



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA**

Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO

**FELIPE GÓRSKI**

**SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL  
DE *Baccharis crispa* SPRENG. (ASTERACEAE) DO SUL DO BRASIL**

**GUARAPUAVA**

**2015**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA**

**FELIPE GÓRSKI**

**SELEÇÃO DE PRIMERS ISSR E ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL  
DE *Baccharis crispa* SPRENG. (ASTERACEAE) DO SUL DO BRASIL**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva na Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

**ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO ROBERTO DA SILVA**

**GUARAPUAVA**

**2015**

A minha esposa, pais e irmão.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por me iluminar e orientar, colocando-me aos passos daqueles que me ajudariam neste trabalho.

Aos meus pais, Gildo e Silvana, por me darem o dom da vida e sempre me guiarem nos caminhos que me trouxeram até aqui.

Ao meu orientador, Professor Dr. Paulo Roberto da Silva, por acreditar em mim as duas vezes que fiquei “desorientado”, por proporcionar crescimento pessoal e científico, por realizar diversas tarefas que eram pertinentes ao seu aluno, aos ensinamentos transmitidos e me proporcionar olhar para o futuro.

Aos meus colegas de Laboratório, Bruna, que me incentivou para entrar no mestrado (talvez não estivesse escrevendo este agradecimento se não fosse isso), Juliana e Renata, Nayara e Antonielle, Daiane, Cláudia, Jhonnatan, Ricardo, Rafael, Letícia, Mariana, Daniele, Jesus, Rafaela, Gabriel e muitos outros. Muito obrigado pela amizade, risadas, bagunças, mudanças, companheirismo e ajudas sempre que necessário.

As amigas do laboratório Juliana e Renata, pelas contribuições no trabalho e valiosa ajuda na parte prática, pelo respeito e amizade que decorreram durante o mestrado.

A Antonielle e Nayara, por me ajudarem nas atividades práticas e me permitirem ajudá-las em seus trabalhos de conclusão de curso.

Aos professores do Departamento de Ciências Biológicas e do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva pelo incentivo, amizade e respeito.

Ao professor Dr. Marcos Ventura Faria, por me orientar em análises estatísticas e sempre se preocupar com o andamento do meu trabalho.

Ao Governo do Estado do Paraná, por me proporcionar afastamento para eu realizar o Mestrado.

E o agradecimento mais importante de todos, à minha esposa, Maria Flávia Klippe Górski, que escutou meus choros, solucionou meus problemas, ampliou meus horizontes... sempre com amor e carinho. Muito Obrigado!

A todos meus sinceros agradecimentos!

*“Não me sinto obrigado a acreditar que o mesmo Deus  
que nos dotou de sentidos, razão e intelecto,  
pretenda que não os utilizemos”*

*(Galileu Galilei)*

## RESUMO

### **Seleção de primers ISSR e estrutura genética populacional de *Baccharis crispa* Spreng. (Asteraceae) do sul do Brasil**

*Baccharis crispa* Spreng., popularmente conhecida como carqueja, é uma espécie herbácea pertencente a família Asteraceae. A espécie é amplamente utilizada na medicina popular e na indústria cervejeira como substituto do lúpulo. Também possui importância ecológica, pois é uma planta pioneira e atua na manutenção de polinizadores. Considerando estes aspectos, *B. crispa* foi selecionada como uma espécie prioritária para realização de estudos de conservação de recursos genéticos e manejo, no bioma Mata Atlântica pelo Ministério do Meio Ambiente. Apesar de tal importância, nada é conhecido da diversidade genética da espécie. Assim, este trabalho teve como objetivo a seleção de *primers* ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e análise da estrutura genética de populações da Carqueja oriundas do Sul do Brasil. Para a seleção de *primers* ISSR, foram avaliados 42 *primers* em uma população de 20 indivíduos. Para cada *primer* foi calculado os índices PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica), MI (Índice do Marcador) e RP (Poder de Resolução). Os valores de PIC variaram de 0,27 a 0,45, de MI de 4,87 a 12,37 e de RP de 2,2 e 11,57. Com estes dados foram selecionados os 15 *primers* com os maiores valores para os três índices. Estes *primers* foram aplicados em seis populações de *B. crispa* oriundas dos estados do PR, SC e RS para obtenção de dados genéticos-populacionais da espécie. A similaridade genética média dentro de cada população variou de 0,27 a 0,54 com média de 0,20 para todas as populações, evidenciando alta variabilidade. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior variação ocorre dentro das populações (0,56) do que entre as populações (0,43), o que é esperado em populações de plantas alógamas. O índice de diversidade de Shannon (0,26) e a diversidade genética de Nei (0,41) demonstram também alta variabilidade genética nas populações. O agrupamento dos indivíduos pelo coeficiente de Jaccard utilizando o método UPGMA formou seis grupos, ou seja, separando cada uma das populações. O teste de Mantel apresentou correlação positiva ( $r = 0,59$ ) entre a distância geográfica e a distância genética. O índice de fixação

(Fst) foi de 0,43. O dendrograma, a correlação e o Fst observado mostram que as populações estão estruturadas. O padrão da distribuição de locos mostrou que as populações do Paraná e Santa Catarina, apresentam maior variabilidade, corroborando com os índices de diversidade calculados. A análise conjunta dos resultados mostra que há alta variabilidade genética em *B. crista* e que as regiões do Centro-Sul do Paraná (Região de Guarapuava e General Carneiro) e Meio-Oeste de Santa Catarina (Região de Joaçaba e Campos Novos) são prováveis centros de diversidade da espécie. Os dados observados parecem ainda indicar que a transformação de floresta em pastagens favorece a espécie e quando a floresta é substituída por áreas agrícolas, desfavorece a espécie. Estes dados são inéditos para *B. crista* e contribuirão para a compreensão dos aspectos evolutivos da espécie e para o desenvolvimento de estratégias para o cultivo sustentável e conservação da mesma.

**Palavras-Chave:** Carqueja, Diversidade genética, Genética de Populações, Marcador Molecular, Mata Atlântica.

## **ABSTRACT**

### **ISSR primers screening and population genetic structure of *Baccharis crispa* Spreng. (Asteraceae) from southern Brazil**

*Baccharis crispa* Spreng., popularly known as “carqueja”, is a herbaceous species of the Asteraceae family. The species is widely used in folk medicine is also used in brewery as a substitute for hops. Also has ecological importance because it is a pioneering plant and operates in the maintenance of pollinators. Considering these aspects, *B. crispa* was selected as a priority species for study management and conservation in the Atlantic Forest biome by Brazilian Government. Despite this, little is known about genetic diversity of the species. Thus, this study aimed to the selection of primers ISSR (inter simple sequence repeat) and analysis of populations genetic structure of the Carqueja from the South of Brazil. For the ISSR primers screening, 42 primers were evaluated in a population of 20 individuals. For each primer the PIC (Polymorphic information Content), MI (Index Marker Index) and RP (Resolution Power) indices were calculated. PIC values ranged from 0.27 to 0.45, from 4.87 to 12.37 MI and RP 2.2 and 11.57. With these data we selected 15 primers with the highest values for all three indexes. These primers were run on seven populations of *B. crispa* derived from the states of Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. With the ISSR data several genetic index were measured for the studied populations. The average genetic similarity within each population ranged from 0.27 to 0.54 with an average of 0.20 for all populations, showing high variability. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that most variation occurs within populations (0.56) than among populations (0.43), which is expected in allogamic plant populations. The Shannon diversity index (0.26) and Nei's genetic diversity (0.41) also shows high genetic variability in populations. The grouping of individuals by Jaccard coefficient using UPGMA formed seven groups, corroborating the number of populations. The Mantel test showed a positive correlation ( $r = 0.44$ ) between geographic distance and genetic distance. The fixation index ( $F_{st}$ ) was 0.43. The clustering, correlation and the observed  $F_{st}$  shows that the populations are structured. The pattern distribution of locos showed that the populations of Parana and Santa Catarina, exhibit

more variability, confirming the diversity index calculated. The joint analysis of the results shows that there is high genetic variability in *B. crista* and that regions of the Middle-South Paraná (Guarapuava and General Carneiro Region) and Midwest of Santa Catarina (Joaçaba and Campos Novos Region) are centers of species diversity. The observed data still seem to indicate that the conversion of forest to pasture favors the species and when in agricultural areas, disadvantages the species. These data are novel to *B. crista* and will go on to contribute to the understanding of the evolutionary aspects of the species and the development of strategies for the sustainable cultivation and conservation of this species.

**Key-words:** Carqueja, Genetic Diversity, Population Genetics, Molecular Markers, Atlantic Forest.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b>	<b>10</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>11</b>
2.1 Mata Atlântica	11
2.2 <i>Baccharis crisper</i> Spreng.	12
2.3 Genética de populações	14
2.4 Marcadores moleculares	15
2.4.1 ISSR ( <i>Inter Simple Sequence Repeat</i> )	17
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos específicos	19
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
4.1 Seleção de primers ISSR para estudos genéticos em <i>Baccharis crisper</i>	20
4.1.1 Material Vegetal	20
4.1.2 Extração do DNA	20
4.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese	21
4.1.4 Análises Estatísticas	22
4.2 Análise da estrutura genética de populações de <i>Baccharis crisper</i> da Região Sul do Brasil	23
4.2.1 Material Vegetal	23
4.2.2 Extração de DNA, Amplificação via PCR e Eletroforese	25
4.2.3 Análises estatísticas	25
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
5.1 Seleção de primers ISSR para estudos genéticos em <i>Baccharis crisper</i>	27
5.2 Análise da estrutura genética de populações de <i>Baccharis crisper</i> da Região Sul do Brasil	30
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
6.1 Seleção de primers ISSR para estudos genéticos em <i>Baccharis crisper</i>	39
6.2 Análise da Estrutura Genética em <i>Baccharis crisper</i> Spreng. da Região Sul do Brasil	42
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>48</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Bioma Mata Atlântica é um dos biomas com maior diversidade do mundo. Apresenta elevado número de endemismos e suas formações vegetais estão reduzidas. Por estes fatores, é considerado como um dos locais prioritários para a conservação da vegetação mundial. Entre a sua vegetação estão diversas plantas que são utilizadas na medicina popular brasileira. Destaca-se dentre estas plantas *Baccharis crispa* Spreng., planta que possui importância ecológica e econômica.

Popularmente conhecida como carqueja, *B. crispa* está entre as dez plantas medicinais mais utilizadas e comercializadas no Brasil. Esta planta é usada popularmente por suas atividades antiúlcera, antiinflamatória e para emagrecimento. Além de seu uso medicinal, a carqueja é utilizada para recuperação de áreas degradadas por ser uma espécie pioneira. *B. crispa* é também uma espécie melífera, ajudando na manutenção dos polinizadores de seu ecossistema. Por estas razões, foi considerada como sendo prioridade para a conservação no bioma da Mata Atlântica por órgãos governamentais.

Estimar a estrutura e a variabilidade genética de populações naturais é importante para que sejam elaboradas estratégias de conservação, manejo e exploração, além da compreensão de seus aspectos evolutivos. Como forma de se acessar estas informações genéticas estão os marcadores moleculares.

Mesmo com tal importância, não existem disponíveis na literatura dados genéticos de *B. crispa*. Os marcadores ISSR não demandam conhecimentos prévios da sequência de DNA da espécie em estudo, além de possuir alta capacidade de diferenciar indivíduos e polimorfismo elevado. Ademais, o desenvolvimento de marcadores específicos como microssatélites demandariam altos custos e elevado tempo.

Dessa forma, o uso de marcadores moleculares ISSR para estudos genéticos em *B. crispa* é uma alternativa para a obtenção de dados genéticos populacionais pioneiros para a espécie.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Mata Atlântica

O Bioma Mata Atlântica já foi uma das maiores formações florestais tropicais do mundo, atingindo uma área de cobertura de aproximadamente 150 milhões de ha, com muita heterogeneidade ambiental (RIBEIRO et al, 2009). É a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano, que originalmente distribuiu-se ao longo da costa brasileira até o interior do Paraguai e Argentina (TABARELLI; MANTOVANI; PERES, 2005).

Este Bioma é considerado um dos *hotspots* da biodiversidade do planeta, abrigando mais de 8000 espécies endêmicas entre plantas vasculares e animais (TABARELLI; MANTOVANI; PERES, 2005). Como outros biomas tropicais, a Mata Atlântica está altamente fragmentada, o que pode levar a perda considerável de ecossistemas e a extinção de espécies locais (YOUNG; BOYLE, 2000). Atualmente, restam apenas cerca de 7% da área original da Mata Atlântica (BRASIL, 2012), sendo distribuída, na grande maioria, em fragmentos menores de 50 ha.

A alta diversidade de espécies encontrada na Mata Atlântica está baseada na teoria dos refúgios do Pleistoceno (HAFFER, 1969; AB´SABER, 1977). Esta sugere que as variações climáticas durante as glaciações geravam processos alternantes de contração e expansão da floresta. Nestes espaços de remanescentes florestais ocorria a diferenciação das espécies. Ainda há evidências da ocorrência destes refúgios de floresta no Pleistoceno em áreas subtropicais (HUGALL et al, 2002). Associados a estas mudanças paleoclimáticas, a distribuição dos gradientes de concentração das espécies e a flutuação demográfica, levaram a essa diversificação (CARNAVAL et al, 2009). Ademais, outros fatores diversos além destes refúgios podem ter colaborado para a distribuição das espécies, como regressões marinhas, a formação dos rios, mudanças climáticas globais e atividades tectônicas (MARTINS, 2011).

As variações climáticas do passado até o momento levaram a formação e manutenção de diversas fitofisionomias vegetais, como Floresta Ombrófila Densa, Mista e Aberta, Floresta Decidual e Semidecidual, Mangues, Restingas

e Campos de Altitude. No Pleistoceno, com a predominância de clima frio e seco, a formação de Campos, que se caracteriza por possuir uma vegetação predominantemente herbácea e arbustiva, era dominante, ficando as florestas restritas aos vales. Com o clima tornando-se mais úmido, ocorreu o avanço das florestas sobre as regiões dos Campos, e gradualmente passaram a ocupar praticamente todas as regiões onde ocorriam os campos (BEHLING, 2002).

Frequentemente a ocorrência dos Campos está associada a outras formações vegetais, tais como a Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucárias) e Floresta Ombrófila Densa ao longo de cursos de água, e também com fragmentos do Cerrado (MAACK, 2002).

Os remanescentes restantes da vegetação dos campos estão restritos a pequenas manchas. Ações de conservação devem ser empregadas para diminuir os efeitos da degradação que estes ambientes vem sofrendo (RIBEIRO et al, 2009). Várias espécies de plantas herbáceas e gramíneas são abundantes nos Campos, dentre elas destaca-se *Baccharis crispa* Spreng. A espécie é de tamanha importância que foi selecionada como uma das prioritárias para realização de estudos de conservação e manejo, no ecossistema da Mata Atlântica (EMBRAPA/IBAMA, 2002).

