



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE - UNICENTRO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS - SEAA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA PPGBIOEVOL
Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO

LAURA PILATI

**HISTÓRIA EVOLUTIVA DE *Achyrocline flaccida* (WEINM.) DC. NO SUL DA MATA
ATLÂNTICA**

GUARAPUAVA
2020

LAURA PILATI

HISTÓRIA EVOLUTIVA DE *Achyrocline flaccida* (WEINM.) DC. NO SUL DA MATA ATLÂNTICA

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

2020

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

P637h Pilati, Laura
História evolutiva de *Achyrocline flaccida* (Wein.) dc. No sul da Mata Atlântica / Laura Pilati. -- Guarapuava, 2020.
ix, 45 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, área de concentração em Biologia Evolutiva, 2020.

Orientador: Paulo Roberto da Silva
Banca examinadora: Claudete Aparecida Mangolim, Rogério Pincela Mateus

Bibliografia

1. Ciências biológicas. 2. Filogeografia. 3. Barreira Geográfica. 4. DNA Cloroplastidial. 5. DNA Nuclear. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva.

| CDD 590

LAURA PILATI

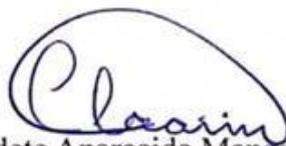
“História evolutiva de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. no sul da Mata Atlântica”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva”, no Programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Centro-Oeste, pela comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Paulo Roberto Da Silva

(Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO)



Profa. Dra. Claudete Aparecida Mangolim

(Universidade Estadual de Maringá - UEM)



Prof. Dr. Rogério Pinçola Mateus

(Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO)

Guarapuava, 18 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida: minha mãe Adriani, meu pai Clodoaldo e meus avós Maria Helena e Vasco!

AGRADECIMENTOS

À Deus e a minha Nossa Senhora Aparecida, por todas as bênçãos, pela minha vida e da minha família. Obrigada por me guiarem e me mostrarem sempre o melhor caminho a seguir.

Aos meus pais, Clodoaldo e Adriani, pelo amor incondicional, por todos os ensinamentos e incentivos para que eu me torne uma pessoa melhor. Muito obrigada por serem a minha fortaleza e conforto nas dificuldades e meus companheiros e amigos, acima de tudo. Não existem palavras suficientes para expressar o tamanho do meu amor e gratidão, sem vocês eu não seria nada.

Aos meus avós, Vasco e Mari, por sempre serem tão cuidadosos e por me darem o maior amor e carinho do mundo. Especialmente à minha avó, por interceder por mim, pelas velas acesas e orações em todo e cada momento importante e estar sempre presente na minha vida.

Ao meu namorado e melhor amigo, Sharles, você faz meus dias mais felizes, traz paz e alegria para a minha vida. Obrigada por me acalmar e ajudar nos momentos difíceis, por todo companheirismo e ajuda sempre que preciso. Agradeço por acreditar em mim e dividir sua vida comigo.

Ao professor Paulo Roberto, pois se não fosse você, talvez eu não tivesse chegado até aqui. Obrigado por, ainda em 2013, quando eu estava no Ensino Médio, me apresentar a biologia, a genética, o nosso laboratório tão querido e a pesquisa. Muito obrigada por todos os ensinamentos científicos e pessoais, repreensões, conselhos, viagens para congressos.

A todos os colegas que dividiram a vida no laboratório comigo durante esses 6 anos, em especial Cláudia, Daiane, Yuri, Felipe, Pamela, Bárbara, Jhonnatan, Letícia e principalmente às minhas meninas Gabriela, Bruna, Jéssica e Léia, obrigada por tudo.

À Gabriela Gomes Weber, que de colega de laboratório, em 2014, tornou-se uma irmã. Obrigada por compartilhar dias de laboratório, viagens, momentos felizes e tristes comigo, você torna tudo mais especial. Agradeço por tudo que já me ensinou e ajudou, você faz parte desse trabalho.

