

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/02/2023

At the author's request, the full text of this thesis / dissertation will not be available online until February 02, 2023

“UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**DIVERSIDADE GENÉTICA E CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE POPULAÇÕES DE *Lychnophora ericoides* Mart.
E *Lychnophora pinaster* Mart.**

MARIA APARECIDA RIBEIRO VIEIRA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Horticultura)

BOTUCATU - SP

Outubro - 2012

“UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**DIVERSIDADE GENÉTICA E CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE POPULAÇÕES DE *Lychnophora ericoides* Mart.
E *Lychnophora pinaster* Mart.**

Maria Aparecida Ribeiro Vieira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Ortiz Mayo Marques

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Imaculada Zucchi

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP - Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor em
Agronomia (Horticultura)

BOTUCATU – SP

Outubro - 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO- BOTUCATU (SP)

V657d Vieira, Maria Aparecida Ribeiro, 1978-
Diversidade genética e constituição química dos óleos
essenciais de populações de *Lychnophora ericoides* Mart. e
Lychnophora de populações de *Lychnophora ericoides* Mart.
e *Lychnophora pinaster* Mart / Maria Aparecida Ribeiro
Vieira. - Botucatu : [s.n.], 2012
x, 118 f. : ils. color. , grafs., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Fa-
culdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2012
Orientador: Marcia Ortiz Mayo Marques
Co-orientador: Maria Imaculada Zucchi
Inclui bibliografia

1. Arnica. 2. Diversidade genética. 3. Plantas medici-
nais. 4. Genética de populações. 5. Essenciais e óleos
essenciais. I. Marques, Marcia Ortiz Mayo. II. Zucchi,
Maria Imaculada. III. Universidade Estadual Paulista "Jú-
lio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de
Ciências Agronômicas de Botucatu. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

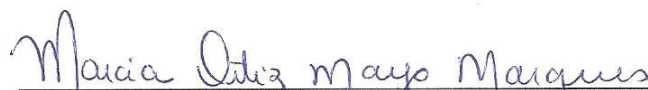
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: DIVERSIDADE GENÉTICA E CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS DE POPULAÇÕES DE *Lychnophora ericoides* Mart. E
Lychnophora pinaster Mart.

ALUNA: MARIA APARECIDA RIBEIRO VIEIRA

ORIENTADORA: PROF^a DR^a MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES
CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a MARIA IMACULADA ZUCCHI

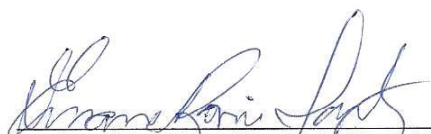
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF^a DR^a MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES



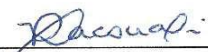
PROF^a DR^a MARIA DA PAZ LIMA



PROF. DR. ERNANE RONIE MARTINS



PROF^a DR^a CARMEN SILVIA FERNANDES BOARO



PROF^a DR^a ROSELAINE FACANALI

Data da Realização: 05 de outubro de 2012

DEDICO E OFEREÇO

A toda a minha família, em especial aos meus pais Joaquim e Maria, minha avó Benedita, meu irmão Luiz e a minha irmã Marinês, pelo apoio, incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

- À Deus, por me dar força para superar os momentos difíceis e por sempre iluminar meu caminho.
- À Prof^a Dr^a. Marcia Ortiz Mayo Marques pelos ensinamentos, motivação e amizade.
- À Prof^a. Dr^a. Maria Imaculada Zucchi pela orientação, confiança e incentivo.
- Ao Prof. Dr. José Baldin Pinheiro e a Prof^a Dr^a. Anete Pereira de Souza, pela orientação e oportunidade de desenvolver as atividades moleculares nos seus laboratórios.
- Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais do Centro P&D de Recursos Genéticos Vegetais: Roselaine, Lenita, Beatriz, Talita, Daniela, Régia, Cássia, Rose, Feijão, pelo carinho, amizade e pelas valiosas dicas e colaboração.
- Ao Professor João Semir e Marcelo Monge pela identificação e auxílio no depósito das exsiccatas no herbário da UNICAMP.
- Aos amigos Bianca, Miklos, Marisa, Vitor, Camila, Regina, pelos valiosos auxílio na construção do banco de microsatélites, nos desenhos dos *primers*, padronização das PCR e tantas outras coisas.
- Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal-Horticultura da FCA e da Pós-Graduação, pela colaboração e atenção.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.
- À minha querida família, meu eterno agradecimento.
- À todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
1. RESUMO.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUÇÃO.....	5
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
4.1. Óleos essenciais.....	8
4.2. O gênero <i>Lychnophora</i>.....	13
4.3. Estudos fitoquímicos e biológicos de espécies do gênero <i>Lychnophora</i>.....	18
4.4. Marcadores moleculares.....	21
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1. Coleta do Material Vegetal.....	24
5.2. Extração e análise da composição química dos óleos essenciais.....	26
5.2.1. Análise estatística dos dados.....	28
5.3. Caracterização molecular via marcador microssatélite (SSR).....	28
5.3.1. Extração e quantificação do DNA.....	28
5.3.2. Desenvolvimento e Caracterização de Marcadores Microssatélites.....	29
5.3.2.1. Digestão do DNA.....	29
5.3.2.2. Ligação dos adaptadores.....	29
5.3.2.3. Pré-amplificação via PCR e purificação.....	29
5.3.2.4. Seleção dos fragmentos contendo microssatélites.....	29
5.3.2.5. Amplificação dos fragmentos selecionados via PCR.....	30
5.3.2.6. Clonagem em vetor <i>pGEM-T</i> e transformação em células supercompetentes.....	30
5.3.2.7. Manutenção dos clones.....	30

5.3.2.8. Seleção e sequenciamento dos clones positivos.....	31
5.3.2.8.1. Amplificação dos insertos clonados.....	31
5.3.2.8.2. Inoculação e extração plasmidial.....	31
5.3.2.8.3. Sequenciamento.....	32
5.3.2.9. Identificação e desenho dos motivos microssatélites.....	33
5.3.2.10. Caracterização e genotipagem dos microssatélites.....	34
5.4. Metodologia de análise estatística dos dados.....	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
6.1. Rendimento dos óleos essenciais de <i>Lychnophora ericoides</i> e <i>Lychnophora pinaster</i>	36
6.2. Caracterização da composição química dos óleos essenciais das populações de <i>L. ericoides</i> e <i>L. pinaster</i>	40
6.3. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA.....	58
6.3.1. Construções da biblioteca enriquecida e desenho dos <i>primers</i>	58
6.3.2. Variação Genética.....	60
6.3.3. Estrutura Genética.....	66
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
8. CONCLUSÃO.....	74
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
APÊNDICE 1.....	86
APÊNDICE 2.....	89
APÊNDICE 3.....	109
APÊNDICE 4.....	115