## **2.2 *Baccharis crispa* Spreng.**

*Baccharis crispa* Spreng. popularmente conhecida como carqueja, carqueja-amarga, tiririca de babado, bacanta, cacalia-amarga ou vassoura. Pertencente a família Asteraceae, a subtribo Baccharidinae e ao gênero *Baccharis*. Também é conhecida por suas sinonímias *Baccharis cylindrica* (Less.) DC.; *Baccharis genistelloides* subsp. *crispa* (Spreng.) Joch. Müll.; *Baccharis genistelloides* var. *crispa* (Spreng.) Baker; *Baccharis genistelloides* var. *cylindrica* (Less.) Baker; *Baccharis genistelloides* var. *trimera* (Less.) Baker; *Baccharis myriocephala* DC.; *Baccharis subcrispa* Malag.; *Baccharis trimera* (Less.) DC.; *Baccharis triptera* Mart.; *Cacalia sessilis* Vell.; *Molina cylindrica* Less.; *Molina trimera* Less.; *Pingaea crispa* (Spreng.) F.H. Hellwig (REFLORA 2014; AULER; BATTISTIN; REIS, 2006; CASTRO e FERREIRA, 2000).

O gênero tem distribuição desde o sul do Canadá até o extremo sul da Argentina e do Chile. As regiões Andina da Colômbia, central do Chile e

Argentina, montanhosas do sudeste e no sul brasileiro, Uruguai e leste do Paraguai são os principais centros de diversidade do gênero. A maior concentração de espécies do gênero está desde o estado de São Paulo até o Rio Grande do Sul (BARROSO; BUENO, 2002), e a distribuição neste último estado é ampla (HEIDEN et al, 2007).

*Baccharis crispa* se caracteriza por ser dióica, com flores reunidas em capítulos. É um subarbusto, com altura de até um metro. Possui caule trialado, com folhas pequenas e onduladas (BUDEL e DUARTE, 2009). Propaga-se por sementes, dispersadas principalmente pelo vento, e vegetativamente por rizomas. A espécie é diplóide, com número de cromossomos  $2n = 2x = 18$  (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006).

A carqueja é uma planta natural na Mata Atlântica, concentrada nas regiões sul e sudeste brasileiro, crescendo principalmente nas fitofisionomias de campos de altitude, campos rupestres e nos biomas Pampa, Cerrado e Caatinga (REFLORA, 2014; HEIDEN; MEIRELES, 2010). Pode ser encontrada até altitudes de 2800m (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006). É uma espécie considerada pioneira, encontrada comumente em campos, beiras de estradas e em diversos tipos de solos (PAVAN-FRUEHAUF, 2000). Considerada invasora de pastagens, é adaptada a campos abertos (CASTRO et al, 2002).

Esta espécie é uma das plantas mais utilizadas na medicina popular no Brasil, obtida principalmente através do extrativismo. Seu cultivo é restrito, realizado em poucas propriedades nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná, este último é o maior produtor nacional (CORRÊA JUNIOR et al., 2006).

O uso medicinal se dá no tratamento de várias doenças. Entre elas destacam-se as estomacais, febrífugas, problemas hepáticos e contra infecções intestinais, incluindo propriedades digestivas, antiinflamatórias, antiúlcera, antioxidantes (AGRA; FRANÇA; BARBOSA-FILHO, 2007; DIAS et al, 2009; BIONDO et al, 2011), pode reduzir o índice glicêmico no sangue (CASTRO e FERREIRA, 2000; OLIVEIRA et al. 2005) e também possui efeito relaxante (TORRES et al, 2000).

*Baccharis crispa* contém diversos princípios ativos, tais como flavonóides, saponinas e taninos, dentre outras substâncias em sua composição química (BORELLA et al, 2006; FACHINETTO; TEDESCO, 2009).

Óleos essenciais estão presentes em carquejas cultivadas ou naturais. Destacam-se a presença de globulol, espatulenol, germacreno D e o (E)-cariofileno, ledol e guaiol (SILVA et al, 2007). SILVA et al. (2009) identificaram 14 componentes diferentes que são responsáveis pelas suas propriedades medicinais. A composição química do óleo essencial varia em função das fontes de nitrogênio aplicadas (PALÁCIO et al, 2007). Seus óleos essenciais mostraram-se eficazes no combate ao *Schistosoma mansoni* (OLIVEIRA et al, 2012). E seu extrato aquoso também inibiu o desenvolvimento de ovos do verme *Rhipicephalus microplus* (LÁZARO et al, 2013). Além da sua aplicação medicinal, também é utilizada na indústria de cervejaria como substituto do lúpulo e na aromatização de refrigerantes e licores (CASTRO; FERREIRA, 2000).

A planta é muito visitada por abelhas possuindo importância ecológica na manutenção de polinizadores para outras espécies de seu ecossistema, podendo ser usada também na apicultura (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006). *Baccharis crispa* é utilizada na agricultura devido as suas propriedades alelopáticas, que diminuem o crescimento de sementes, inibem o desenvolvimento de micélios de fungos e de raízes de trigo (CASTRO; FERREIRA, 2000; GONZÁLES, 1993).

Baseando-se nestes aspectos e considerando a taxa que esta espécie é explorada comercialmente, faz-se necessário elaborar estratégias de ação para exploração racional, manejo e conservação dos recursos genéticos da espécie. A genética tem importância fundamental nas ações de conservação de espécies. Dessa forma, a genética de populações pode desempenhar papel importante de maneira a prover informações para elaboração de estratégias de conservação e nos trabalhos de preservação da espécie.

### **2.3 Genética de populações**

A diversidade genética de populações de uma determinada espécie é afetada por diversos fatores evolutivos. Entre eles destacam-se as estratégias de reprodução, dispersão de sementes, fluxo gênico, seleção natural, diversidade geográfica e o centro de diversidade da espécie (HAMRICK; GODT, 1989).

O conhecimento da diversidade genética das espécies que constituem o bioma Mata Atlântica é imprescindível para a determinação de metodologias que visem a sua conservação. A avaliação da diversidade genética de populações naturais também se torna um instrumento importante, pois ela permite identificar o fluxo gênico entre as populações, consequência direta dos processos de polinização e dispersão de sementes. A partir deste conhecimento, é possível inferir práticas de manejo que visem a conservação não apenas do indivíduo, mas da diversidade genética da espécie como um todo (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006).

Além destes fatores evolutivos, a conservação da biodiversidade dos habitats depende particularmente da capacidade da espécie em sobreviver a gargalos de garrafa e eventos aleatórios (MELO et al, 2012). Ambientes fragmentados podem resultar em isolamento, levando a redução do fluxo gênico, aumento de cruzamentos endogâmicos, havendo alterações nas frequências alélicas das populações (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006), o que poderia causar perda da variabilidade genética e, conseqüentemente, diminuição da habilidade das populações naturais em adaptar-se às variações ambientais (YOUNG; BOYLE, 2000; ALMEIDA; FARIA; DA SILVA, 2012). Assim, estudos genéticos tem um papel importante para entender os mecanismos de sobrevivência das espécies que sofreram implicações a partir da fragmentação de habitat (TEMPLETON et al, 1990).

Neste sentido, é necessário conhecer a diversidade e estrutura genética das populações naturais e suas relações históricas e atuais com o ambiente em que ocorre (MELO et al, 2012). Para atingir estes objetivos diversas ferramentas estão disponíveis, dentre estas, os marcadores moleculares são os mais indicados por acessar a informação direta no DNA dos indivíduos de uma população.

## **2.4 Marcadores moleculares**

Superando as limitações que existiam com os marcadores morfológicos, os marcadores moleculares abriram novas perspectivas para pesquisas em conservação de espécies. Os marcadores moleculares baseados em DNA são

características do DNA que podem distinguir indivíduos ou populações, sendo herdados geneticamente (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Atualmente existem diversos marcadores moleculares para a análise do DNA. Os primeiros a serem utilizados foi o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que por vários anos permaneceu como única alternativa de marcador baseado em DNA.

Com o advento da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), surgiram outras técnicas como o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e o SSR (*Simple Sequence Repeat*). O RAPD é baseado na amplificação do DNA utilizando *primers* aleatórios, apresenta alto polimorfismo e é disperso por todo o genoma, porém com pouca reprodutibilidade (WILLIAMS et al, 1990). O AFLP é uma técnica que mescla as vantagens do RFLP e RAPD, o qual utiliza enzimas de restrição para clivar o DNA genômico, ligação de adaptadores específicos nas regiões terminais dos fragmentos clivados seguido da amplificação com *primers* que anelam com os adaptadores (VOS et al, 1995). Os SSRs consistem em pequenas sequências, de uma a cinco pares de base, que se repetem em tandem em número variável no genoma (LITT; LUTY, 1989).

Dentre os marcadores citados, os SSRs são os mais indicados para estudos de genética de populações, pois são específicos, apresentam neutralidade fenotípica, são codominantes, e uma vez desenvolvidos, de fácil uso. Embora existam estas vantagens, para seu desenvolvimento é necessário um alto investimento, pois é requerido o conhecimento prévio do genoma, ou seja, é necessário sequenciar o genoma ou parte deste da espécie de interesse. Com isso, é difícil a obtenção deste tipo de marcador para espécies que não tem elevada importância econômica. Para solucionar a dificuldade em se gerar *primers* específicos obtidos com o sequenciamento do genoma, caso dos microssatélites, e as demais limitações das outras técnicas, foram desenvolvidos os marcadores ISSR. Este marcador caracteriza-se pela amplificação de regiões que estão entre as regiões SSR utilizando *primers* que são parte das próprias repetições SSR (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994).

Os marcadores ISSR permitem o acesso à variabilidade genética de indivíduos ou da população sem a necessidade do conhecimento prévio da

sequência de DNA da espécie alvo do estudo. Tornando-o eficaz para estudos de espécies como *Baccharis crispa* em que não há nenhuma sequência de DNA disponível.

A diversidade genética em plantas pode ser estimada de diversas maneiras. Com as técnicas atuais da biologia molecular, é permitida a observação de polimorfismos da sequência de DNA dos organismos. O trabalho de programas de melhoramento, manejo ou conservação de uma espécie está ligado ao conhecimento do nível de variação genética existente.

Os marcadores moleculares são importantes para a genética de populações, tanto para estudo básicos, quanto para análises de diversidade (TACUATIÁ et al, 2012). O uso de marcadores moleculares tem-se mostrado importantes para quantificar a variabilidade genética em populações naturais, permitindo avaliar o fluxo gênico, efeitos de deriva genética, sistema reprodutivo e níveis de endogamia. Assim, os marcadores moleculares são indicados para os estudos ao nível específico e populacional, inclusive para *B. crispa* (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006; SCHNEIDER, 2009).

#### 2.4.1 ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*)

O marcador ISSR foi desenvolvido com base nas sequências SSR, porém sem a necessidade de ter o genoma do organismo sequenciado (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Além de apresentar uma alta reprodutibilidade, o ISSR apresenta baixo custo de análise.

Os ISSR são fragmentos de DNA de 100 a 3000 pares de base, podendo ser amplificados via PCR, com um único *primer* (FALEIRO, 2007). Este primer, usualmente com 16 a 25 bases, pode ser ou não ancorado, consiste em sequências repetidas que são abundantes e dispersas em todo genoma. O *primer* se adapta a regiões específicas, amplificando sequências entre dois *loci* microssatélites, (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994).

O ISSR é um marcador molecular de herança dominante, ou seja, baseado na presença ou ausência da banda (ESCUADERO; IRIONDO; TORRES, 2003). São largamente utilizados em estudos de genética de populações, podendo detectar a variação em indivíduos e populações de diferentes espécies de plantas. Esta robustez se deve aos *primers* ISSR serem

universais. Como é uma derivação da técnica de SSR, seu polimorfismo está baseado na existência de diferença na quantidade de pares de bases entre regiões microssatélites (REEDY et al, 2002).

Marcadores ISSR vem sendo utilizados para diversos fins, tais como: acessar a diversidade genética em diferentes grupos de plantas (CORTESE et al, 2005; HASSEL et al, 2005; PHARMAWATI; YAN; FINNEGAN, 2005; ISSHIKI et al, 2008; GEORGE; SHARMA; YADON, 2009; LUDTKE et al, 2010; MANICA-CATANI et al, 2009; TANYA et al, 2011; POCZAI et al 2011), construção de mapas genéticos (SANKAR; MOORE, 2001), e para identificação de germoplasma (MORALES et al, 2011; CAMARGO et al, 2013)

Ademais, estes marcadores são comumente utilizados para investigar relações intraespecíficas envolvendo a família Asteraceae. Como exemplo existem estudos para as espécies *Nouelia insignis* Franch. (LUAN; CHIANG. GONG, 2006), *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze (MA et al, 2010), *Aster spathulifolius* Maxim (NGUYEN; CHOI; PARK, 2013), *Artemisia halodendron* L. (HUANG et al, 2014), *Carthamus tinctorius* L. (YAMAN et al, 2014), *Chromolaena odorata* (L.) R. M. King & H. Rob. (PATERSON; ZACHARIADES, 2013) e *Viburnum treleasei* Gand. (MOURA et al, 2014). Também tem sido utilizado para detectar diversidade genética entre espécies, como em *Carthamus* sp. L. (MOKHTARI et al, 2013), e relações filogenéticas da família Asteraceae (ARCHIBALD et al, 2006)

*Baccharis crispa* é uma importante espécie tanto quando observado os aspectos ecológicos como econômicos e nada se conhece dos aspectos genético-populacionais da espécie, assim o uso de marcadores moleculares ISSR podem gerar dados importantes a respeito do *status* genéticos de suas populações. Estes dados populacionais poderão também contribuir para aspectos da dinâmica desta espécie no sul do Brasil além de fornecer dados importantes que podem ser utilizados na elaboração de estratégias de conservação da espécie.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral:

Seleção de *primers* ISSR e análise da estrutura genética-populacional de *Baccharis crispa* Spreng. (Asteraceae) do sul do Brasil.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- 1) Selecionar os *primers* ISSR mais informativos para estudos genéticos em *Baccharis crispa*;
- 2) Estimar a similaridade genética entre os indivíduos das populações e a similaridade média entre as populações;
- 3) Estimar a variabilidade genética de populações de *B. crispa* do sul do Brasil utilizando marcadores ISSR;
- 4) Discutir a estruturação genética das populações de *B. crispa*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Seleção de *primers* ISSR para estudos genéticos em *Baccharis crispa*

#### 4.1.1 Material Vegetal

Para seleção de *primers* foram coletadas folhas jovens de 20 indivíduos de uma população de *Baccharis crispa* no município de Guarapuava, Paraná. Foram coletadas amostras de plantas a pelo menos 10 metros de distância uma da outra, a fim de evitar que se coletasse a mesma planta devido à propagação ser também por rizoma. As folhas coletadas foram embaladas em papel alumínio, armazenadas primeiramente em nitrogênio líquido e depois a -20°C, até o momento da extração do DNA.

#### 4.1.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. A extração foi realizada segundo a metodologia de DOYLE e DOYLE (1987). Nos tubos contendo 200 mg de material vegetal foram adicionados 700 µl de tampão composto por: 20mM de EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid); 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0 (tris(hydroxymethyl)aminomethane); 1,4 M NaCl (Sodium chloride); 2% de CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide); 0,4% de β-mercaptoetanol. Os tubos foram incubados por 45 minutos a 65°C em banho-maria, as amostras foram lavadas com clorofórmio-álcoolisoamílico (24:1) em seguida centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm por duas vezes. O DNA foi precipitado com isopropanol e seguido de diversas lavagens com etanol, para a obtenção de amostras livres de contaminantes.

