETTA, N. A. abordagem da estrutura genética populacional adiciona novos conhecimentos sobre a evolução das linhagens de plantas LTR retrotransposon. **PLoS ONE**, v. 14(5), e0214542, 2019.

VANGELISTI, A; SIMONI, S; USAI, G; VENTIMIGLIA, M; NATALI, L; CAVALLINI, A; MASCAGNI, F; GIORDANI, T. (2021). Dinâmica de LTR-retrotransposon em genoma de figo comum (Ficus carica L.). **BMC Vegetal Biology**, v. 21(1), p. 221, 2021.

VENTIMIGLIA, M; CASTELLACCI, M; USAI, G; VANGELISTI, A; SIMONI, S; NATALI, L; CAVALLINI, A; MASCAGNI, F; GIORDANI, T. Descobrindo o Repetidoma de Cinco Espécies Pertencentes à Família Asteraceae: Um Estudo Computacional. **Plantas (Basileia)**, v. 12(6), 1405, 2023.

VITTE, C; PANAUD, O. LTR retrotransposons e tamanho do genoma da planta de floração: surgimento do modelo de aumento/diminuição. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110(1-4), p. 91-107, 2005.

VICIENT, C.M; CASACUBERTA, J.M. Impact of transposable elements on polyploid plant genomes. **Annals of Botany**, v. 120, p. 195-207, 2017.

WICKER, T; SABOT, F; HUA-VAN, A; BENNETZEN, J.L; CAPY, P; CHALHOUB, B; FLAVELL, A; LEROY, P; MORGANTE, M; PANAUD, O; PAUX, E; SANMIGUEL, P; SCHULMAN, A.H. Um sistema de classificação unificado para elementos transposáveis eucarióticos. **Nature Reviews Genetics**, v. 8(12), p. 973-82, 2007.

WICKER, T; GUNDLACH, H; SPANNAGL, M; UAUY, C; BORRILL, P; RAMÍREZ-GONZÁLEZ, R.H; DE OLIVEIRA, R; MAYER, K.F.X; PAUX, E; CHOULET, F. Impact of transposable elements on genome structure and evolution in bread wheat. **Genome Biology**, v. 19(1), p. 103, 2018.

WOS, G; CHOUDHURY, R.R; KOLÁŘ, F; PARISOD, C. Atividade transcricional de elementos transponíveis ao longo de um gradiente de elevação em Arabidopsis arenosa. **DNA da máfia**, v. 12(1), 7, 2021.

YANG, S; ZENG, K; CHEN, K; ZHAO, X; WU, J; HUANG, Y; ZHANG, M; DENG, Z. Sequence Evolution, Abundance, and Chromosomal Distribution of Ty1-copia Retrotransposons in the *Saccharum spontaneum* Genome. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 160(5), 272-282, 2020.

ZAGORSKI, D; HARTMANN, M; BERTRAND, Y.J.K; PAŠTOVÁ, L; SLAVÍKOVÁ, R; JOSEFIOVÁ, J; FEHRER, J. Caracterização e dinâmica de repetitomas em espécies estreitamente relacionadas de *Hieracium* (Asteraceae) e seus híbridos sintéticos e apomíticos. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 591053, 2020.

ZHANG, Q.J; GAO, L.Z. Rapid and Recent Evolution of LTR Retrotransposons Drives Rice Genome Evolution During the Speciation of AA-Genome *Oryza* Species. **G3 (Bethesda)**, v. 7(6), p. 1875-1885, 2017.

ZUCCHI, M.I; CORDEIRO, E.M.G; WU, X; LAMANA, L.M; BROWN, P.J; MANJUNATHA, S; VIANA, J.P.G; OMOTO, C; PINHEIRO, J.B; CLOUGH, S.J. Population genomics of the neotropical brown stink bug, euschistus heros: The most important emerging insect pest to soybean in brazil. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 1-12, 2019.

ZUCCOLO, A; SCOFIELD, D.G; DE PAOLI, E; MORGANTE, M. A família de retroelementos Ty1-copia LTR PARTC é altamente conservada em coníferas com mais de 200 MY de evolução. **Gene**, v. 568(1), 89-99, 2015.

## VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos expressivos resultados de diversos estudos já realizados para o conhecimento das características morfológicas, anatômicas e aspectos da composição química dos óleos essenciais com a observação de diferentes perfis químicos para as diversas populações de *L. pinaster* no estado de Minas Gerais, sendo esta uma espécie de uso medicinal popular tradicional, sugere-se assim, maiores esforços no emprego de pesquisas que visem avaliar as atividades terapêuticas dos diferentes perfis químicos de óleos essenciais presentes nas mais diversas populações desta espécie de arnica brasileira.

Os aspectos genéticos investigados, apontam para um processo de especiação. Isso reflete principalmente o *status* e situação na qual se encontram as populações de *L. pinaster* no estado de Minas Gerais, estando estas, expostas à antropização do seu habitat, fragmentação da vegetação ou progressiva ocupação das áreas onde ocorrem ou podem ocorrer populações desta espécie.

As análises referentes a características do genoma da espécie podem abrir novas perspectivas de investigações quanto a sua diversidade, para aspectos ecológicos a nível populacional para todas as regiões, além de sugerir futuras abordagens quanto as relações genéticas relacionadas a aspectos da composição química dos óleos essenciais de *L. pinaster*, surgindo assim, margens para o desenvolvimento futuro de novas pesquisas.

Assim, é recomendado a criação de um programa ou política de conservação para a espécie ou áreas de ocorrência da mesma, bem como a criação de um banco de dados com base em estudos que evidenciaram déficit de heterozigotos, endogamia, distância genética e grande diversidade química entre as diferentes populações distribuídas pelas quatro regiões do estado de Minas Gerais.