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Número de indivíduos coletados de <i>Lychnophora ericoides</i> e <i>Lychnophora pinaster</i> no estado de Minas Gerais.....	26
Tabela 2. Programação da reação de PCR para a amplificação dos primers de <i>L. ericoides</i>	34
Tabela 3. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) do <i>orto</i> -acetoxi-bisabolol isolada de <i>Lychnophora ericoides</i> , comparados com dados descritos na literatura. Deslocamentos químicos em δ (ppm, δ_C e δ_H) e constantes de acoplamentos em Hz (entre parênteses).....	43
Tabela 4. Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) do ácido-14-oico- α -humuleno isolado de <i>Lychnophora pinaster</i> , comparados com os dados descritos na literatura. Deslocamentos químicos em δ (ppm, δ_C e δ_H) e constantes de acoplamentos em Hz (entre parênteses).....	46
Tabela 5. Composição química média (% relativa) dos óleos essenciais de <i>L. ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas, P2 e P3 - Capitólio) e <i>L. pinaster</i> (P4 - Olhos D' Água e P5 - Estrada de Diamantina).....	47
Tabela 6. Sequências dos pares de <i>primers</i> sintetizados para <i>Lychnophora ericoides</i> ...	58
Tabela 7. Sequências dos pares de <i>primers</i> que amplificaram locos microssatélites em <i>Lychnophora ericoides</i> e <i>Lychnophora pinaster</i>	60
Tabela 8. Frequências em porcentagem dos alelos nos oitos locos SSR nas populações de <i>Lychnophora ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas, P2 e P3 - Capitólio) e <i>Lychnophora pinaster</i> (P4 - Olhos D' Água e P5 - Estrada de Diamantina) do estado de Minas Gerais.....	61
Tabela 9. Heterozigosidade observada e esperada por loco para as populações <i>Lychnophora ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas, P2 e P3 - Capitólio)....	64
Tabela 10. Heterozigosidade observada e esperada por loco para as populações de <i>Lychnophora pinaster</i> (P4 -Olhos D' Água e P5 -Estrada de Diamantina)....	64
Tabela 11. Probabilidades exatas (Teste Exato de Fisher) dos desvios das proporções de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg em locos SSR nas populações <i>Lychnophora ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas, P2 e P3 - Capitólio) e <i>Lychnophora pinaster</i> (P4 - Olhos D' Água e P5 - Estrada de Diamantina).....	65
Tabela 12. Frequências de alelos privados nos locos microssatélite de alelos privados para as populações <i>Lychnophora ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas, P2 e P3 -Capitólio) e <i>Lychnophora pinaster</i> (P4 - Olhos D' Água e P5 - Estrada de Diamantina).....	66

Tabela 13. Estimativa dos parâmetros indicadores do grau de estruturação genética (estatística F) de 8 locos SSR em três populações naturais de <i>Lychnophora ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas, P2 e P3 -Capitório).....	67
Tabela 14. Estimativa dos parâmetros indicadores do grau de estruturação genética (estatística F) de 8 locos SSR em 2 populações naturais de <i>Lychnophora pinaster</i> (P4 - Olhos D' Água e P5 - Estrada de Diamantina).....	68
Tabela 15. Resultados da AMOVA para <i>Lychnophora ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas, P2 e P3 -Capitório) - MG.....	68
Tabela 16. Resultados da AMOVA para <i>Lychnophora pinaster</i> (P4 - Olhos D' Água e P5 - Estrada de Diamantina) - MG.....	69
Tabela 17. Resultados da AMOVA para <i>Lychnophora ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas, P2 e P3 -Capitório) e <i>Lychnophora pinaster</i> (P4 - Olhos D' Água e P5 - Estrada de Diamantina)- MG.....	69
Tabela 18. Distâncias genéticas de NEI (1978), calculadas entre as populações de <i>Lychnophora ericoides</i> e <i>Lychnophora pinaster</i> - MG.....	70

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1. Esquema da via metabólica de síntese dos monoterpenos e sesquiterpenos (adaptado de DEWICK, 2009 por MARQUES et al., 2012).....	9
Figura 2. <i>Lychnophora ericoides</i> (A e B – São Roque de Minas - C e D Capitólio - MG).....	16
Figura 3. <i>Lychnophora pinaster</i> (A e B - Olhos D' Água – C e D - Estrada de Diamantina - MG).....	17
Figura 4. Localização das áreas das coletas das populações de <i>Lychnophora ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas e P2 e P3 - Capitólio) e <i>Lychnophora pinaster</i> (P4 - Olhos D' Água - P5 - Estrada de Diamantina), no estado de Minas Gerais.....	25
Figura 5. Esquema representativo das etapas da construção da biblioteca enriquecida com microssatélites (NUCCI, 2007).....	33
Figura 6. Rendimento (%) do óleo essencial dos indivíduos de <i>Lychnophora ericoides</i> - P1 (São Roque de Minas - MG).....	36
Figura 7. Rendimento (%) do óleo essencial dos indivíduos de <i>Lychnophora ericoides</i> - P2 (Capitólio - MG).....	37
Figura 8. Rendimento (%) do óleo essencial dos indivíduos de <i>Lychnophora ericoides</i> - P3 (Capitólio - MG).....	37
Figura 9. Rendimento (%) do óleo essencial dos indivíduos de <i>Lychnophora pinaster</i> P4 (Olhos D' Água - MG).....	38
Figura 10. Rendimento (%) do óleo essencial dos indivíduos de <i>Lychnophora pinaster</i> - P5 (Estrada de Diamantina - MG).....	38
Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C da substância da substância com índice de retenção de 1901, isolada do óleo essencial da folha de <i>Lychnophora ericoides</i>	41
Figura 12. Espectro de RMN de ^1H da substância da substância com índice de retenção de 1901, isolada do óleo essencial da folha de <i>Lychnophora ericoides</i>	41
Figura 13. Espectro de massas da substância da substância com índice de retenção de 1901, isolada do óleo essencial da folha de <i>Lychnophora ericoides</i>	42
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H da substância com índice de retenção de 1823, isolada do óleo essencial da folha de <i>Lychnophora pinaster</i>	44
Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C da substância com índice de retenção de 1823, isolada do óleo essencial da folha de <i>Lychnophora pinaster</i>	45
Figura 16. Espectro de massa da substância com índice de retenção de 1823, isolada do óleo essencial da folha de <i>Lychnophora pinaster</i>	45