Depois de seco o DNA foi ressuspensão em 100 µl de tampão TE, tratado com RNase a 10 mg/mL-1 por incubação a 37°C por 1 hora. Após o DNA foi precipitado com 10 µl de acetato de sódio 3M e 200 µl de etanol gelado e depois de sucessivas lavagens com etanol as amostras foram ressuspensas em tampão TE e armazenadas a -20°C até o momento da utilização. As amostras foram quantificadas por eletroforese em gel de agarose 0,9% coradas com brometo de etídio, utilizando como padrão quantidades conhecidas do DNA do Fago λ (50; 100; 200 e 400ng).

#### 4.1.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese

Para amplificação do DNA foram utilizados 42 *primers* ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canadá (Tabela 1). As reações de PCR foram conduzidas em volume final de 12,5 µL, contendo, para cada amostra: 20 ng de DNA, 0,2 µM de *primer*, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1 U de Taq DNA polimerase. A reação de PCR foi conduzida com um passo inicial de desnaturação à 94°C por 5min, seguido de 30 a 35 ciclos à 90°C por 45seg, 50 a 55°C por 30seg e 72°C por 60seg. Foi adicionado um passo adicional de 72°C por 10 min para extensão dos fragmentos. A temperatura de anelamento e o número de ciclos variaram de acordo com o especificado para cada *primer* (Tabela 1).

**Tabela 1** - Relação dos 42 primers ISSR utilizados avaliados em *Baccharis crispa* Spreng. com suas respectivas sequências e temperatura de anelamento (TA).

Primer	Sequência*	TA °C	Primer	Sequência*	TA °C
UBC 807	(AG) <sub>8</sub> T	55	UBC 848	(CA) <sub>8</sub> RG	55
UBC 808	(AG) <sub>8</sub> C	50	UBC 852	(CT) <sub>8</sub> RA	52
UBC 809	(AT) <sub>8</sub> T	55	UBC 855	(AC) <sub>8</sub> YT	50
UBC 810	(GA) <sub>8</sub> T	52	UBC 856	(AC) <sub>8</sub> YA	55
UBC 811	(GA) <sub>8</sub> C	52	UBC 857	(AC) <sub>8</sub> YG	54
UBC 813	(CT) <sub>8</sub> T	50	UBC 858	(TG) <sub>8</sub> RT	50
UBC 814	(CT) <sub>8</sub> A	50	UBC 859	(TG) <sub>8</sub> RC	55
UBC 815	(CT) <sub>8</sub> G	52	UBC 860	(TG) <sub>8</sub> RA	52
UBC 817	(CA) <sub>8</sub> A	52	UBC 861	(ACC) <sub>6</sub>	52
UBC 820	(GT) <sub>8</sub> T	52	UBC 864	(ATG) <sub>6</sub>	55
UBC 822	(TC) <sub>8</sub> A	53	UBC 866	C(TCC) <sub>5</sub> TC	55
UBC 823	(TC) <sub>8</sub> C	52	UBC 868	(GGA) <sub>6</sub>	53
UBC 824	(TC) <sub>8</sub> G	50	UBC 873	(GACA) <sub>4</sub>	50
UBC 826	(AC) <sub>8</sub> C	52	UBC 878	GGA(TGGA) <sub>3</sub> T	52
UBC 827	(AC) <sub>8</sub> G	50	UBC 881	(GGGGT) <sub>3</sub>	53
UBC 828	(TG) <sub>8</sub> A	50	UBC 886	VDV(CT) <sub>7</sub>	55
UBC 834	(AG) <sub>8</sub> YT	52	UBC 889	DBD(AC) <sub>7</sub>	54
UBC 835	(AG) <sub>8</sub> YC	54	UBC 890	VHV(GT) <sub>7</sub>	54
UBC 836	(AG) <sub>8</sub> YA	53	UBC 891	HVH(TG) <sub>7</sub>	54
UBC 840	(GA) <sub>8</sub> YT	54	UBC 899	CATGGTGTGGTC ATTGTTCCA	55
UBC 843	(CT) <sub>8</sub> RA	54	UBC 900	ACTTCCCCACAGG TTAACACA	55

\* Y = (C, T); R = (A, G); H = (A, C, T); B = (C, G, T); V = (A, C, G); D = (A, G, T)

Os produtos de amplificação foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio (0,5 µg mL<sup>-1</sup>) e submetidos a uma

voltagem de 110V por aproximadamente 4 horas. Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado como parâmetro o marcador de peso molecular DNA *Ladder* 100 pb. O resultado da eletroforese foi visualizado em luz UV e fotodocumentado com sistema digital.

#### 4.1.4 Análises Estatísticas

Dos 42 *primers* ISSR utilizados para amplificação, somente os que apresentaram produtos de amplificação com bom padrão de resolução foram considerados. Os géis oriundos destes *primers* foram avaliados genotipando os indivíduos de acordo com a presença (1) e ausência (0) de bandas gerando uma matriz binária. A porcentagem de polimorfismo de cada *primer* ISSR foi calculada dividindo o número de bandas polimórficas pelo número total de bandas amplificadas pelo referido *primer*. Foram considerados polimórficos os locos com frequência entre 5 e 95%. Os dados obtidos de cada *primer* ISSR foram avaliados conforme três parâmetros: conteúdo de informação polimórfica (PIC), índice do marcador (MI) e poder de resolução (RP).

O PIC foi calculado conforme o proposto por Roldan-Ruiz et al (2000):

$$PIC_i = 2 f_i (1 - f_i),$$

em que  $PIC_i$  é o conteúdo de informação polimórfica do marcador  $i$ ,  $f_i$  é a frequência dos fragmentos presentes na amostra,  $1 - f_i$  a frequência dos fragmentos ausentes.

O MI foi calculado conforme VARSHNEY et al (2007):

$$MI = PIC \times EMR$$

em que o EMR é  $\eta \times \beta$ ,  $\eta$  sendo definido como o produto total de fragmentos por *primer* e  $\beta$  a fração dos fragmentos polimórficos pelo número total de fragmentos do *primer*.

O cálculo do RP foi realizado conforme PREVOST e WILKINSON (1999):

$$RP = \sum I_b$$

em que  $I_b$  representa o número de fragmentos informativos, podendo ser expresso em valores em uma escala de 0 - 1 pela seguinte fórmula:

$$I_b = 1 - [2 \times |0,5 - p|],$$

onde  $p$  é a proporção dentre os indivíduos que possuem o fragmento entre os 20 envolvidos no estudo.

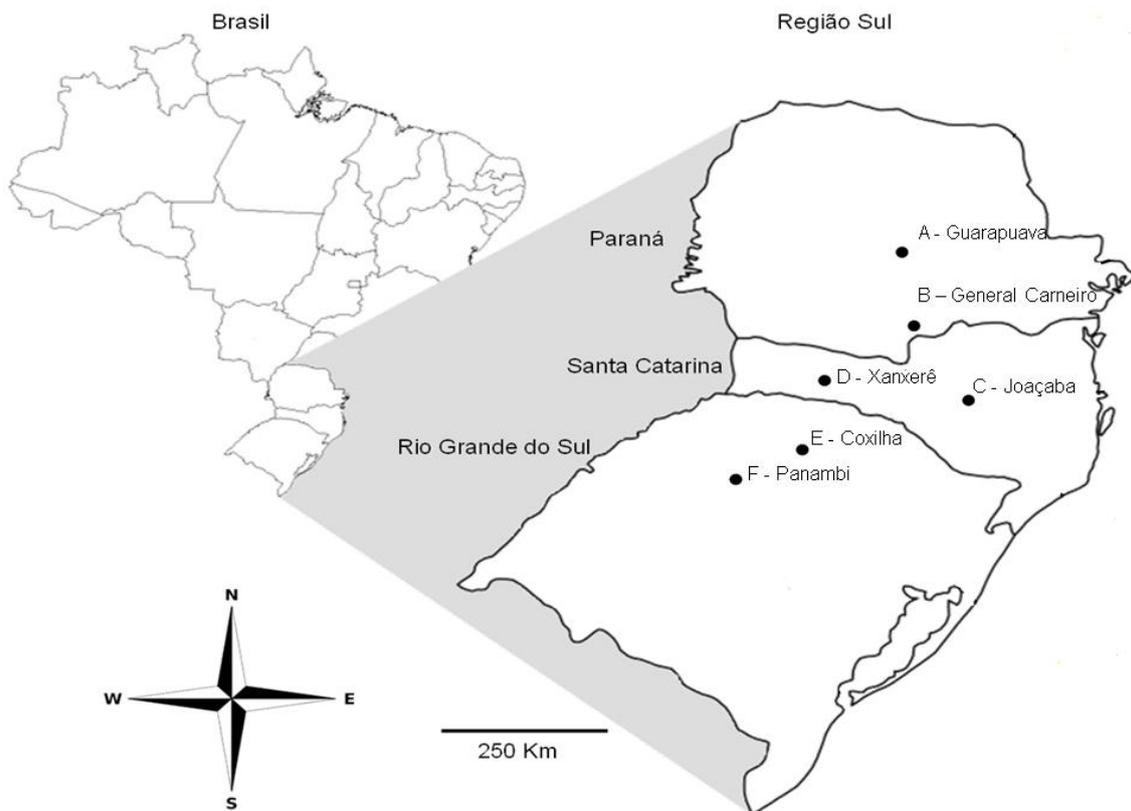
Os três índices foram comparados pela eficiência de projeção segundo o parâmetro de correlação entre as distâncias originais e as estimadas, obtidas pela representação gráfica da dispersão bidimensional ( $r$ ).

Para seleção dos 15 melhores *primers* ISSR para estudos genéticos em carqueja, primeiramente foram identificados os 10 *primers* que apresentaram valores mais altos para cada um dos índices calculados. Após esta identificação foram selecionados os primers utilizando os seguintes critérios: 1 - *primers* que coincidiram estarem entre os 10 melhores para os três índices; 2 - *primers* que coincidiram estarem entre os 10 melhores para dois índices; 3 - primers que apresentaram maiores valores para RP; 4 - *primers* que apresentaram os maiores valores para MI.

## **4.2 Análise da estrutura genética de populações de *Baccharis crispa* da Região Sul do Brasil**

### **4.2.1 Material Vegetal**

Para a avaliação do *status* genético de *Baccharis crispa* foram coletadas folhas de indivíduos de seis populações da espécie. Estas populações foram coletadas nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 1). De cada população, foram coletadas folhas de 16 a 21 indivíduos (Tabela 2). As plantas amostradas estavam a pelo menos 10 metros de distância, a fim de evitar que se coletasse o mesmo indivíduo, devido à sua propagação ser também por rizoma. As folhas coletadas foram acondicionadas em embalagens contendo sílica gel.



**Figura 1** - Localização geográfica das populações de *Baccharis crispa* Spreng. avaliadas neste trabalho.

**Tabela 2-** Dados das populações de *Baccharis crispa* Spreng. coletadas no Sul do Brasil e utilizadas neste trabalho. UF indica a Unidade da Federação e N número de indivíduos amostrados.

Local de coleta Município	UF	N	Código da população	Formação Vegetal Original	Situação vegetacional atual
Guarapuava	PR	16	A	Mosaico <sup>1</sup>	Pastagens
General Carneiro	PR	16	B	Mosaico <sup>1</sup>	Pastagens
Joaçaba	SC	19	C	Transição <sup>3</sup>	Pastagens
Xanxerê	SC	20	D	Transição <sup>2</sup>	Pastagens
Coxilha	RS	21	E	Mosaico <sup>1</sup>	Agricultura
Panambi	RS	20	F	Mosaico <sup>1</sup>	Agricultura

<sup>1</sup> Floresta Ombrófila Mista e Campos.

<sup>2</sup> Floresta Estacional Semidecidual e Ombrófila Mista.

<sup>3</sup> Floresta Estacional Semidecidual com enclaves de Floresta Ombrófila Mista.

O material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal, vinculado ao Departamento de Ciências Biológicas, no *campus* do CEDETEG, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, Paraná, onde o projeto foi desenvolvido. No laboratório, o

material foi macerado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , até o momento da extração do DNA.

#### 4.2.2 Extração de DNA, Amplificação via PCR e Eletroforese

Para as seis populações, a extração do DNA, a amplificação via PCR e a visualização dos resultados via eletroforese foi feita conforme os itens 4.1.2, e 4.1.3.

#### 4.2.3 Análises estatísticas

Os indivíduos de todas as populações foram genotipados de acordo com a presença e ausência de bandas, a partir desses dados foi construída uma matriz binária. A porcentagem de polimorfismo de cada *primer* ISSR foi calculada dividindo o número de bandas polimórficas pelo número total de bandas amplificadas pelo referido *primer*. A similaridade genética entre os indivíduos, sem considerar populações, foi mensurada pelo software NTSYS 2.2 (ROHLF, 2000), utilizando o coeficiente de Jaccard. O agrupamento dos indivíduos e a construção do dendrograma foram feita pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

Para a avaliação do padrão de locos nas populações, primeiramente foi determinada a presença exclusiva e ausência exclusiva de locos em cada população. Em segundo momento foi feito o agrupamento dos locos para a construção da distribuição gráfica da variabilidade genética de acordo com as populações e locais de coleta. Nesta etapa, os locos foram agrupados de acordo com o padrão de presença e ausência nas populações. Após obtenção dos grupos de locos, para cada população foi computado o total possível de ocorrências (banda possíveis) para todos os grupos de locos e em seguida o número de ocorrências observada para cada grupo. A divisão do número de ocorrências observado para um grupo de locos pelo total de ocorrências possíveis de todos os grupos de locos em uma população gerou a frequência daquele grupo de locos dentro da população. Os valores das frequências obtidos foram utilizados para desenho dos gráficos.

Para a análise da diversidade genética foram calculados o índice de diversidade de Shannon (I), a diversidade genética de Nei (He) (NEI, 1978), porcentagem de locos polimórficos e fluxo gênico. O dendrograma de distância das populações foi desenhado baseado na distância genética de Nei (NEI, 1978). Para estes cálculos, foi assumido que as populações estão em Equilíbrio de Hardy-Weiberg (EHW). Todos estes índices foram mensurados pelo software POPGENE versão 1.32 (YEH et al, 1999).

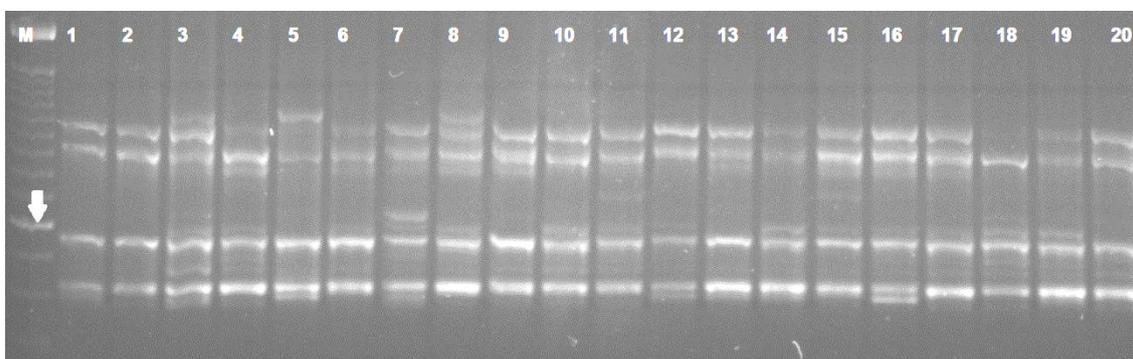
Para testar a correlação entre a distância geográfica e a distância genética entre as populações foi feito o teste de Mantel com 1000 permutações utilizando o software NTSYS 2.2. Para determinação dos índices de diferenciação genética de  $\Phi_{ST}$  (FST) e a variância entre os componentes e seus níveis de significância foi feita a análise de variância molecular (AMOVA) utilizando o software ARLEQUIN versão 3.11 (EXCOFFIER et al, 2005).