Figura 17. Estrutura química das principais substâncias identificadas nos óleos essenciais das populações de <i>Lychnophora ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas, P2 e P3 - Capitólio) e <i>Lychnophora pinaster</i> (P4 - Olhos D' Água e P5 - Estrada de Diamantina) - Minas Gerais.....	50
Figura 18. Dendrograma das populações de <i>Lychnophora ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas, P2 e P3 - Capitólio) e <i>Lychnophora pinaster</i> (P4 - Olhos D' Água e P5 - Estrada de Diamantina), em relação à composição química, definido pelo agrupamento UPGMA, a partir da matriz de proximidade (Coeficiente de correlação de Pearson).....	51
Figura 19. Composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de <i>Lychnophora ericoides</i> - P1 (São Roque de Minas - MG).....	53
Figura 20. Composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de <i>Lychnophora ericoides</i> - P2 (Capitólio - MG).....	54
Figura 21. Composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de <i>Lychnophora ericoides</i> - P3 (Capitólio - MG).....	54
Figura 22. Composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de <i>Lychnophora pinaster</i> - P4 (Olhos D' Água- MG).....	55
Figura 23. Composição química dos óleos essenciais dos indivíduos de <i>Lychnophora pinaster</i> - P5 (Estrada de Diamantina - MG).....	56
Figura 24. Gráficos das frequências alélicas das populações de <i>Lychnophora ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas, P2 e P3 - Capitólio) e <i>Lychnophora pinaster</i> (P4 - Olhos D' Água e P5 - Estrada de Diamantina) do estado de Minas Gerais.....	62
Figura 25. Padrão de divergência genética entre as cinco populações de <i>Lychnophora ericoides</i> (P1 - São Roque de Minas, P2 e P3 -Capitólio) e <i>Lychnophora pinaster</i> (P4 - Olhos D' Água e P5 - Estrada de Diamantina) – MG, definido pelo agrupamento UPGMA, a partir das distâncias genéticas de Nei (1978).....	71
Figura 26. Gráfico com o valor de ΔK calculado para a estruturação genética de <i>L. ericoides</i> pelo programa STRUCTURE, de acordo com o proposto por Evanno <i>et al.</i> (2005).....	72
Figura 27. Análise de cluster (K=2)utilizando os indivíduos de populações naturais das populações de <i>Lychnophora ericoides</i> (1 = P1 - São Roque de Minas, 2 = P2 , 3 = P3 - Capitólio – MG) e <i>Lychnophora pinaster</i> (4 = P4 - Olhos D'Água e 5 = P5 - Estrada de Diamantina - MG). Indivíduos representados pela mesma cor indicam que eles pertencem ao mesmo grupo. Cores diferentes no mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma compartilhado com cada grupo.....	72

1. RESUMO

Lychnophora ericoides e *Lychnophora pinaster* são espécies medicinais, endêmicas do Brasil utilizadas na medicina popular, como analgésico, anti-inflamatório, no tratamento de contusões e reumatismo. O presente estudo tratou da caracterização genética e da composição química dos óleos essenciais de três populações de *L. ericoides* (P1 - São Roque de Minas e P2 e P3 - Capitólio), e duas populações de *L. pinaster* (P4 - Olhos D'Água e P5 - Estrada de Diamantina), coletadas no estado de Minas Gerais. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação e a caracterização da composição química realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas. A caracterização da diversidade genética foi realizada utilizando marcador molecular microssatélite. As substâncias majoritárias dos óleos essenciais de *L. ericoides* da população P1 foram γ -eudesmol, α -muurolol e α -eudesmol e das populações P2 e P3 foram terpin-4-ol, β -atlantol e *orto*-acetoxi-bisabolol. As principais substâncias da espécie *L. pinaster* para a população P4 foram o 14-hidroxi-Z-cariofileno e um sesquiterpeno oxigenado e para a população P5 o 14-hidroxi- α -humuleno e ácido-14-oico- α -humuleno. O valor médio da heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) foi de 0,297 e 0,406 para *L. ericoides* e de 0,222 e 0,307 para *L. pinaster*, respectivamente. A variabilidade genética foi maior dentro das populações para ambas as espécies, entretanto as populações de *L. ericoides* também apresentaram alta diversidade entre as populações ($F_{ST} = 0,370$), enquanto que as populações de *L. pinaster*

possui baixa variabilidade entre as populações ($F_{ST} = 0,014$). A análise da AMOVA entre grupo de populações separadas por espécie foi de 9%, sugerindo cruzamento entre as espécies. A análise de agrupamento evidenciou a formação de dois grupos, grupo 1 constituído pela população P2 (Capitólio), *L. ericoides* e grupo 2 constituído pelas populações P1 (São Roque de Minas) e P3 (Capitólio) de *L. ericoides* e P4 (Olhos D'Água) e P5 (Estrada de Diamantina) de *L. pinaster*.

Palavras-chave: arnica, Asteraceae, microsatélite, planta medicinal, estrutura genética de populações.