A análise dos Coordenadas Principais (PCoA) foi conduzida utilizando o software NTSYS 2.2. A análise Bayesiana, para obtenção dos clusters (grupos genéticos), foi feita utilizando o programa STRUCTURE (PRITCHARD; WEN; FALUSH., 2010). Para determinar o número ideal de clusters (K), foram feitas simulações partindo do princípio que era possível a obtenção de qualquer número de clusters entre 1 e 10, sendo que para cada simulação foram feitas 10 repetições. Para esta análise foi utilizado o modelo de ascendência sem mistura, e as frequências alélicas foram correlacionados por 10000 *burn-in* e 100000 MCMC (Cadeia de Monte Carlo Markov) repetições após *burn-in*. Para definição do K (número de clusters - grupos genéticos) mais provável em relação aos propostos pela análise, foram utilizados os critérios sugeridos por EVANO; REGNAUT; GOUDET (2005), com o auxílio do programa STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLD, 2012).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Seleção de *primers* ISSR para estudos genéticos em *Baccharis crispa*

Dos 42 *primers* ISSR que foram avaliados, 34 (80,95%) apresentaram produtos de amplificação e oito (19,05%) não apresentaram produtos de amplificação (Tabela 3). Todos os *primers* que apresentaram produtos de amplificação foram polimórficos. Os 34 *primers* amplificaram 396 fragmentos, o que resultou em média de 11 fragmentos por *primer*. Dos 396 fragmentos, 90,9% (360) foram polimórficos, enquanto 36 fragmentos foram monomórficos. O *primer* UBC 823 apresentou o maior número de bandas (20) e o UBC 890 o menor (4). Dentre os que apresentaram maior porcentagem de polimorfismo (100%) estão UBC 820, UBC 824, UBC 827, UBC 855, UBC 856, UBC 890, UBC 891 e UBC 899. Já o menor polimorfismo (70%) foi apresentado pelo *primer* UBC 858 (Tabela 3). Na figura 2 é possível observar o padrão de amplificação do *primer* ISSR UBC 855 na população de carqueja utilizada neste trabalho.



**Figura 2** - Gel de agarose com o padrão de amplificação do *primer* ISSR UBC 855 nos 20 indivíduos da população de *Baccharis crispa* Spreng. coletada no Sul do Brasil. M indica o marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb. A seta indica o fragmento de 600 pb.

O intervalo dos fragmentos amplificados variou de 100 a 1600 pares de base. A menor amplitude de fragmentos foi no *primer* UBC 890 (490 a 720pb), e a maior no *primer* UBC 899 (210 a 1600pb).

O valor mais alto para o PIC foi do *primer* UBC 899 (0,45) e o mais baixo para o UBC 813 (0,27) (Tabela 3). A média de PIC para todos os *primers* foi de

0,38. O MI apresentou valores que variaram de 12,37 (UBC 860) a 4,87 (UBC 813) (Tabela 3), com média de 7,73. Os valores de PIC e MI apresentaram correlação positiva ( $r^2 = 0,73$ ,  $p < 0,05$ ).

Os valores de RP variaram de 11,57 (UBC 899) a 2,2 (UBC 809) (Tabela 3), com média de 5,87. A correlação de RP com PIC ( $r^2=0,23$ ,  $p < 0,05$ ) e MI ( $r^2=0,17$ ,  $p < 0,05$ ) foi positiva, porém menores se comparadas à correlação entre PIC e MI. Os resultados dos índices estatísticos são apresentados na Tabela 03.

Para seleção dos melhores *primers* foram identificados os 10 *primers* com maiores valores para PIC, para MI e para RP. Com isso foi possível identificar cinco *primers* que coincidiram estarem entre os 10 melhores valores para os três índices (UBC 827, UBC 834, UBC 856, UBC 866 e UBC 899). Em seguida, foram identificados e selecionados quatro *primers* que coincidiram estar entre os 10 melhores valores para dois índices (UBC 807, UBC 808, UBC 843 e UBC 848). Para completar os 15 *primers*, foram selecionados entre os restantes, quatro que apresentaram maiores valores para RP (UBC 823, UBC 859, UBC 868 e UBC 873) e dois que apresentaram os maiores valores para MI (UBC 824 e UBC 855) (Tabela 3).

**Tabela 3** - Relação dos 42 primers ISSR utilizados neste estudo com seus respectivos parâmetros em *Baccharis crispa* Spreng. coletadas no Sul do Brasil. PA - produto de amplificação; NF - número de fragmentos amplificados, % P - porcentagem de polimorfismo, PIC - conteúdo de informação polimórfica, MI- índice do marcador, RP - poder de resolução.

Primer*	PA	NF	% P	PIC	MI	RP
<b>UBC 807</b>	✓	8	87,5	0,41	7,87	4,88
<b>UBC 808</b>	✓	7	85,7	0,42	7,87	3,80
UBC 809	✓	5	80,0	0,38	6,68	2,20
UBC 810	✓	8	87,5	0,39	7,65	4,32
UBC 811	-	-	-	-	-	-
UBC 813	✓	11	81,8	0,27	4,87	2,98
UBC 814	✓	8	87,5	0,32	7,10	3,33
UBC 815	-	-	-	-	-	-
UBC 817	✓	15	93,3	0,32	6,58	6,27
UBC 820	✓	14	100	0,32	6,75	6,39
UBC 822	✓	17	76,4	0,36	5,77	6,81
<b>UBC 823</b>	✓	20	90,0	0,36	6,76	7,73
<b>UBC 824</b>	✓	10	100	0,38	8,01	4,65
UBC 826	✓	16	87,5	0,34	6,04	5,16
<b>UBC 827</b>	✓	10	100	0,39	7,63	6,60
UBC 828	-	-	-	-	-	-
<b>UBC 834</b>	✓	17	94,1	0,40	11,93	11,5
UBC 835	-	-	-	-	-	-
UBC 836	✓	10	90,0	0,39	7,63	5,84
UBC 840	-	-	-	-	-	-
<b>UBC 843</b>	✓	12	91,6	0,30	5,04	4,53
<b>UBC 848</b>	✓	15	93,3	0,38	7,96	8,42
UBC 852	-	-	-	-	-	-
<b>UBC 855</b>	✓	7	100	0,38	8,08	4,10
<b>UBC 856</b>	✓	15	100	0,42	8,85	10,18
UBC 857	✓	13	92,3	0,36	7,08	5,94
UBC 858	✓	10	70,0	0,37	5,40	3,98
<b>UBC 859</b>	✓	14	92,8	0,37	7,56	7,26
UBC 860	✓	10	90,0	0,41	12,37	3,92
UBC 861	-	-	-	-	-	-
UBC 864	✓	11	90,0	0,39	6,88	5,72
<b>UBC 866</b>	✓	14	92,8	0,38	7,87	9,34
<b>UBC 868</b>	✓	14	92,8	0,38	7,02	7,47
<b>UBC 873</b>	✓	13	92,3	0,35	6,93	6,92
UBC 878	✓	9	88,0	0,37	7,30	4,16
UBC 881	✓	10	80,0	0,41	8,12	5,33
UBC 886	✓	17	86,6	0,35	6,91	7,94
UBC 889	✓	8	87,5	0,41	7,62	4,18
UBC 890	✓	4	100	0,43	10,23	3,00
UBC 891	✓	7	100	0,39	9,88	3,64
<b>UBC 899</b>	✓	16	100	0,45	11,93	11,57
UBC 900	-	-	-	-	-	-

\* primers em negrito foram considerados os melhores para estudos genéticos em *B. crispa* de acordo com os critérios utilizados neste trabalho.

✓ com amplificação

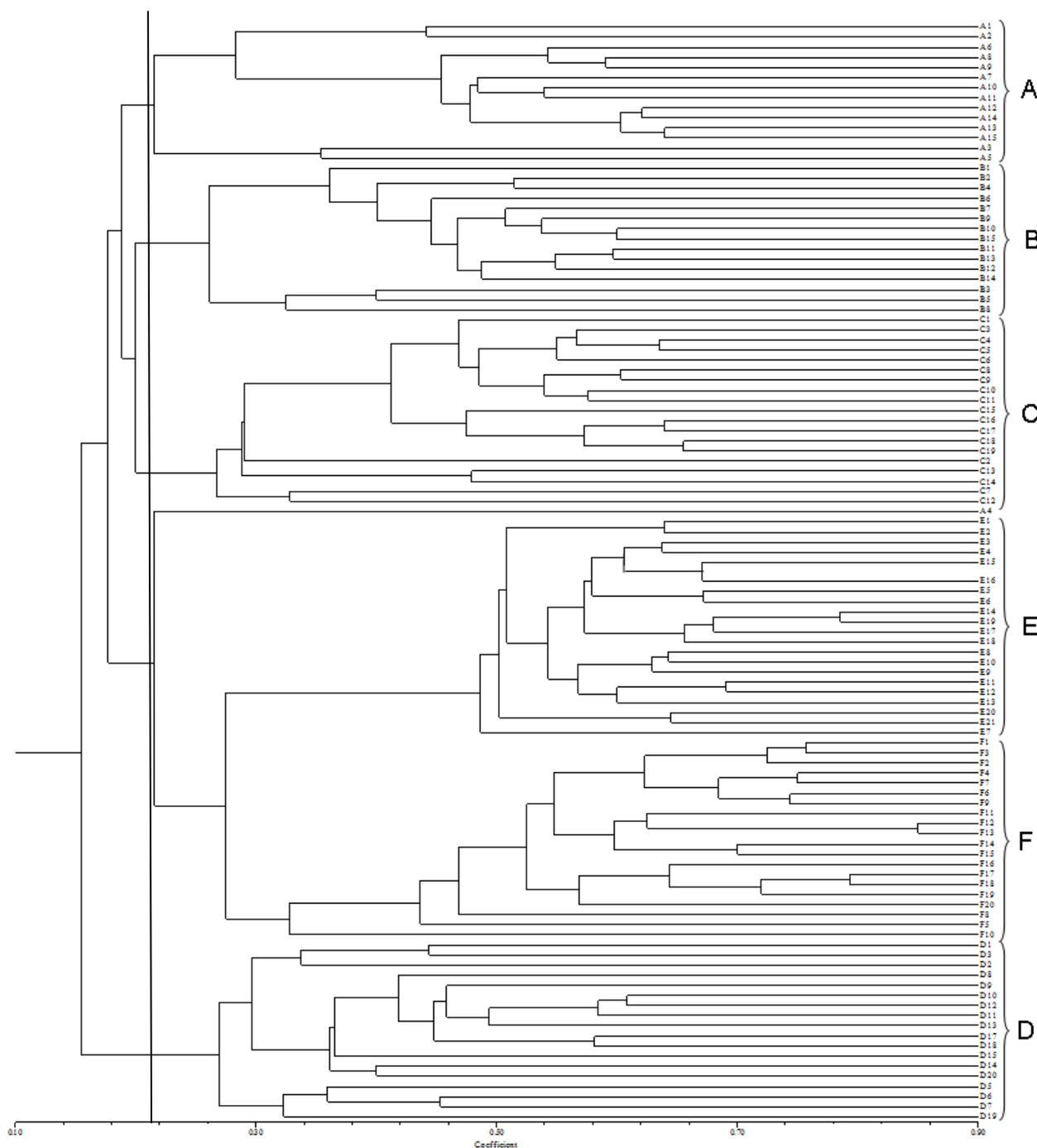
- sem amplificação

## 5.2 Análise da estrutura genética de populações de *Baccharis crispa* da Região Sul do Brasil

Os 15 *primers* ISSR (Tabela 4) utilizados nas seis populações de *B. crispa* amplificaram 195 locos, com média de 13 locos por *primer*. Dentre os 195 locos amplificados, 189 foram polimórficos, resultando em 96,9% de polimorfismo. A similaridade média entre as populações foi de 20%, e dentro das populações apresentou valores de 27% (A), 33% (B), 26% (C), 32% (D), 54% (E) e 53% (F). O dendrograma construído baseado na similaridade de Jaccard (Figura 3), sem considerar populações agrupou os 112 indivíduos em seis grupos. Cada grupo foi formado exclusivamente pelos indivíduos de sua própria população.

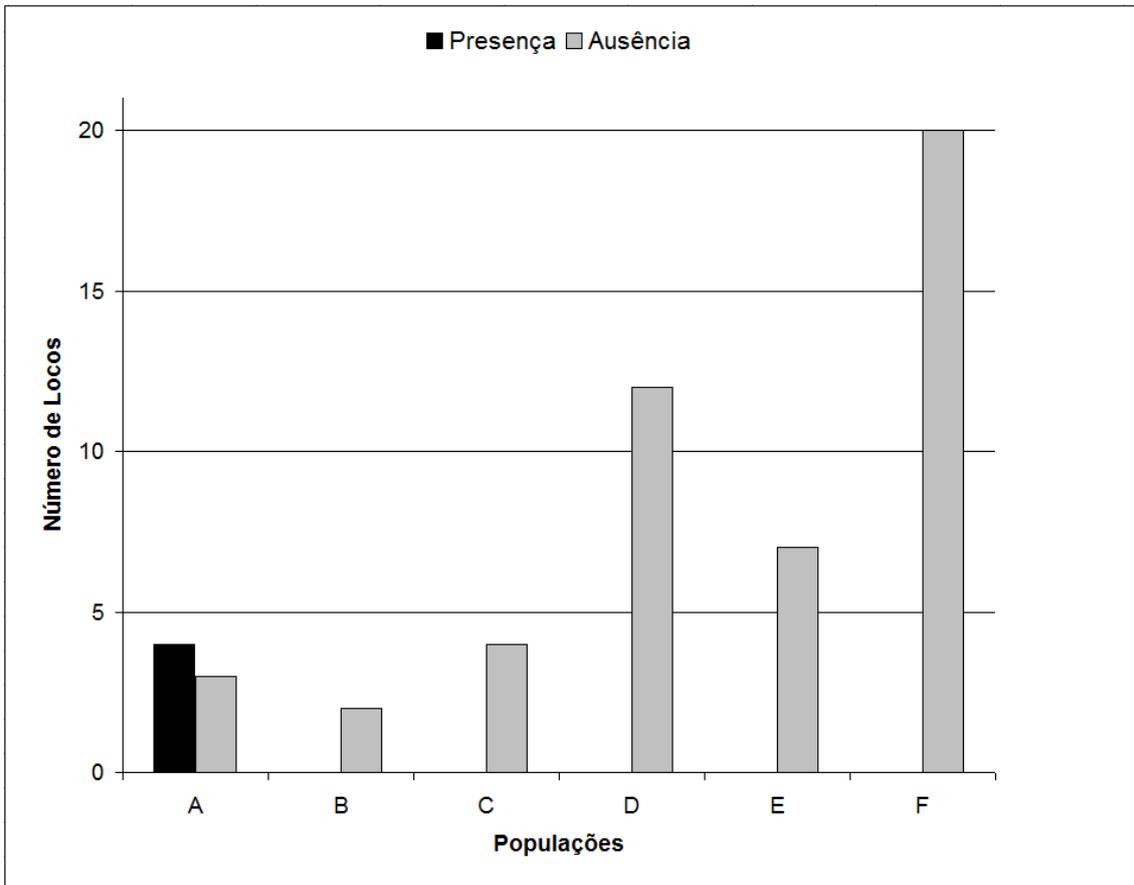
**Tabela 4** - Relação dos 15 primers ISSR utilizados para a análise da estrutura genética de seis populações de *Baccharis crispa* Spreng. coletadas no Sul do Brasil. TA - temperatura de anelamento; NF - número de fragmentos amplificados, %P - porcentagem de polimorfismo.

Primer	Sequência	TA	NF	%P
UBC 807	(AG) <sub>8</sub> T	52	11	100
UBC 808	(AG) <sub>8</sub> C	50	7	100
UBC 823	(TC) <sub>8</sub> C	52	20	95,0
UBC 824	(TC) <sub>8</sub> G	50	10	100
UBC 827	(AC) <sub>8</sub> G	53	11	100
UBC 834	(AG) <sub>8</sub> CTT	52	17	94,1
UBC 843	(CT) <sub>8</sub> AGA	54	12	100
UBC 848	(CA) <sub>8</sub> AGG	55	15	93,3
UBC 855	(AC) <sub>8</sub> CTT	55	7	100
UBC 856	(AC) <sub>8</sub> CTA	55	15	100
UBC 859	(TG) <sub>8</sub> AGC	55	14	100
UBC 866	C(TCC) <sub>5</sub> TC	55	14	92,8
UBC 868	(GGA) <sub>6</sub>	50	14	92,8
UBC 873	(GACA) <sub>4</sub>	50	13	92,3
UBC 899	CATGGTGTGGTTCATTGTTCCA	50	16	93,7



**Figura 3** - Dendrograma dos 112 indivíduos de *Baccharis crispa* Speg. coletados no Sul do Brasil, baseado na similaridade de Jaccard e agrupados pelo método UPGMA. População A (Guarapuava, PR), B (General Carneiro, PR), C (Joaçaba, SC), D (Xanxerê, SC), E (Coxilha, RS) e F (Panambi, RS)

Na avaliação de presença e ausência exclusiva de locos em cada população foi observado que somente a população A (Guarapuava) apresentou de três locos exclusivos. Com relação à ausência exclusiva de locos, a população F (Panambi) (12), seguida de E (Coxilha) (5), D (Xanxerê) (4), C (Joaçaba) (3), B (General Carneiro) (1) e A (Guarapuava) (1) (Figura 4).

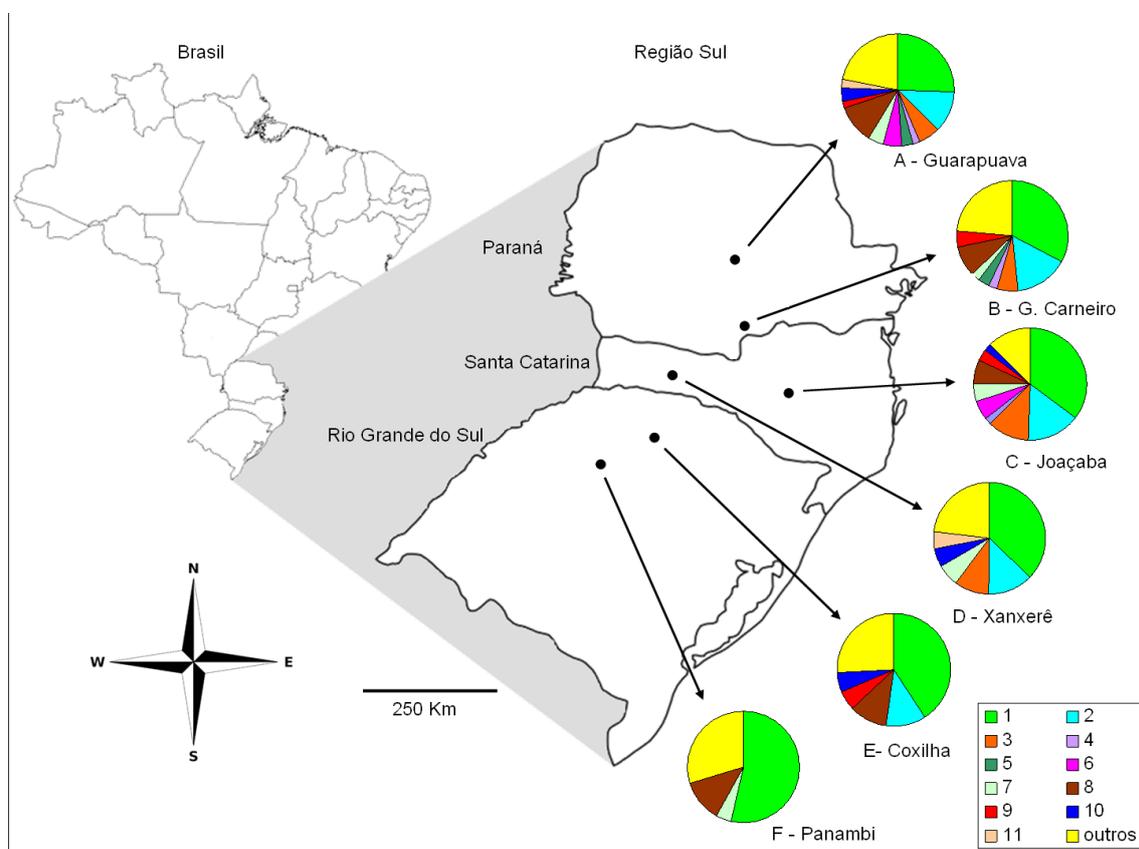


**Figura 4** - Número de presenças e ausências exclusivas de locos nas seis populações de *Baccharis crispa* Spreng. coletadas no Sul do Brasil.

A avaliação do padrão dos locos nas populações permitiu a identificação de 11 grupos no qual formaram 134 locos. O maior grupo foi formado por 27 locos e o menor com cinco locos (Tabela 5). Cinquenta e cinco locos apresentaram padrão único e não formaram grupo e foram identificados como outros. O padrão de distribuição dos 11 grupos de locos mais os locos considerados como outros são apresentados na figura 5.

**Tabela 5** - Padrão de presença e ausência de 11 grupos de locos nas seis populações de *Baccharis crispa* Spreng. coletadas no Sul do Brasil.

Grupos de locos	Nº de locos	Populações					
		A	B	C	D	E	F
1	44	+	+	+	+	+	+
2	20	+	+	+	+	+	-
3	12	+	+	+	+	-	-
4	5	+	+	+	-	-	-
5	5	+	+	-	-	-	-
6	10	+	+	+	+	-	-
7	8	+	+	+	-	+	+
8	6	+	-	+	+	+	-
9	5	+	+	+	+	-	-
10	5	+	+	+	+	-	+
11	5	+	+	+	-	+	-



**Figura 5** - Distribuição dos grupos de locos ISSR nas seis populações de *Baccharis crispa* Spreng. coletadas no Sul do Brasil.

O índice da diversidade de Shannon ( $H'$ ) apresentou variação de 0,10 (população F) a 0,29 (população A), com valor de 0,26 entre as populações (Tabela 6). A diversidade genética de Nei ( $H_e$ ) entre as populações foi de 0,41, variando de 0,16 (população F) a 0,29 (população A) (Tabela 6).

**Tabela 6** - Estimativas genéticas das seis populações naturais de *Baccharis crispa* Spreng. coletadas no Sul do Brasil: I: índice de Shannon; He: diversidade genética de Nei; P: porcentagem de locos polimórficos.

População	I	He	P(%)
A	0,29	0,29	97,35
B	0,19	0,29	69,84
C	0,17	0,28	76,19
D	0,16	0,26	67,72
E	0,14	0,23	57,14
F	0,10	0,16	44,44
Todas	0,26	0,41	

Os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) demonstraram que a maior variação ocorre dentro das populações (56,58%) do que entre as populações 43,42% (Tabela 7).

**Tabela 7** - Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as seis populações de *Baccharis crispa* Spreng. coletadas no Sul do Brasil avaliadas neste trabalho.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variância
Entre populações	6	436,5	3,42	43,42
Dentro populações	133	592,92	4,45	56,58
Total	139	1029,42	7,87	

Índice de Fixação Fst: 0,43 (P < 0,001)

O número de migrantes ( $N_m$ ) encontrado para as seis populações de *B. crispa* foi de 0,89. Já, quando comparados as populações aos pares, este resultado foi variável (Tabela 8). Os valores mais altos de  $N_m$  foram muito próximos para três pares de populações, A (Guarapuava) e D (Xanxerê) (3,72); A (Guarapuava) e C (Joaçaba) (3,62) e A (Guarapuava) e B (General Carneiro) (3,54) (Tabela 8).

**Tabela 8** - Fluxo gênico (abaixo da diagonal), distâncias geográficas em linha reta (em Km) (acima da diagonal) entre pares de populações de *Baccharis crispa* Spreng. do Sul Brasil.

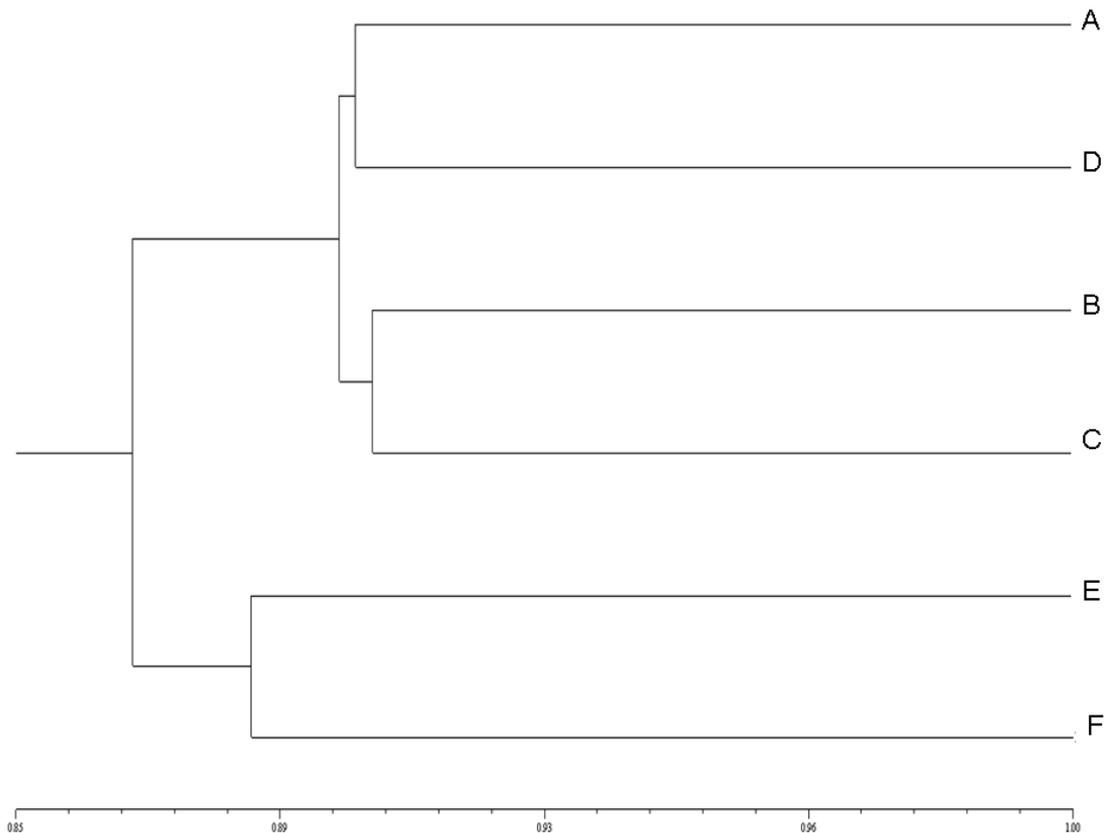
	A	B	C	D	E	F
A		116,1	200	190	316	381
B	3,54		85	119	213	300
C	3,62	2,3		95	132	232
D	3,72	2,2	2,02		140	191
E	2,41	1,33	1,16	1,32		119
F	2,46	1,48	1,32	1,41	1,23	

A distância genética média, baseada em Nei (1978) entre as populações foi de 0,12. A distância genética foi encontrada em menor valor (0,10), em geral, nas populações do Paraná e de Santa Catarina (A, B, C e D). Enquanto que as populações de C (Joaçaba) e E (Coxilha) apresentaram a maior distância genética (0,18) (Tabela 9).

**Tabela 9** - Estimativas de identidade (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) de Nei (1978) entre as populações de *Baccharis crispa* Spreng. do Sul do Brasil.

	A	B	C	D	E	F
A		0,89	0,90	0,90	0,86	0,88
B	0,11		0,90	0,90	0,84	0,88
C	0,10	0,10		0,90	0,82	0,87
D	0,10	0,10	0,10		0,85	0,89
E	0,14	0,16	0,18	0,15		0,88
F	0,12	0,12	0,13	0,11	0,12	

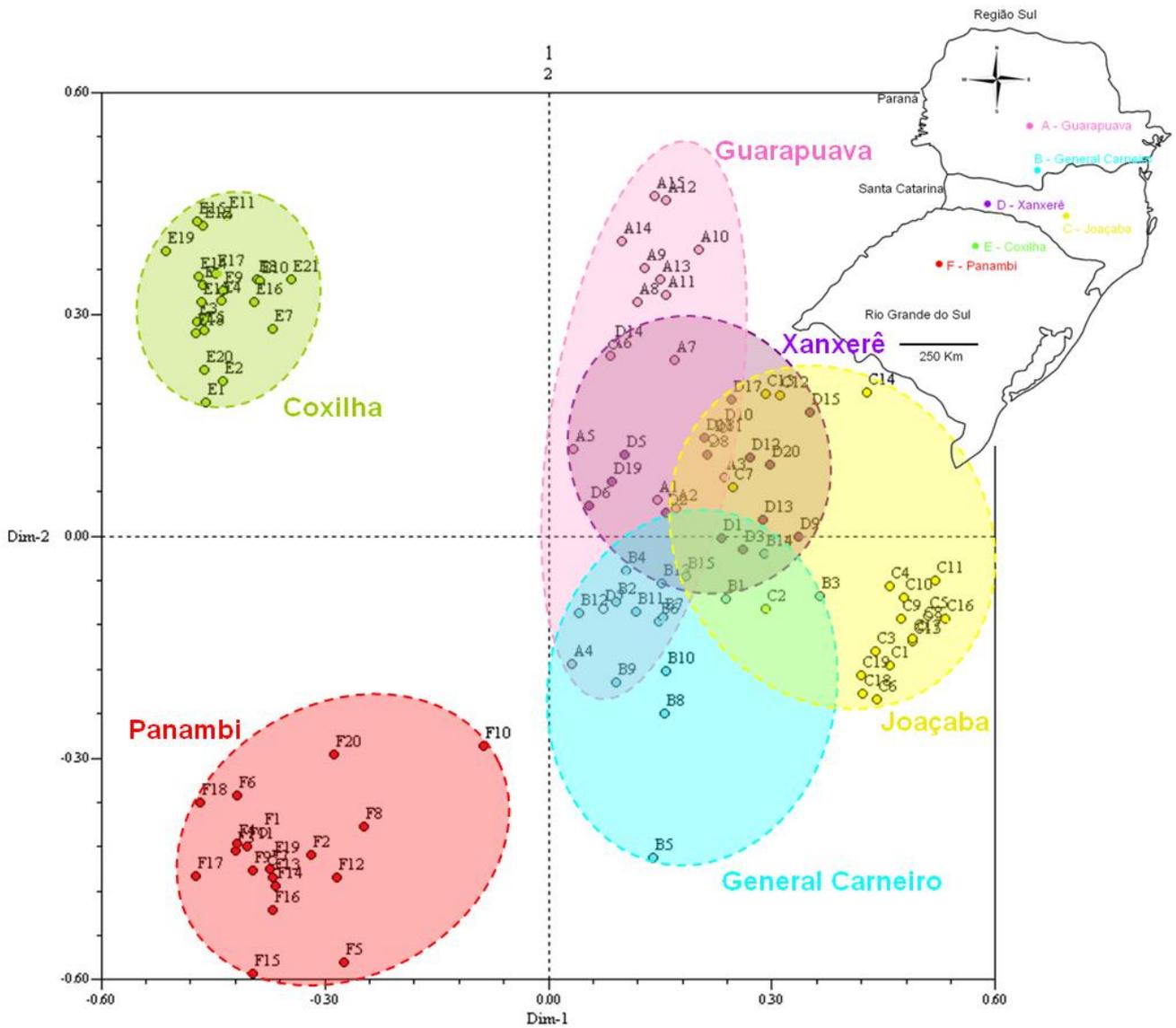
A partir da matriz da distância genética de Nei (1978), foi construído um dendrograma das populações de *B. crispa* pelo método UPGMA (Figura 6). Neste dendrograma houve a formação de três grupos de populações (A e D, B e C, E e F). Ainda, as duas populações do Rio Grande do Sul mostrou-se mais distante das demais (Figura 6). O teste de Mantel evidenciou correlação positiva entre a distância geográfica e a distância genética ( $r = 0,59$ ;  $P = 0,01$ ).