GENETIC DIVERSITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS OF POPULATIONS OF *Lychnophora ericoides* Mart. AND *Lychnophora pinaster* Mart. Botucatu, 2012. 118 f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MARIA APARECIDA RIBEIRO VIEIRA

Advisor: MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Co-adviser: MARIA IMACULADA ZUCCHI

2. SUMMARY

Lychnophora ericoides and *Lychnophora pinaster* are endemic Brazilian medicinal species used in popular medicine as an analgesic and anti-inflammatory for treating bruises and rheumatism. This study considered the genetic characterization and chemical composition of the essential oils of three populations of *L. ericoides* (P1 - São Roque de Minas and P2 and P3 – Capitólio), and two populations of *L. pinaster* (P4 - Olhos D'Água and P5 – Estrada de Diamantina), collected in the State of Minas Gerais. The essential oils were extracted by hydro-distillation and the characterization of the chemical composition was performed by gas chromatography-mass spectrometry. The characterization of the genetic diversity was made using molecular microsatellite marker. The major substances of the essential oils from *L. ericoides* of P1-population were γ -eudesmol, α -muurolol and α -eudesmol and P2- and P3-population were terpinen-4-ol, β -atlantol and *orto*-acetoxy-bisabolol. The main substances of the species *L. pinaster* of P4-population were 14-hydroxy-Z-caryophyllene and an oxygenated sesquiterpene and of P5-population were 14-hydroxy- α -humulene and α -humulene-14-oic acid. The average value of the heterozygosity observed (H_O) and expected (H_E) were 0.297 and 0.406 for *L. ericoides*, and 0.222 and 0.307 for *L. pinaster*, respectively. The genetic variability was higher within populations for both species, however populations of *L. ericoides* also presented high diversity among the populations ($F_{ST} = 0.370$), while populations of *L. pinaster* presented low variability among populations ($F_{ST} = 0.014$). The AMOVA analysis between groups of populations separated by species was 9%, suggesting crossing between the species. The cluster analysis highlighted the formation of two groups:

group 1, consisting of P2-population (Capitólio), *L. ericoides*; and group 2, comprising P1- (São Roque de Minas) and P3-population (Capitólio) of *L. ericoides* and P4- (Olhos D'Água) and P5-population (Estrada de Diamantina) of *L. pinaster*.

Key words: arnica, Asteraceae, microsatellite, medicinal plant, genetic structure of populations.

3. INTRODUÇÃO

A diversidade genética vegetal de uma população contribui com a adaptação da sua estrutura genética a possíveis mudanças, convergindo para a variação entre populações (GRIBEL, 2001; YEEH et al., 1996). Quanto maior a variabilidade genética existente na população, maiores suas chances de perpetuação, desta maneira para o estabelecimento de práticas conservacionistas e manejo sustentável de uma população é importante o conhecimento da sua diversidade genética. Dentre as características mais importantes para a conservação, destacam-se o conhecimento do fluxo gênico, do sistema reprodutivo e da diversidade entre populações. A estrutura genética refere-se à distribuição da diversidade entre e dentro de populações; sua formação resulta de vários fatores, como o sistema de acasalamento, níveis de endogamia, fluxo gênico, bem como a deriva genética entre e dentro das populações, cujo conhecimento é importante para orientar na conservação das espécies (ZUCCHI et al., 2004).

Neste sentido a utilização racional e o manejo sustentável de espécies aromáticas e medicinais, é importante o conhecimento da divergência genética (LANGEREIN, 1994).

Apesar do genótipo, ser o principal determinante das respostas adaptativas das plantas, possibilitando diferenças na síntese dos metabólitos secundários, a quantidade e concentração, podem sofrer variações significativas, influenciadas por fatores ambientais, como a luminosidade (irradiação, qualidade luminosa e fotoperíodo), a latitude, as condições e o tipo de solo, os ventos, a temperatura e a disponibilidade de água, ou mesmo todos os fatores em conjunto, como é o caso da sazonalidade (CASTRO et al., 2004; MACIEL et al., 2002; LANGEREIN, 1994).

Os óleos essenciais são resultantes do metabolismo secundário das plantas e obtidos de raiz, caule, folhas, frutos, flores e sementes (MARQUES et al., 2012). Desempenham funções importantes na adaptação das plantas ao meio ambiente (ALVAREZ-CASTELLANOS et al., 2001; ARIMURA et al., 2009) e também podem ser usados como marcadores taxonômicos contribuindo com a investigação de aspectos taxonômicos e evolutivos intraespecíficos (ADAMS et al., 1993; GRAYER et al., 1999; TRIGO et al., 2003).

O gênero *Lychnophora*, família Asteraceae, apresenta diversos problemas taxonômicos decorrentes, principalmente, da grande semelhança morfológica provavelmente devido ao polimorfismo e sobreposição de caracteres, também existe a suposição de ocorrência de possíveis híbridos naturais entre suas espécies (MANSANARES, 2004). As espécies *L. ericoides* e *L. pinaster* são muito próximas, sendo a separação entre elas complicada (SEMIR, 1991). Marcadores moleculares têm sido utilizados para solucionar problemas taxonômicos clássicos e evolutivos para separar botanicamente diferentes espécies (NORRIS, 2002; KRZYWINSKI e BESANSKY, 2003; LEHR et al., 2005).

Dentro do gênero *Lychnophora*, estão as espécies *L. ericoides* e *L. pinaster*, produtoras de óleos essenciais. A espécie *L. ericoides* (Mart.), é uma espécie arbustiva, típica do bioma Cerrado, popularmente conhecida como arnica e falsa-arnica. Ocorre em Minas Gerais e Goiás; cresce em depósitos de minérios de ferro e manganês, afloramentos rochosos, altos platôs de campos rupestres e em pastagens de campo e de cerrado (AVELINO, 2005). Popularmente é utilizada como analgésico e anti-inflamatório (BERTONI et al., 2000). As principais substâncias encontradas nos óleos essenciais das folhas de *L. ericoides* coletadas em Vianópolis-GO (denominadas pelos autores como amostras com perfume) foram o α -bisabolol (76,4%) e o α -cadinol (23,5%), e para as populações coletadas em Cristalina-GO (denominadas pelos autores como amostras sem perfume) foram o (*E*)-nerolidol (47,1%) e *ar*-dihidro-turmerona (15,4%) (CURADO et al., 2006).

A espécie *L. pinaster* (Mart.), popularmente é conhecida como arnica mineira e arnica-da-serra (SEMIR, 1991). Suas folhas e flores aromáticas são utilizadas na medicina popular sob a forma de extrato alcoólico, como anti-inflamatório, anestésico e cicatrizante em ferimentos (PINHEIRO, 2002; SOUZA, 2003). A substância majoritária dos óleos essenciais das folhas de *L. pinaster*, relatados na literatura, pertence à classe dos fenilpropanóides, o *trans*-cinamato de metila (HABER, 2008; REIS et al., 2010).