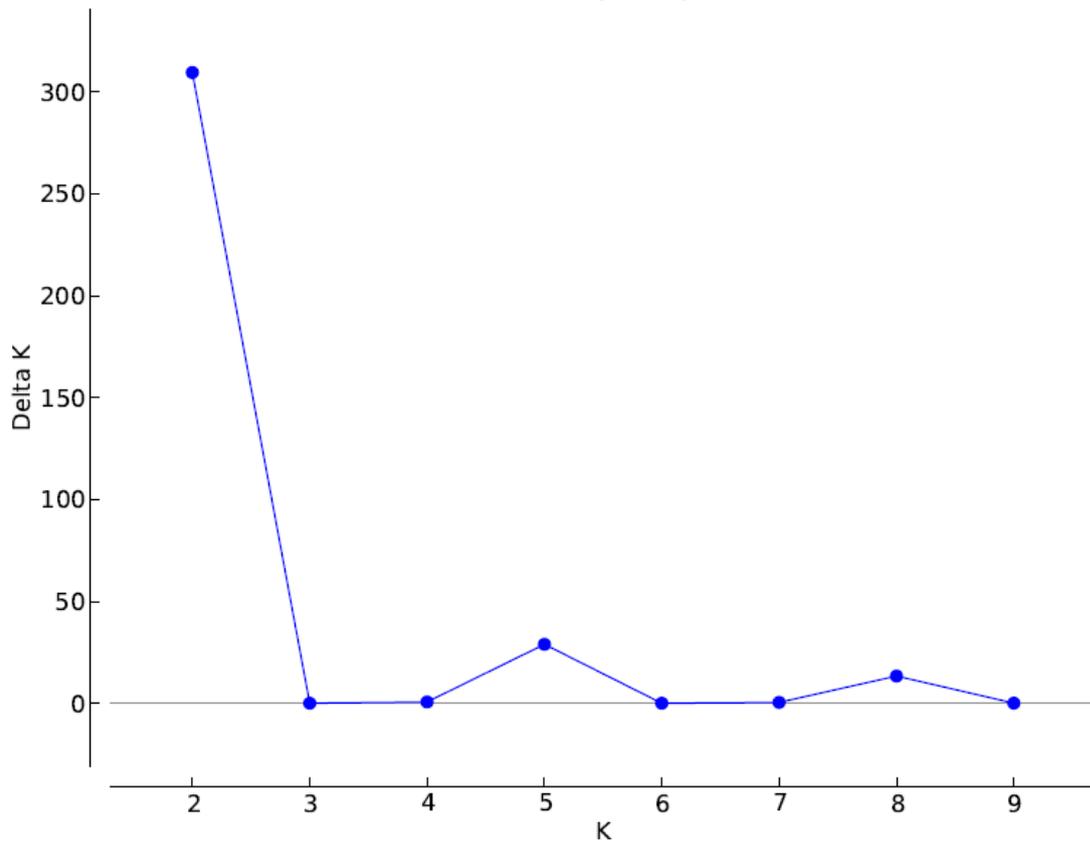
**Figura 6** - Dendrograma das populações de *Bacharis crispa* Spreng. coletadas no Sul do Brasil construído com base na distância genética de Nei (1978).

A análise de coordenadas principais (PCoA) reduziu a dimensionalidade dos dados e permitiu a observação da estrutura espacial das populações quanto a sua distribuição. Desse modo, as populações E e F apresentaram-se isoladas nos quadrantes 2 e 3. Já, as populações A, B, C e D apresentaram agrupadas nos quadrantes 1 e 4 (Figura 7).

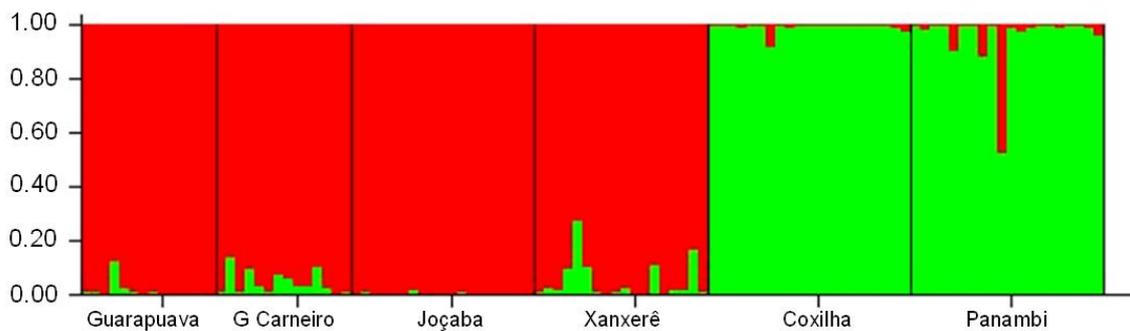
Nas simulações feitas pelo programa STRUCTURE com abordagem Bayesiana, o número de K (Clusters, grupos genéticos) foi definido como dois (Figura 8). A distribuição das seis populações nos grupos genéticos obtidos (Figura 8) demonstra que as populações A, B, C e D pertencem a um grupo genético e as populações E e F a outro grupo (Figura 9).



**Figura 7** - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) em populações de *Baccharis crispa* Spreng. da região Sul do Brasil.



**Figura 8** - Determinação do número ótimo de K (grupos genéticos) em *Baccharis crista* Spreng. pelo método Bayesiano. O ponto de intersecção entre o maior valor no eixo Y com o eixo X indica o número ótimo de K (grupos genéticos).



**Figura 9** - Estrutura genética das seis populações de *Baccharis crista* Spreng. coletadas no sul do Brasil de acordo com a divisão em dois grupos genéticos (K) obtidos pela análise Bayesiana.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Seleção de *primers* ISSR para estudos genéticos em *Baccharis crispa*

Dentre os 42 *primers* ISSR utilizados, 34 (80,9%) geraram fragmentos de qualidade. Em outros estudos com *primers* ISSR UBC em plantas da família Asteraceae, as porcentagens de amplificação foram variáveis, e relativamente baixos quando comparado aos resultados aqui obtidos. Em *Nouelia insignis*, 11% dos *primers* apresentaram amplificação (LUAN; CHIANG. GONG, 2006), em *Eremanthus erythropappus* 56,2% (PÁDUA, 2011), em *Flaveria bidentis* 21,7%, (MA et al, 2011), em *Aster spathulifolius* 7,3% (NGUYEN; CHOI; PARK, 2013) e em *Artemisia halodendron* 14% (HUANG et al, 2014). Estes dados demonstram que os resultados obtidos para *B. crispa* diverge com os de outras espécies disponíveis na literatura. Vale ressaltar que em nosso grupo, estamos trabalhando com ISSR em outras espécies e para a maioria delas a porcentagem de amplificação tem sido alta como, por exemplo, em *Campomanesia xanthocarpa* 50% (SILVA, 2012), *Ipomoea batatas* 83,3% (CAMARGO, 2013), *Eugenia uniflora* 58,3% (FAGUNDES, 2013), *Lolium multiflorum* 56% (BALDISSERA, 2014), *Achyrocline flaccida* 83,3% (ROSA, 2015). O que pode explicar estes nossos resultados discrepantes com os disponíveis na literatura é que para todos os *primers*/espécies são feitas padronizações da temperatura de anelamento, pois a temperatura descrita para um *primer* nem sempre é funcional para todas as espécies. Nos trabalhos citados não há menção desta padronização. Esta variação na porcentagem de amplificação indica que para cada espécie é necessário a padronização da temperatura de anelamento e uma seleção prévia dos *primers* para obtenção de melhores resultados e economia de recursos.

Conforme REDDY et al (2002), *primers* ISSR não ancorados se anelam em qualquer região do DNA, enquanto os ancorados se anelam em regiões específicas do DNA, produzindo bandas com boa resolução. Estes mesmos autores descrevem que *primers* não ancorados tendem a gerar géis sem boa resolução. Nossos dados vão de acordo com este autor uma vez que 50% dos

primers não ancorados não apresentaram produtos de amplificação em contrapartida de apenas 4% dos ancorados (Tabela 3).

A amplificação também depende da sequência que está sendo anelada. REDDY et al (2002) descrevem que *primers* ISSR com repetições (AG)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (CT)<sub>n</sub>, (TC)<sub>n</sub>, (AC)<sub>n</sub> e (CA)<sub>n</sub> são altamente polimórficos. Esta situação foi observada em nosso trabalho, pois 70% dos primers com estes tipos de repetições apresentaram elevado polimorfismo (Tabelas 3 e 4).

O índice de polimorfismo encontrado para a população de *B. crispa* aqui estudado foi de 90,9%. Os valores para o polimorfismo com marcadores ISSR variam dependendo da espécie, conforme observado em outros trabalhos disponíveis na literatura. Apesar de variável, estes valores tem sido alto, 80,8% em *Ipomoea batatas* (CAMARGO et al, 2013), 78,2% em *Flaveria bidentis* (MA et al, 2011), 81,2% no gênero *Carthamus* (MOKHTARI et al., 2013), 48,25% em *Viburnum treleasei* (MOURA et al, 2013), 65,61% em *Artemisia halodendron* (HUANG et al, 2014) e 75,7% em *Achyrocline flaccida* (ROSA, 2015). O grau de polimorfismo do marcador pode determinar a eficiência deste em identificar a variação genética dentro da espécie (GRATIVOL et al, 2011). Alguns autores tem utilizado a porcentagem de polimorfismo para estimar a variabilidade genética (JESUS et al 2001; NGUYEN; CHOI; PARK, 2013). Neste sentido é possível concluir que há alta variabilidade genética na população de *B. crispa* aqui avaliada.

Todos os *primers* ISSR identificados como melhores (Tabela 3) apresentaram valor de PIC acima de 0,30. O *primer* UBC 899 apresentou o maior valor de PIC (0,45). Visto que este índice, segundo Roldan-Ruiz et al (2000) representa a probabilidade de se encontrar o marcador em seus dois estados, de ausência e de presença. Para marcadores dominantes os valores de PIC variam de zero, para marcadores monomórficos, até 0,5 para aqueles que estiverem ausentes em metade da amostra e presentes na outra metade. Portanto, quanto mais próximo de 0,5, maior a eficiência do marcador, sendo ampla a sua possibilidade de uso para determinar a variabilidade genética.

Os valores de MI dos *primers* utilizados neste trabalho variaram de 4,87 (UBC 813) a 12,37 (UBC 860). Embora o *primer* UBC 860 tenha obtido o maior valor de MI, não foi selecionado neste trabalho pela quantidade reduzida de bandas produzidas, o que leva a um baixo RP. Não existe um valor máximo

estabelecido para MI (TATIKONDA et al, 2009), então os resultados devem ser comparados utilizando os dados gerados no trabalho em questão. A decisão em usar o MI foi por este levar em consideração um fator de correção de polimorfismo em seu cálculo (VARSHNEY et al, 2007), além de que este atributo apresentou uma alta correlação com PIC ( $r^2=0,73$ ,  $p < 0,005$ ). Altas correlações entre estes índices também foram observadas em *Jatropha curcas* ( $r^2=0,66$ ) (TATIKONDA et al., 2009), *Ipomoea batatas* ( $r^2=0,81$ ) e *Achyrocline flaccida* ( $r^2=0,76$ ) (ROSA, 2015).

Poder de resolução (RP) é uma medida que indica o poder discriminatório do marcador (TATIKONDA et al, 2009). Os valores de RP variaram de 2,2 (UBC 809) a 11,57 (UBC 899). Assim como o MI, não existe valor máximo para RP, visto que se trata de uma somatória de valores. Nota-se que o *primer* UBC 899 também apresentou valores altos em PIC e MI indicando que este marcador é muito informativo para *B. crispa*. As correlações entre os índices de PIC e RP e MI e RP foram de  $r^2=0,23$  e  $r^2=0,17$ , respectivamente. Estas correlações foram positivas, porém não significativas, devido ao fato de que não houve uniformidade no número de fragmentos amplificados e nem no polimorfismo apresentado pelos *primers*.

Foi observado que os *primers* que apresentam os melhores valores de RP apresentam também maior número de fragmentos. Isso acontece porque a fórmula utilizada para calcular estes índices leva em consideração a somatória dos valores de  $I_b$ . Assim, um *primer* que amplifique grande número de bandas tenderá a possuir maior RP do que outro que amplifique um menor número de bandas.

A avaliação dos dados de PIC, MI e RP permitiram selecionar os 15 *primers* mais informativos para estudos de diversidade genética em *B. crispa* (Tabela 3). Este número é considerado adequado, pois de sete a 30 *primers* que amplifiquem entre 50 e 200 fragmentos polimórficos são suficientes para estudos de diversidade genética dentro de espécies (COLOMBO et al, 1998).

A seleção dos *primers* mais adequados para estudos de genética de populações dependerá do objetivo do trabalho. RP é mais adequado para separar indivíduos geneticamente distintos dos demais, enquanto PIC é mais adequado para estimar a diversidade ampla em uma população. Neste sentido,

para seleção de *primers*, é recomendado a utilização destes dois índices em conjunto, respeitando os objetivos do trabalho.

## **6.2 Análise da Estrutura Genética em *Baccharis crispa* Spreng. da Região Sul do Brasil**

Estimar a variabilidade genética em populações naturais é um importante passo para o conhecimento de uma espécie. Informações do *status* genético podem ser utilizadas para vários fins, dentre eles podemos destacar predição de nível de conservação da espécie, auxílio na elaboração de estratégias de conservação e uso sustentável dos recursos genéticos disponíveis. A variabilidade genética é a matéria prima para a adaptação e, conseqüente evolução de uma espécie. Os dados aqui obtidos quando considerado indivíduos, mostra que há alta variabilidade genética em *B. crispa* e que suas populações estão estruturadas. Isto fica claro quando observamos os valores de similaridade genética entre indivíduos e entre as populações e os grupos no dendograma, que mesmo sem informar ao programa quais indivíduos era de cada população, os grupos foram formados por somente indivíduos da mesma população (Figura 3).

Esta alta variabilidade parece estar relacionada à biologia da espécie. Por *B. crispa* ser uma espécie pioneira e com propagação de sementes pelo vento e ocorrência em área abertas, esta parece se beneficiar de certos tipos de ação antrópica. Por exemplo, o desmatamento para implantação de pastagens abre novos espaços para a propagação da espécie que antes era restrito pela vegetação florestal existente. Isto leva a um aumento na área de ocorrência da espécie. Ainda, a carqueja é uma espécie com ampla distribuição e que se adapta a diversos ambientes. Espécies com este comportamento tendem a ter alta variabilidade genética (HAMRICK e GODT, 1996; RIVERS et al, 2011). A fragmentação florestal leva à geração de áreas abertas (principalmente pastagens), com diversas alterações no microclima, o que modifica a composição das espécies da área. Conforme TABARELLI; MANTOVANI; PERES (1999), plantas que tem o comportamento semelhante ao da carqueja, são favorecidas com as alterações do microclima gerado pela criação destes microhabitats. Estas condições estão presentes nas regiões

onde foram coletadas as populações de carqueja nos estados do Paraná e Santa Catarina. A capacidade de colonização de novas áreas fica mais clara ainda, quando observamos que os pecuaristas a consideram uma espécie invasora de pastagens. Estas observações fortalece a teoria que esta espécie se beneficia da transformação de florestas em áreas abertas expandindo sua área de ocorrência, aumentando suas populações o que pode levar a variação positiva da variabilidade genética destas populações. O que foi observado neste trabalho.

A avaliação da presença e ausência exclusiva de locos permitiu avaliar que estes variaram desde a presença exclusiva de três locos na população A até a ausência exclusiva de 19 locos na população F. Com base nestes dados, foi constatado que a presença exclusiva de locos e baixa ausência exclusiva parecem contribuir para maior variabilidade nas populações A, B e C (Tabela 5 e Figura 5). O que leva a sugerir que estas são populações mais antigas, pois carqueja é uma planta adaptada a áreas abertas e MAACK (2002) afirma que a região central do Paraná, tem como composição mais antiga a formação de campos. Neste sentido é possível que estas populações (do Paraná e Santa Catarina) poderem ter sido continuas a milhões de anos atrás e isto reflete na diversidade e similaridade destas populações na atualidade. Vale ressaltar que, com os marcadores utilizados neste trabalho, não é possível comprovar estas hipóteses, assim o uso de marcadores codominantes se faz necessário em estudos futuros com a espécie.

A ausência exclusiva de locos (Tabela 5 e Figura 5) demonstra que as populações E e F apresentam menor variabilidade genética. Estes dados destacam as diferenças entre as populações e a quantidade e a distribuição dos grupos de locos sugere um provável centro de diversidade para *B. crispata* no Paraná e Santa Catarina (Figura 5). É provável que nestas regiões haja populações antigas (presentes desde o último máximo glacial) e que estas tenham sofrido retração (durante o aquecimento e aumento de umidade após o último máximo glacial). Estes eventos levaram a diferenciação das populações e expansões (facilitado pelo desmatamento das florestas nos últimos 500 anos) que pode estar facilitando o fluxo gênico pelo sucessivo aumento das áreas de ocorrência da espécie nestas regiões. Ainda vale ressaltar que nas regiões onde foram coletadas as populações E e F no Rio Grande do Sul, também houve

ação antrópica (desmatamento), no entanto, nestas regiões foram implantadas áreas agrícolas, o que impede o desenvolvimento e expansão da espécie como aconteceu no Paraná e Santa Catarina, onde após o desmatamento foram implantados na sua maioria, pastagens.

Apesar da evidência observada de um provável centro de diversidade da espécie, com o tipo de marcador aqui utilizado (dominante) não podemos comprovar esta hipótese, assim trabalhos futuros utilizando marcadores codominantes poderão fornecer dados mais robustos capazes de confirmar a hipótese aqui proposta.

O índice de Shannon e a diversidade genética de Nei indicam alta variação genética entre as populações (Tabela 6). Outras Asteraceae arbustivas apresentaram resultados diferentes: *Proteopsis argentea*, planta endêmica da região de campos rupestres, apresentou o índice de Shannon maior, porém uma menor diversidade genética. Os autores concluíram que a espécie estava perdendo sua variabilidade genética (JESUS et al, 2001). *Flaveria bidens* também apresentou resultados semelhantes (MA et al, 2010). Já, a espécie *Aster spathulifolius* apresentou somente o índice de Shannon mais elevado (NGUYEN; CHOI; PARK, 2013). Por *B. crisper* ser uma espécie pioneira e com propagação de sementes pelo vento e ocorrência em áreas abertas, esta parece se beneficiar da ação antrópica, quando o efeito desta é a transformação de florestas em pastagens, ao contrário das espécies citadas acima. Estes resultados demonstram que a diversidade genética em plantas pode ser influenciada por diversas características de sua forma de vida (HAMRICK; GODT, 1989) e que os dados genéticos de uma espécie nem sempre podem ser extrapolados para outras espécies. Rosa (2015), trabalhando com *Achyrocline flaccida* oriundas das mesmas regiões onde foram coletadas as populações de *B. crisper* aqui estudadas, observou que diferente de Carqueja, na espécie por ela estudada há uma uniformidade da distribuição da diversidade genética entre as populações. A autora atribui isso a alto fluxo gênico observado que pode ser efeito da conectividade das populações no passado (quando os campos eram vastos pelo sul do Brasil) e também pela ação antrópica (as inflorescências da espécie são utilizadas como medicinal pela população, amplamente comercializadas no Sul do Brasil, e ainda com sementes viáveis). Interessante que esta autora também observou

que as populações potencialmente mais recentes e isoladas por áreas agrícolas também apresentaram baixa diversidade.

A distância genética de Nei (Tabela 9) apresentou grande amplitude de variação, 0,07 a 0,21. Demonstrando diferenciação entre as populações. Esta diferenciação está diretamente relacionada à distância geográfica das populações, pois a correlação obtida pelo teste de Mantel entre a matriz de distância genética e a matriz de distância geográfica foram positivas e significativas. Assim, as populações estão estruturadas no espaço geográfico, havendo fluxo gênico restrito pela distância geográfica.

Segundo Loveless e Hamrick (1984) se o fluxo gênico for restrito, as populações apresentam alta divergência. O valor observado neste trabalho (0,89) demonstrou que entre as seis populações estudadas o fluxo gênico é restrito. Este valor não é suficiente para contrapor os efeitos da deriva genética. Pois, conforme Hart e Clark (1997) e Slatkin (1987), para que o efeito homegeinizador do fluxo gênico se sobreponha a deriva gênica, este valor deveria ser maior do que quatro migrantes por geração.

Contudo, analisando as populações com seu par mais próximo, verifica-se que o fluxo gênico aumenta. As populações A e D obtiveram o maior valor de  $N_m$ , seguidas das populações B e C, e também a menor distância genética. Em geral, o menor valor de  $N_m$  e a maior distância genética foram observados entre as populações mais distantes (Tabela 8 e Tabela 9). O dendrograma construído com base na distância genética de Nei (Figura 6) fortalece a observação de relação direta entre fluxo gênico, distância geográfica e distância genética.

O alto valor encontrado de  $F_{st}$  corrobora com a grande divergência entre as populações sugerindo que as populações estão sofrendo ação da deriva genética pelo restrito fluxo gênico, devido ao isolamento por distância.

A maior variação encontrada dentro das populações deve-se ao fato da carqueja ser uma planta alógama (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006). Esta variabilidade encontrada também pode ser explicada pela forma de reprodução da planta, a polinização ocorrer principalmente por abelhas, à dispersão de sementes ser pelo vento e se tratar de uma espécie ruderal e pioneira (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006).

A maior variação dentro das populações também pode estar associada a espécies que, como a carqueja, possuem heterogeneidade ambiental (ZHANG et al, 2015). O fluxo gênico envolvendo sementes e pólen também pode colaborar para a maior variação dentro das populações. Outras Asteraceae descritas como alógamas como *Proteopsis argentea* (JESUS et al, 2000), *Nassauvia argentea* (GREEN et al, 2012), *Viburnum treleasei* (MOURA et al, 2013) e *Artemisia halodendron* (HUANG et al, 2014) também apresentaram variação maior dentro do que entre as populações.

Os indivíduos de *B. crispa* neste estudo foram claramente divididos em dois grupos genéticos pelas análises geradas pelo PCoA e STRUCTURE (Figura 8 e 9). As populações pertencentes aos estados do Paraná e Santa Catarina apresentam maior variabilidade e diversidade genética, além de compartilharem mais características genéticas quando comparadas as populações do Rio Grande do Sul. O fluxo gênico observado e as condições de conservação das regiões onde foram coletadas as populações podem auxiliar no entendimento deste agrupamento, existindo duas possibilidades para explicar a formação destes dois grupos.

Primeiramente, as populações do Paraná e Santa Catarina provavelmente não são populações isoladas, pois experimentaram e ainda mantêm certo grau de fluxo gênico, fazendo que estas sejam mais homogêneas formando um único grupo genético. Isso é devido pelo fato da espécie apresentar características que facilitam sua dispersão: o pequeno tamanho das sementes e a presença papus, estrutura que facilita a dispersão pelo vento. Além disso, por se tratar de uma espécie pioneira, ruderal e que se favorece na ocupação de áreas abertas, principalmente em pastagens, são fatores que levam *B. crispa* a apresentar uma ocorrência contínua em uma grande área e, historicamente, havia uma grande faixa de campo que se estendiam por estes dois estados. Já as populações do Rio Grande do Sul apresentam esta divergência na composição genética possivelmente devido ao vale do Rio Uruguai. Este compõe uma barreira à continuidade genética destas populações, pois no período em que o clima era as faixas de campos. Então o rio se caracteriza como um delimitador, impedindo o fluxo gênico entre estas populações.

Existe também a possibilidade da recente ação antrópica estar interferindo neste agrupamento. Como as populações do Paraná e Santa Catarina estão em regiões de pastagens, e como já foi descrito a espécie se adapta a estas condições, sendo até considerada invasora destes ambientes, formando um ambiente contínuo de pastagens. Favorecendo a dispersão de sementes e de polen, aumentando o fluxo gênico entre estas populações. Ao contrário, as populações do Rio Grande do Sul, devido ao isolamento por áreas agrícolas, tem sofrido drástica redução do tamanho populacional, baixo fluxo gênico e conseqüente perda de variabilidade genética. Sofrendo os efeitos da endogamia.

A análise conjunta dos resultados obtidos neste estudo mostra que há alta variabilidade genética em *B. crispa* e que as regiões do Centro-Sul do Paraná (Região de Guarapuava General Carneiro) e Meio-Oeste de Santa Catarina (Região de Joaçaba e Campos Novos). Estes resultados corroboram com Müller (2006), que aponta as regiões montanhosas do sul e sudeste do Brasil como uma das áreas de diversidade do gênero. Porém, como ISSR é um marcador dominante, não fornece dados filogeográficos, não se pode inferir a respeito de centro de diversidade da espécie.

Os dados obtidos neste trabalho são inéditos para *B. crispa* e contribuirão para a compreensão dos aspectos históricos evolutivos da espécie e para auxiliar no desenvolvimento de estratégias para o cultivo sustentável e/ou conservação da espécie se necessário.

## 7. CONCLUSÕES

- A seleção e conseqüentemente uso de um menor número de *primers* ISSR é vantajosa por reduzir o tempo e o custo das análises, mantendo a eficiência dos testes;
- Marcadores moleculares ISSR são eficientes para estudo de genética de populações em *Baccharis crispa*;
  - A espécie apresenta alta diversidade genética e estruturação populacional;
  - As populações das regiões do Centro-Sul do Paraná (Região de Guarapuava General Carneiro) e Meio-Oeste de Santa Catarina (Região de Joaçaba e Campos Novos) apresentaram maior diversidade que as populações do Rio Grande do Sul (Coxilha e Panambi);
  - O isolamento de populações de *B. crispa* por áreas agrícolas parece interferir negativamente na variabilidade.

## 8. REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. N. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos da América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. **Paleoclimas**. n.3, p.1–19, 1977.
- AGRA, M. F., FRANÇA, P. F., BARBOSA-FILHO, J. M. Resumos das plantas conhecidas como medicinais no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. n.117, p.114-140, 2007.
- ALMEIDA, D.J.; FARIA, M.V.; DA SILVA, P.R. Effect of forest fragmentation on microsporogenesis and pollen viability in *Eugenia uniflora*, a tree native to the Atlantic Forest. **Genetics and Molecular Research**. v.11, p. 4245-4255, 2012.
- AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese, e variabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.] do Rio Grande de Sul e Santa Catarina. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.8, n.2, p. 55-63, 2006.
- ARCHIBALD, J. K.; CRAWFORD, D. J.; SANTOS-GUERRA, A.; MORT, M. E. The utility of automated analysis of inter-simple sequences repeat (ISSR) loci for resolving relationships in the Canarian Island species of *Tolpis* (ASTERACEAE). **American Journal of Botany**. v.93, n.83, p.1154-1162, 2006.
- BALDISSERA, G. **Seleção de primers ISSR para estudos genéticos em Azevem (*Lolium multiflorum*)**.2014. 29p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso). Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual do Centro-Oeste.
- BARROSO, G. M.; BUENO, O. L. **Compostas Subtribo: Baccgaridinae**. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí. 2002.
- BEHLING, H. South and southeast Brazilian grassland during late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v.177, p.19-27, 2002.
- BIONDO, T. M. A.; TANAE, M. M.; COLETTA, E. D.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**. n.136, p. 368-373, 2011.
- BORELLA, J. C., DUARTE, D. P., NOVARETTI, A. A. G., MENEZES Jr, A., FRANÇA, S. C., RUFATO, C. B., SANTOS, P. A. S., VENEZIANI, R. C. S.,

BRASIL. Ministério do Medio Ambiente. Mata Atlântica. 2012. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: maio de 2013.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Análise morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *B. trimera* (Less.) DC., Asteraceae. **Brazilian Journal of Phamaceutical Science**. v.45, n.1, p.75-86, 2009.

CAMARGO, L. K. P.; MORGOR, A. F.; RESENDE, J. T. V; DA SILVA, P. R.; Establishment and molecular characterization of a sweet potato germplasm bank of the highlands of Paraná State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**. v.4,n.12, p.5574-5588, 2013.

CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M.J.; HADDAD, C. F. B., RODRIGUES, M. T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. **Science**. n.323, p.785–789, 2009.

CASTRO, H.G.; FERREIRA, F. A. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: carqueja (*Baccharis genistelloides*)**. Viçosa: UFV, 2000. 102 p.