Deste modo, torna importante a compreensão da diversidade genética e a caracterização da composição química dos óleos essenciais, de populações de *L. ericoides* e *L. pinaster*, visando fornecer informações para estudos de conservação das espécies, programas futuros de melhoramento genético e também para a sua identificação e diferenciação taxonômica.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar populações de *Lychnophora ericoides* e *Lychnophora pinaster* Mart., coletadas no estado de Minas Gerais, sob o ponto de vista da composição química dos óleos essenciais e da diversidade genética, via marcador molecular microssatélite, com desenho de *primers* específicos para *L. ericoides* e transferência dos *primers* obtido para *L. pinaster*, visando fornecer subsídio para a conservação, taxonomia e uso sustentável dessas espécies.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diversidade genética foi maior dentro das populações, tanto de *L. ericoides*, quanto para a *L. pinaster*, fato comum em espécies tropicais. No entanto, a diversidade genética entre as populações de *L. ericoides* foi elevada, sendo necessário além de amostrar um número maior de indivíduos em cada população coletar várias populações para assegurar a manutenção e conservação da espécie.

As substâncias majoritárias dos óleos essenciais das populações de *L. pinaster* não pertencem à classe dos fenilpropanóides, como relatado na literatura para a maior parte dos estudos realizados com a espécie, que é relatada na literatura como a substância majoritária de *L. pinaster*. Sugere-se uma maior investigação química de um maior número de populações e genômica visando a compreensão da biossíntese das substâncias voláteis.

8. CONCLUSÃO

Os *primers* desenvolvidos para *L. ericoides*, apresentaram transferibilidade para as populações de *L. pinaster*, sendo eficientes para a avaliação da variabilidade genética das populações de *L. ericoides* e *L. pinaster*.

As populações de *L. ericoides* e *L. pinaster* apresentam maior diversidade genética dentro das populações. As populações de *L. ericoides* apresentaram maior estruturação genética que as populações de *L. pinaster*, sugerindo haver maior fluxo gênico para a última espécie.

A baixa variabilidade entre os grupos de populações sugerem haver cruzamento entre as espécies, entretanto é necessário maior investigação.

A composição química dos óleos essenciais das populações *L. ericoides* e *L. pinaster* foi divergente.

As populações P2 e P3 de *L. ericoides*, coletadas em Capitólio, apresentaram perfil químico semelhante, sendo divergente da população P1, coletada em São Roque de Minas.

Observou-se diferentes substâncias entre as populações P4 e P5 de *L. pinaster*, sendo as substâncias majoritárias divergente, apesar das regiões onde foram coletadas apresentarem características semelhantes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, V.G.C.; TAKAHASHI, J. A.; DUARTE, L. P.; PILÓ-VELOSO, D.; JUNIOR, P.A. S., ALVES, R.O., ALVARO, R. 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 Farmagnosia**. Porto Alegre. v.21, n. 4, p. 615-621, 2011.
- ADAMS, R. P. T.; DEMEKE, T.; ABULFATIH, H. A. RAPD DNA fingerprints and terpenoids: clues to past migrations of *Juniperus* in Arabia and east Africa. **Theoretical and Applied Genetics**, New York. v. 87, p. 22-26, 1993.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007. p. 804.
- AIZEN, M.A., FEINSINGER, P. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a chaco dry Forest, Argentina. **Ecology**, Washington. v. 75, p. 330-351, 1994.
- 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**, Araraquara, v. 30, n. 3, p. 37-45, 2005.
- ALVARES-CASTELLANOS, P. P.; BISHOP, D.C.; PASCUAL-VILLALOBOS, J. M. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysethemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochemistry**, New York. v.57, p. 99-102, 2001.
- ARIMURA, G; MATSUI, K; TAKABAYASHI, J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant Cell Physiology**, Oxford. v. 50, p. 911-923, 2009.
- AVELINO, A. S. **Biologia reprodutiva de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae: Vernoniaceae)**. 2005. 65 p. Dissertação (Mestre em Ecologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2005.
- AYANOGLU, F.; ARSLAN, M.; HATAY, A. Effects of harvesting stages, harvesting hours and drying methods on essential oil content of lemon balm grown in eastern mediterranean. **International Journal of Botany**, New York. v. 1, n. 2, p. 138-142, 2005
- AZEVEDO, M. T. A. **Padrões evolutivos em um complexo de espécies de *Lychnophora* Mart. (Asteraceae) endêmico dos campos rupestres**. 2004. 111 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- BALDIN, E.L.L.; DAL POGETTO, M.H.F.A; PAVARINI, D.P.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Composição química e atividade acaricida do óleo essencial de *Lychnophora ericoides* Mart. sobre *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas**. v. 36, p. 125-132, 2010.

BARBOSA, J. S.; SOUSA, H. C.; RIBEIRO, S. P. Estudo morfológico, anatômico e fenológico de três populações de *Lychnophora ericoides* (asteraceae) em áreas de campo rupestre: respostas locais e diferenciação na produção de compostos bioativos. *In: VIII CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL*, 2007, Caxambu - MG.

BERTONI B.W., PEREIRA A.M.S., AMARANTE M.F.C., LOPES, N.P., SANTOS, P.A., FRANÇA, S.C. Micropropagação de *Lychnophora ericoides*: Uma planta medicinal com atividade analgésica e tripanocida. *In: XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, 2000, Recife - PE.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, C. Microsatellites enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, Les Ulis, v. 54, p. 277-288, 1999.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, London, v. 447, n. 7143, p. 396-398, 2007.

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

BORBA, V. S. **Marcadores moleculares: classificação e aplicações**. Disponível em: <<http://www.ckagricola.com/ckagricola/arquivos/MARCADORES%20MOLECULARES.doc>>. Acesso em: 04 out. 2007.

BORSATO, M. L. C.; GRAEL, C. F. F.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, New York. v. 55, n. 7, p. 809-813, 2000.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, Bethesda. v. 32, p. 314-331, 1980.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. New York: Intercept Ltd, 1995. 499 p.

CANALLE, R.; BURIM R. V.; LOPES, J. L. C.; TAKAHASHI, C. S. Assessment of the cytotoxic and clastogenic activities of the sesquiterpene lactone lychnopholide in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Detection & Prevention**, Amsterdam. v. 25, p. 93-101, 2001.

CARVALHO, C. E. V.; TORRES, J. P. M.. **The ecohydrology of the Paraíba do Sul river, Southeast Brazil**. *In: McClain, M. E., The Ecohydrology of South American Rivers and Wetlands. The IAHS Series of Special Publications, Venice.* p. 179-191, 2002.

CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. **Química Nova**, São Paulo. v. 27, n. 1, p. 55-57, 2004.

CERVERA, M. T.; RUIZ-GARCIA, L.; MARTINEZ-ZAPATER, J. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. **Molecular Genetics Genomics**, Heidelberg. v. 268, n. 4, p. 543-552, 2002.

- CHAGAS, A. C. S.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T., LEITE, R. C.; FURLONG, J.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo. v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.
- CHANG, X.; ALDERSON, P.G.; WRIGHT, C.J. Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam. v. 63, n. 2, p. 216-23, 2008.
- CHICARO, P.; PINTO, P.; COLEPICOLO, P.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Flavonoids from *Lychnophora passerina* (Asteraceae): potential antioxidants and UV protectants. **Biochemical Systematics and Ecology**, Amsterdam. v. 32, p. 239-243, 2004.
- COILE, N.C; JONES JR., S.B. *Lychnophora* (Compositae: Vernonieae), a genus endemic to the Brazilian planalto. **Brittonia**, New York. v. 33, n. 4, p. 528-542, 1981.
- COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. **Heredity**, Canadá. v. 83, n. 6, p. 748-756, 1999.
- CONTE, R. et al. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. **Heredity**, Canadá. v. 91, p. 401-406, 2003.
- COSTA, M. A. C. da; JESUS, J. G. de; FARIAS, J. G.; NOGUEIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, A. L. R. de. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnofora ericoides* Mart.). **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v. 5, n. 1, p. 53-65, 2008.
- COSTA, D.P; SANTOS, S.C.; SERAPHIN, J.C.; FERRI, P.H. Seasonal variability of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves, **Journal of Brazilian Chemical Society**, Campinas. v. 20, n. 7, p. 1287-1293, 2009.
- COSTA-FILHO, L.O.; ENCARNAÇÃO, C.R.F.; OLIVEIRA, A.F.M. Influência hídrica e térmica no crescimento e desenvolvimento de *Ocimum gratissimum* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu**, v.8, n.2, p.8-13, 2006.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, n. 19, p. 229-306, 2001.
- CROW, J. F.; KIMURA, M.A. **An introduction to population genetics theory**. New York: Harper and Row, 1970. 591 p.
- CURADO, M. A.; OLIVEIRA, C. B. A.; JESUS, J. B.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, New York. v. 67, p. 2363-2369, 2006.
- DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3ed. England: John Wiley&Sons, Nova Jersey, 2009, 546 p.

- DÍAZ-MAROTO, M.C.; et al. Changes produced in the aroma compounds and structural integrity of basil (*Ocimum basilicum* L) during drying. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London. v. 84, p. 2070-2076, 2004.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**. v. 12, p.13-15, 1990.
- DUARTE, A.R.; NAVES, R.R.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Seasonal influence on the essential oil variability of *Eugenia dysenterica*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo. v. 20, n. 5, p. 967-974, 2009.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Malden. v. 14, p. 2611-2620, 2005
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Malden. v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F. **Introduction to quantitative genetics**. London: Longman, 1996. 464 p.
- FERRAZ FILHA, Z.S.; VITOLO, L.F.; FIETTO, L.G.; LOMBARDI, J.A.; SAÚDEGUIMARÃES, D.A. Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil ("Arnica"). **Journal of Ethnopharmacology**, Thurmaston. v. 107, p. 79-82, 2006.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPLAGIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares na análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1996. 220p.
- GAIOTTO, F.A. **Inferências sobre herança quantitativa e estrutura genética em populações naturais de *Euterpes edulis* Mart. utilizando marcadores microssatélites**. 2001. 122 f. Tese (Doutorado)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2001.
- GEBUREK, T. Some results of inbreeding depression in serbian spruce (*Picea omorica* Panc. Purk.). **Silvae genetica**, Cambridge. v. 35, n. 4, p. 169-172, 1986
- GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M.D.; KANASHIRO, A., ALMEIDA, M.C.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; LOPES, J.L., SOUZA, G.E.; LOPES, N.P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucoflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Medica**, New York. v. 71, n. 1, p. 3-6, 2005.
- GOBBO-NETO, L.; GATES, P.J. LOPES, N. P. Negative ion 'chip-based' nanospray tandem mass spectrometry for the analysis of flavonoids in glandular trichomes of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Malden. v. 22, p. 3802-3808, 2008.
- GOTTLIEB, G. Development of species identification in ducklings: XI. Embryonic critical period for species-typical perception in the hatchling. **Animal Behaviour**, London. v. 33, p. 225-233, 1985.

GOUINGUENÉ S.P.; TURLINGS T.C.J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**, Waterbury. v. 129, p. 1296-1307, 2002.

GOULART, M. F.; RIBEIRO, S. P.; LOVATO, M. B. Genetic, morphological and spatial characterization of two populations of *Mabea fistulifera* Mart. (Euphorbiaceae), in different successional stages. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 2, p. 275-284, 2005.

GRAEL, C.F.F.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L.M.; JORDÃO, C.O.; TAKEARA, R.; GOBBO-NETO, L.; POLIZELLO, A.C.M., LUCISANO-VALIM, Y.M.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. In Vitro study of antioxidant and scavenger properties of phenolic compounds from *Lychnophora* species. **Química Nova**, São Paulo. v. 33, p. 867-870, 2010.

GRAYER, R. J., M. W. CHASE, M. S. J. SIMMONDS. A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families: an appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". **Biochemical Systematics and Ecology**, London. v. 27, p. 369-393, 1999.

GRIBEL, R. Biologia reprodutiva de plantas amazônicas: importância para o uso, manejo e conservação dos recursos naturais. **Humanidades**, Brasília, n. 48, p. 110-114, 2001.

GUZZO, L.S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A.; SILVA, A.C.; LOMBARDI, J.A.; GUIMARÃES, H.N.; GRABE-GUIMARÃES, A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. **Journal of Ethnopharmacology**, Thurmaston. v. 116, n. 1, p. 120-124, 2008.

HABER, L. L. **Caracterização da diversidade genética, via marcador microssatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.** 2008. 138 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

HALL, T.A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, n. 41, p. 95-98, 1999.

HAMRICK, J. L.; GODT, M. J. W. Allozyme diversity in plant species. In Brown, A. H. D.; Clegg, M. T.; Kahler, A. L.; Weir, B. S. **Plant population genetics, breeding and germplasm resources**. Massachusetts: Editora Sinauer, p. 43-63, 1989.