CASTRO, H.G.; SILVA, D. J. H.; FERREIRA, F. A.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I. Estabilidade da divergência genética em seis acessos de carqueja. **Planta Daninha**. v.20, n.1, p. 33-37, 2002.

COLOMBO, C. ET AL. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) with RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**. v.21, n.1, p.105-113, 1998.

CORRÊA Jr., C; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. **Cultivo agroecológico de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário. 2006. 75p.

CORTESI, P.; MAZZOLENI, A.; PIZZATTI, C.; MILGROOM, M.G. Genetic similarity of flag shoot and ascospore subpopulations of *Erysiphe necator* in Italy. **Applied and Environmental Microbiology**. 71:7788–7791. 2005

DIAS, L. F. T.; MELO, E. S. de; HERNANDES, L. S.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v1b, n.19, p.309-314, 2009.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

EARL, D.A.; VONHOLD, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v.4, n.2, p.359-361, 2012.

EMBRAPA/IBAMA. Estratégias para conservação e manejo de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas. **Resultados da 1º reunião técnica**. EMBRAPA/IBAMA, Brasília, 2002.

ESCUADERO, A.; IRIONDO, J. M.; TORRES, M. E.; Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. **Biological Conservation**. n.113, p.351-365, 2003.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p.2611-2620, 2005.

EXCOFFIER L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER S. ARLEQUIN: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

FACHINETTO, J. M. TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema de teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p.360-367, 2009.

FAGUNDES, B. S. **Estrutura genético-populacional de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) em fragmentos florestais de mata atlântica**. 2013. 46p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva. Universidade Estadual do Centro Oeste.

FALEIRO, F.G. **Marcadores Genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2007.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3a. Ed. Brasília: CNARGEM-EMBRAPA, 1998, 220p.

GEORGE, S.; SHARMA, J.; YADON, V. L. Genetic diversity of the endangered and narrow endemic *Piperia yadoni* (Orchidaceae) assed with ISSR polymorphisms. **American Journal of Botany**. v.11, n.96, p.2022-2030, 2009.

GRATIVOL, C.; MEDEIROS, C. F. L.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular**. v.38, p.4245–4256, 2011.

GREEN, E. C.; TREMESTSBERGER, K.; JIMENEZ, A.; GOMES-GONZALEZ, S.; STUESSY, T. F.; BAEZA, C. M.; LOPEZ, P. G. Genetic diversity of pioneer populations: the case of *Nassauvia argentea* (Asteraceae: Mutisiae) of Vólcan Lonquimay, Chile. **Plant Systematics and Evolution**. n.298, p.109-119, 2012.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**. n.165, p.131-137, 1969.

HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. **Plant population genetics, breeding, and germplasm resources**. Sinauer Associates, Sunderland, p. 43–63, 1989.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer associates, 3<sup>rd</sup>ed. 542p, 1997.

HASSEL, K.; SASTAD, S. M.; GUNNARSSON, U.; SODERSTROM, L. Genetic variation and structure in the expanding moss *Pogonatum dendatum* (Polytrichaceae) in its area of origin and in a recently colonized area. **American Journal of Botany**. v.92, n.10, p.1684-1690, 2005.

HEIDEN, G.; IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V. L.; MACIAS, L. Biogeografia de *Baccharis* sect. *Caulopterae* (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**. v.4, n.58, p.787-796, 2007.

HEIDEN, G.; MEIRELES, G. D.; A new dwarf shrubby species of *Baccharis* subg. *Baccharis* (Asteraceae, Astereae) from southeastern Brazil. **Brittonia**. v.3, n.62, p.215-218, 2010.

HUANG, W., ZHAO, X., ZHAO, X., LI, Y., LIAN, J., YUN, J. Relationship between the genetic diversity of *Artemisia halodendron* and climatic factors. **Acta Oecologica**. n.55, p.97-103, 2014.

HUGALL, A.; MORITZ, C.; MOUSSALI, A.; STANISIC, J. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosiphia bellendenkerensis* (Brazier 1875). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. n.99, p.6112–6117, 2002.

ISSHIKI, S.; IWATA, N.; KHAN, M. M. R. ISSR variations em eggplant (*Solanum melongena* L.) and related *Solanum* species. **Scientia Horticulturae**. n.117, p.186-190, 2008.

JESUS, F. F.; SOLFERINI, V. N.; SEMIR, J.; PRADO, P. I. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. **Plants Systematics and Evolution**. n.226, p. 59-68, 2001.

LÁZARO, S. F.; FONSECA, L. D.; MARTINS, E. R.; OLIVEIRA, N. J. F. de; DUARTE, E. R. Effect of aqueous extracts of *Baccharis trimera* on development and hatching of *Rhipicephalus microplus* (Acaridae) eggs. **Veterinary Parasitology**. n.194, p.79-82, 2013.

LITT, M.; LUTY, J.A. A hypervariable microsatellite revealed by in intro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, n.44, p.398-401, 1989.

LOVELLES, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**. v.15, p.65-95, 1984.

LUAN, S.; CHIANG, T; GONG, X. High genetic diversity vs. Low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, Revealed by ISSR fingerprint. **Annals of Botany**. n.98, p.583-589, 2006.

LUDTKE, R.; AGOSTINI, G.; MIOTTO, S. T. S.; SOUZA-CHIES, T. T. Characterizing *Polygala* L. (Polygalaceae) species in southern Brazil using ISSR. **Plant Molecular Biology Report**. n.28, p. 317-323, 2010.

MA, J. W.; GENG, S. L.; WANG, S. B.; ZHANG, G. L.; FU, W. D.; SHU, B. Genetic diversity of the newly invasive weed *Flaveria bidentis* (Asteraceae) reveals consequences of its rapid range expansion in northern China. **Weed Research**. n.51, p.363–372, 2011.

MAACK, R. **Geografia Física do Paraná**. 3<sup>o</sup>ed. Curitiba: Imprensa Oficial, 438p.2002.

MANICA-CATANI, M. F.; ZACARIA, J.; PAULETTI, G.; ATTI-SERAFINI, L.; ECHEVERRIGARAY, S. Genetic variation among South Brazilian accessions os *Lippia alba* Mill. (verbanaceae) deteced by ISSR and RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**. v.2, n.69, p.375-380, 2009.

- MARTINS, F. M. Historical biogeography of the Brazilian Atlantic Forest and the Carnaval-Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? **Biological Journal of the Linnean Society**. n.104, p.499-509, 2011.
- MELO JR., A. F. de; CARVALHO, D. de; VIEIRA, F. A.; OLIVEIRA, D. A. de; Spatial genetic structure in natural populations of *Caryocar brasiliense* Camb. (Caryocaraceae) in the North of Minas Gerais, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**. n.43, p.205-209, 2012.
- MOKHTARI, N., RAHIMMALEK, M., TALEBI, M., KHORRAMI, M. Assessment of genetic diversity among and within *Carthamus* species using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. **Plant Systematics and Evolution**. n.299, p.1285-1294, 2013.
- MOURA, M., SILVA, L., CAUJAPÉ-CASTELLS, J. Population genetics in the conservation of the Azorean shrub *Viburnum treleasei* Gand. **Plant Systematics and Evolutions**. n.299, p.1809-1817, 2014.
- MORALES, R. G. F.; RESENDE, J. T. V.; FARIA, M. V.; ANDRADE, M. C.; RESENDE, L. V.; DELATORRE, C. A.; DA SILVA, P. R. Genetic similarity among strawberry cultivars assessed by RAPD and ISSR markers. **Scientia Agrícola**. v.68; n.6, p.665-670, 2011.
- MÜLLER, J. Systematics of *Baccharis* (Compositae-Astereae) in Bolivia, including an overview of the genus. **Systematic Botany Monographs**. n.76, p.1-341, 2006.
- NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Madison. v.89, n.3, p. 586-590, 1978.
- NGUYEN, H. T. T.; CHOI, K. S.; PARK, S. J. Genetic diversity and differentiation of a narrowly distributed and endemic species, *Aster spathulifolius* Maxim (Asteraceae), revealed with inter simple sequence repeat markers. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**. v.56, n.3, p.255-262, 2013.
- PRITCHARD, J.K.; WEN, X.; FALUSH, D. Documentation for structure software. Version 2.3. **University of Chicago**, Chicago, USA. 2010.
- OLIVEIRA, A. C. P.; ENDRINGER, D. C.; AMORIM, L. A. S.; BRANDÃO, M. das G. L.; COELHO, M. M.; Effect of the extracts and fractions of *Baccharis*

*trimer* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**. n.102, p.465-469, 2005.

OLIVEIRA, R. N. de; REHDER, V. L. G.; OLIVEIRA, A. S. S.; MONTANARI Jr, I.; CARVALHO, J. E. de; RUIZ, A. L. T. G. de; JERALDO, V. L. S.; LINHARES, A. X.; ALLEGRETTI, S. M.; *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (Less) DC. **Experimental Parasitology**. n.1132, p.135-143, 2012.

PALÁCIO, C. P. A. M., BIASI, L. A., NAKASHIMA, T., SERRAT, B. M. Biomassa e óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* (Less) DC.) sob influência de fontes e doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.9, n.3, p.58-63, 2007.

PAVAN-FRUEHAUF, S. **Plantas medicinais de mata atlântica**: manejo sustentado e amostragem. São Paulo: Annablume/Fapesp, 2000. 216p.

PATERSON, I. D., ZACHARIADES, C. ISSRs indicate that *Chromolaena odorata* invading southern Africa originates in Jamaica or Cuba. **Biological Control**. n.66, p.132-139, 2013.

PHARMAWATI, M.; YAN, G.; FINNEGAN, P. M. Molecular variation and fingerprint of *Leucadendron* cultivars (Proteaceae) by ISSR markers. **Annals of Botany**. n.95, p.1163-1170, 2005.

POCZAI, P.; MÁTYÁS, K. K.; SZABÓ, I.; VARGA, I.; HYVONEN, J.; CERNÁK, I.; GORJI, A. M.; DECSI, K.; TALLER, J. Genetic variability of thermal *Nymphaea* (Nymphaeaceae) populations based on ISSR markers: implications on relationships, hybridization, and conservation. **Plant Molecular Biology Reports**. n.29, p.906-918, 2011.

PREVOST, A., WILKINSON, M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars, **Theoretical Applied Genetics**. n.98, p.107–112, 1999.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter Sample Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**. n.128, p.9-17, 2002.

REFLORA: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 02 Nov. 2014

- RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M.; The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**. n. 142, p.1141-1153. 2009.
- RIVERS, M.C., BRUMMITT, N.A., LUGHADHA, E.N., MEAGHER, T.R. Genetic variation in *Delonix s.l.* (Leguminosae) in Madagascar revealed by AFLPs: fragmentation, conservation status and taxonomy. **Conservation Genetics**. n.12, p.1333-1344, 2011.
- ROHLF, F. J. NTSYSpc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.2. 2000.
- ROLDAN-RUIZ, I., DENDAUW, J., VANBOCKSTAELE, E., DEPICKER, A., DE LOOSE, M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**. n.6, p.125–134, 2000.
- ROSA, J da. **Estrutura genética-populacional da planta medicinal *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. baseada em marcadores ISSR**. 2015. 58p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva. Universidade Estadual do Centro Oeste.
- SANKAR, A.A.; MOORE, G.A. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in Citrus and extension of genetic linkage map. **Theoretical and Applied Genetics**. n.102, p.206–214, 2001.
- SCHNEIDER, A. A. **Estudo taxonômico de *Baccharis* L. sect. *Caulopterae* DC. (Asteraceae:Asterae) no Brasil**. 2009, 203p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- SILVA, L. F. da. **Diversidade genética em populações de *Campomanesia xanthocarpa* Berg. oriundas de fragmentos da mata atlântica**. 2013. 69p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva. Universidade Estadual do Centro Oeste.
- SILVA, D. C. M. N.; BRESCIANI, L. F. V.; DALAGNOL, R. L.; DANIELSKI, L.; YUNES, R. A.; FERREIRA, S. R. S. Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: Process parameters and composition profiles. **Food and Bioproducts Processing**. n.87, p.317-326, 2009.
- SILVA, F. G.; OLIVEIRA, C. B. A.; PINTO, J. E. B. P., NASCIMENTO, V. E., SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C., FERRI, P. H. Seasonal Variability in the

Essential Oils of Wild and Cultivated *Baccharis trimera*. **Journal Brazilian of the Chemistry Society**. v.18, n.5, p.990-997, 2007.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**. n.236, p.787-792, 1987.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W.; PERES, C.A. Effects of habitat fragmentation on plant guild structure in the montane Atlantic forest of southeastern Brazil. **Biology Conservation**, n.91, p.119-127, 1999.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica Brasileira. **Megadiversidade**. v.1, n.1, p.132-138, 2005.

TACUATIÁ, L. O.; EGGERS, L.; KALTCHUK-SANTOS, E.; SOUZA-CHIES, T. T.; Population genetic structure os *Sisyrinchium micrathum* Cav. (Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v.1, n.35, p.99-105, 2012.

TATIKONDA, L.; WANI, S. P.; KANNAN, S.; BEERELLI, N.; SREEDEVI, T. K.; HOISINGTON, D. A.; DEVI, P.; VARSHNEY, R.K. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. **Plant Science**. n.176, p. 505–513, 2009.

TANYA, P.; TAEPRAYOON, P.; HADKAM, Y.; SRINIVES, P.; Genetic diversity among jatropha and jatropha-related species based on ISSR markers. **Plant Molecular Biology Report**. n.29, p.252-264, 2011.

TEMPLETON, A. R.; SHAW, K.; ROUTMAN, E.; DAVIS, S. K.; The genetic consequences of habitat fragmentation. **Annals of the Missouri Botanical Garden**. n.77, p.13-27, 1990.

TORRES, L. M. B.; GAMBERINI, M. T.; ROQUE, N. F.; LIMA-LANDMAN, M. T.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J.; Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**. n.55, p.617-619, 2000.

VARSHNEY, R.K; CHABANE, K; HENDRE, P.S; AGGARWAL, R.K; GRANER, A. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation os genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. **Plant Science**, v.173, p.628-649, 2007.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T., HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU,

M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, n.21, p.4407-4414. 1995.

YAMAN, H., TARIKAHYA-HACIOGLU, B., ARSLAN, Y., SUBASI, I. Molecular characterization of the wild relatives of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) in Turkey as revealed by ISSRs. **Genetic Resources Crop Evolution**. n.61, p.595-602, 2014.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T. POPGENE: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Version 1.31. **University of Alberta, Canada and Centre for International Forestry Research**, Canada, 1999.

YOUNG, A.; BOYLE, T. J. Forest fragmentation. *In*: YOUNG, A.; BOSHIER, D.; BOYLE, T. J. **Forest conservation genetic: principles and practice**. Melbourne: CSIRO. p.123-135, 2000.

WILLIAMS, J.G; KUBELIK, A.R; LIVAK, K.J; RAFALSKI, L.A; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, n.18, p.6531- 6535, 1990.

ZHANG, X., CHEN, G., MA, Y., GE, J. SUN, W. Genetic diversity and population structure of *Bunddleja crispera* bentham in the Himalaya-Hengdyan Mountains region revealed by AFLP. **Biochemical Systematics and Ecology**. n.58, p.13-20, 2015.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D.; Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**. n.20,p.176–183,1994.