HAMRICK, J.L.; LOVELESS, M.D. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. **Biotropica**, New York. v. 18, p. 201-207, 1986.

HIND, D. J. N. A new species of *Lychnophora* (Compositae: Vernonieae: *Lychnophorinae*) from Bahia, Brazil. **Kew Bulletin**, New York. v. 55, p. 393-397, 2000.

ISOBE, M. T. **C.Anatomia foliar e influência da sazonalidade no óleo essencial de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.** 2012, 106 f. (Dissertação em Agronomia/Horticultura)-Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

JORDÃO, C.O.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G.E.P.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J.L. Trypanocidal activity of chemical constituents from *Lychnophora salicifolia* Mart. *Phytotherapy Research*, **Malden**. v. 18, p. 332-334, 2004.

KANASHIRO, A. et al. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. *Phytoterapy Research*, **Malden**.v. 18, n. 1, p. 61-65, 2004.

KEYTE, A.L.; PERCIFIELD, R.; LIU, B.; WENDEL, J.F. Intraspecific DNA methylation polymorphism in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal Heredity*, Oxford, v. 97, n. 5, p. 444-450, 2006.

KRZYWINSKI, J.; BESANSKY, N.J.. Molecular systematics of *Anopheles*: from subgenera to subpopulations. *Annual Review of Entomology*, Palo Alto. v. 48, p. 111-139, 2003.

LACERDA, D. R.; ACEDO, M. D. P.; LEMOS FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Genetic diversity and struture of natural populations of *Plathymentia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Molecular Ecology*, **Malden**. v. 10, n. 5, p. 1143-1152, 2001.

LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. *Science*, Washington. v. 242, n. 4876, p. 1455-1460, 1988.

LANGHEIM, J. H. Higher plants terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, Heidelberg.v. 20, p. 1223-1280, 1994.

LE QUESNE, P. W.; PASTORE, M. P.; RAFFAUF, R. F. Os flavonóides citotóxicos de *Lychnophora affinis*. *Lloydia*, Cambridge. v. 36, p. 391-394, 1976.

LEHR, M. A.; KILPATRICK, C. W.; WILKERSON, R. C.; CONN, J. E. Cryptic Species in the *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) *albitarsis* (Diptera: Culicidae) Complex: Incongruence Between Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction Identification and Analysis of Mitochondrial DNA *COI* Gene Sequences. *Annals of the Entomological Society of America*, Columbia. v. 98, p. 908-917, 2005.

LEWIS, P.; ZAYKIN, D. **Genetic data analisis: computer program for the analysis of allelic data**. 2000. Disponível em: <[http:// alleyn.eeb.uconn.edu/gda/](http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/)> Acesso em: 21 nov. 2006.

LOEUILLE, B. *Lychnophora* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB016171>>. Acesso em: 13 jan. 2013.

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

LYRA, C.C.G.V.; VIEIRA, A.R.F.; OLIVEIRA, B.C.B.A.; SANTOS, C.S.C.; SERAPHIND C.J.C.; FERRI, P.H. Intraspecific Variability in the Essential Oil Composition of *Lychnophora ericoides*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, São Paulo. v.19, n.5, p.842-848, 2008.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MANSANARES, M.E. **Estudo Citotaxonômico de Espécies do Gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernoniae: Lychnophorinae)** 2004. 148 p. (Tese em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

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

MARTINS, W.S.; LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F.S.; BERTIOLI, D.J., WebSat - A Web Software for MicroSatellite Marker Development. **Bioinformation**, v. 3, n. 6, p.282-283, 2009.

MELO, L. Q.; CIAMPI, A. Y.; VIEIRA, R. F., 2009. Análise da variabilidade genética de arnica (*Lychnophora ericoides* L. - Asteraceae) usando marcadores RAPDs. **Acta bot. bras.** v. 23, n.1, p. 259-266, 2009.

MIGUEL, O.G.; LIMA, E.O.; MORAIS, V.M.F.; GOMES, S.T.A.; MONACHE, F.D.; CRUZ, A.B.; CRUZ, R.C.B.; CECHINEL FILHO, V. Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, Malden. v. 10, n. 8, p. 694-696, 1996.

MILLER, M. **Tools For Populations Genetic Analyses (TFPGA) ver. 1.3**: A windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data. Arizona, 1997. 33 p.

MILLS, L. S.; ALLENDORF, F. W. The one-migrant-pergeneration rule in conservation and management. **Conservation Biology**, Essex, v. 10, n. 6, p. 1509-1518, 1996.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Pittsburgh. v. 89, p. 583-590, 1978.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: Simões et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFSC: Porto Alegre, 1999. p.11-24.

NORRIS, D.E. Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. **International Journal for Parasitology**, New York. v. 32, n. 13, p. 1607-1615, 2002.

NUCCI, S. M. **Desenvolvimento de bibliotecas enriquecidas com locos microsatélites e análise da estrutura genética populacional de macaúba (*Acrocomia aculeata*)**. 2007. 84 f. (Dissertação em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2007.

OLIVEIRA, A.L.S.; LUCHESE, A.M. Avaliação Sazonal da Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais de *Lippia thymoides*. In. Anais do Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, XIV, 2010, Feira de Santana. 2010, p 684-687.

PAVARINI, D.P.; CALLEJON, D.R.; TOMAZ, J.C.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Novo sesquiterpeno isolado do óleo essencial de *Lychnophora ericoides* (Mart.) e a avaliação *in vitro* de seu potencial antinociceptivo. In: 31ª REUNIÃO ANU AL DA SOCIEDADE 164. BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2008 , Águas de Lindóia, **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2008.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current Opinion in Plant Biology**, New York. v.5, n. 3, p. 237-243, 2002.

PINHEIRO, R.C. **Abordagem fitoquímica, rendimento do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. Utilizando dois métodos de secagem.** 2002. 41 f. (Dissertação em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

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**, Messina, v. 22, n. 2, p. 147-149, 2010.

RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba. v. 53, n. 2, p. 304-307, 2009.

RICHARDS, E. J. Inherited epigenetic variation-revisiting soft inheritance. **Nature Review Genetics**, London, v. 7, n. 5, p. 395-401, 2006.

ROA, A. C.; CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; DUQUE, M.C.; MAYA, M.M.; BONIERBALE, M.W.; IGLESIAS, C., TOHME, J. Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) mi crosatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. **American Journal of Botany**, Saint Louis. v.87, n.11, p.1647-1655, 2000.

ROBERTS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.

ROBINSON, H. Generic and subtribal classification of american Vernonieae. Washington: **Smithsonian Contributions to Botany**, 1999. v. 15, n.89, 116 p.

RODRIGUES, V. E. G. **Levantamento florístico e etnobotânico de plantas medicinais dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais.** 1988. 235 f. (Dissertação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1988.

ROHLF, F.J. **NTSYS-Pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system.** New York: Exeter Publisher, 210p, 1989..

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the for general users and for biologist programmers. In: MISENER, S.; KRAWETZ, S.A. **Bioinformatics: methods and protocols.** Totowa: Humana, p. 365-386, 1999.

SAKAMOTO, H.T. FLAUSINO, D.; CASTELLANO, E.E.; STARK, C.B.W.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. **Journal of Natural Products**, Columbus. v. 66, n. 3, p. 693-695, 2003.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST**: sistema de análise estatística para microcomputadores. Campinas: Instituto Agrônomo, SEI nº 066060, 1985.

SANTOS, M.D. *Lychnophora ericoides* Mart: **avaliação farmacológica e considerações sobre o metabolismo oxidativo das substâncias bioativas**, 2006, 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SARGENTI, S.R.; VICHNEWSKI, W. Sonication and liquid chromatography as a rapid technique for extraction and fractionation of plant material, **Phytochemical Analysis**, Weinheim. v.11, n. 2, p. 69-73, 2000.

SASAKI, D.; MELLO-SILVA, R. de. Levantamento florístico no cerrado de Pedregulho, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasileira**. v.22, n.1, p. 187-202, 2008.

SAÚDE, D. A.; RASLAN, D. S.; OLIVEIRA, A. B. Teste de atividade antitumoral e anti-HIV de lactonas sesquiterpênicas de *Lychnophora trichocarpa* Spreng. (Asteraceae). In: XIII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1994, Fortaleza. **Anais....** Fortaleza: p. 129, 1994.

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

SCHNEE, C.; KÖLLNER, T.G.; HELD, M.; TURLINGS, T.C.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, v. 103, n. 4, p. 1129-1134, 2006.

SEBBEN, A.M.; SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; VENCOSKY, R. Efeitos do manejo na estrutura genética de populações de caixeta (*Tabebuia cassinoides*). **Scientia forestalis**, Piracicaba. n. 58, p.127-143, 2000.

SEBBEN, A.M.; SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; LACERDA, M.C.B. Estrutura genética em populações de *Tabebuia cassinoides*: implicações para o manejo florestal e a conservação genética. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 99-113, 2001.

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

SEMIR, J., MONGE, M., REZENDE, A. R.; LOPES, N. P. **As Arnicas Endêmicas das Serras do Brasil** - Uma Visão Sobre a Biologia e Química das Espécies de *Lychnophora* (Asteraceae). 1 edição. UFOP, Ouro Preto, 2011, 212 p.

SHAFER, M. L. Minimum populations size for species conservation. **Bioscience**, New York. v. 31, n. 2, p. 131-134, 1981.

SILVEIRA, D; Wagner, H.; Chiari, E.; Lombardi, J.A.; Assunção, A.C.; Oliveira, A.B. de; Raslan, D.S. Biological activity of the aqueous extract of *Lychnophora pinaster* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 15, n. 4, p. 294-297, 2005.

SOUZA, A. N. **Propagação in vitro e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*)**. 2003. 127 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SOUZA, J. P. R., **Influencia da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fases gasosa e líquida**. 2007. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

STEINKELLNER, H., Lexer, C.; Turetschek, E.; Glössl, J.. Conservation of (GA)_n microsatellite loci between *Quercus* species, **Molecular Ecology**, Malden. v. 6, n. 12, p. 1189-1194, 1997.

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

TEUSCHER, E. Pharmazeutische Biologie. 4. ed. Braunschweig: VIEWEG, 1990. 664 p.

TORRES, T. T. Variabilidade genética e estrutura de populações de *Cochliomyia hominivorax* (Díptera: Calliphoridae): uma nova perspectiva através de marcadores microssatélites. 2006. 132 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade de Campinas - Campinas, 2006.

TRAPP, S.C.; CROTEAU, R.B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, Pittsburgh, v. 158, n. 2, p. 811-832, 2001

TRIGO, J.R.; LEAL, I.R.; MATZENBACHER, N.I.; LEWINSOHN, T.M. Chemotaxonomic value of pyrrolidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (Senecioneae: Asteraceae). **Biochemical Systematic Ecology**, Surrey. v. 31, n. 9, p. 1011-1022, 2003.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, D.J. A generalization of the relation index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, New york. v. 11, p. 463-467, 1963.

VAUGHN, M. W.; TANURDŽIĆ, M.; LIPPMAN, Z.; CARRASQUILLO, R.; RABINOWICZ, P.D.; DEDHIA, N.; MCCOMBIE, W.R.; AGIER, N.; BULSKI, A.; COLOT, V.; DOERGE, R.W.; ROBERT, A. et al. Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 5, n. 7, p. 1617-1629, 2007.

WANG, J. Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. **Conservation Biology**, Essex, v. 18, n. 2, p. 332-343, 2004.

WIECZOREK, A. M.; GEBER, M. A. Microsatellite loci for studies of population differentiation and range expansion in *Solidago sempervirens* L. (Asteraceae). **Molecular Ecology Resources**, Malden. v. 2, n. 4, p. 554-556, 2002.

WEIR, B.S. **Genetics data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 455 p.

WRIGHT, S. The genetical structure of population. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, n. 1, p. 395-420, 1951.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on allozyme studies. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Shanghai, v. 37, n. 1, p. 141- 146, 1996.

ZUCCHI, M.I., BRONDANI, R.P.V., PINHEIRO, J.B., BRONDANI, C. VENCOVSKY, R. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v.2, p.512-514, 2002.

ZUCCHI, M. I.; Pinheiro, J. B.; Aguiar, A. V., Chaves, L. J.; Coelho, A. S. G.; Vencovsky, R. Padrão espacial de divergência em populações de *Eugenia dysenterica* dc utilizando marcadores microssatélites. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n.1, p. 29-38, 2004.