Às minhas amigas da vida, Caroline, Camila, Bárbara e Mariana, que apesar da distância física, estão sempre presentes na minha vida, torcendo, incentivando e me apoiando em todos os momentos. Obrigada por estarem comigo ao longo desses 17 anos de amizade, vocês são fundamentais.

À minha amiga Letícia Parteka, que esteve junto comigo durante a graduação e mestrado. Obrigada por toda a ajuda e amizade ao longo desses anos, tudo se torna mais fácil quando estamos juntas.

À Universidade Estadual do Centro-Oeste, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva e a todos os meus professores por proporcionarem minha formação.

À CAPES pela bolsa concedida.

À todas as pessoas que fazem parte da minha vida e que contribuíram de alguma forma, meu muito obrigada!

“Vamos viver nossos sonhos, temos tão pouco tempo”.

Charlie Brown Jr.

RESUMO

História evolutiva de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. no sul da Mata Atlântica. Laura Pilati. A Mata Atlântica (MA) é um dos biomas mais biodiversos do país devido, em parte a sua grande amplitude de latitude. Esta variação possibilita diferentes nichos moldados por diferentes condições climáticas. Uma das fitofisionomias da região sul da MA é a Floresta Ombrófila Mista que ocorre em associação com áreas de Campos Naturais. Estudos filogeográficos com espécies das regiões centrais e norte da MA demonstram que as oscilações climáticas dos períodos glaciais do Pleistoceno influenciaram no padrão de distribuição e estruturação das espécies. No sul da MA durante as últimas eras glaciais, as condições climáticas parecem ter favorecido a expansão das áreas campestres, em contrapartida, as florestas de Araucária ficaram restritas à refúgios nos vales dos rios. Trabalhos tem mostrado que os rios e seus vales tem atuado como barreiras geográficas na estruturação das espécies. Na literatura são escassos os estudos relacionados com a história evolutiva de espécies adaptadas a condições de clima mais frio que ocorre nas regiões do sul da MA, assim como, o papel dessas possíveis barreiras na expansão dessas populações. *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. popularmente conhecida como Macela, é uma espécie amplamente distribuída nos campos do sul da MA e adaptada ao clima frio, portanto, a avaliação da estrutura genética de suas populações pode fornecer dados importantes sobre a influência das oscilações climáticas do Pleistoceno, na estrutura dessas populações, bem como, contribuir para o entendimento da história evolutiva da vegetação da MA. Neste estudo foram avaliadas oito populações de *A. flaccida* coletadas na região sul da MA, sendo quatro delas coletadas ao norte do vale do rio Uruguai e quatro ao sul. Foram sequenciadas as regiões cloroplastidiais intergênicas *trnL-trnF* e *psbA-trnH* e a região do DNA nuclear (nDNA) ITS 4 e 5. As sequências concatenadas para as duas regiões cloroplastidiais geraram um fragmento de 1264 pb e a análise de todas as sequências obtidas identificou 61 haplótipos. As sequências de nDNA foram de 674 pb e geraram 47 ribotipos. As populações apresentaram alta diversidade nucleotídica e haplotípica. Os testes de neutralidade e *Bayesian Skyline Plot* evidenciaram que houve uma discreta expansão populacional, em um período de clima mais frio, durante o Penúltimo Máximo Glacial (210-140 mil anos atrás), seguida de estabilidade no tamanho populacional até o Holoceno. As significâncias estatísticas dos índices SSD e H_{RAG} não validaram o padrão multimodal apresentado pelos gráficos de distribuição *mismatch*, corroborando com a expansão populacional observada por volta de 200 mil anos atrás. Foi observada alta estrutura filogeográfica para *A. flaccida* e elevado número de haplótipos e ribotipos exclusivos nas populações ao norte e ao sul do vale do rio Uruguai. Todos os dados obtidos corroboram que o vale do rio Uruguai pode ter atuado como uma barreira geográfica limitando o fluxo gênico entre as populações de Macela do sul da MA. Ainda, a alta diversidade das populações e a estabilidade populacional durante o Pleistoceno evidencia, assim como observado para outras espécies, a existência de grandes áreas de ocorrência de espécies de clima frio no Sul do Brasil durante os últimos períodos glaciais.

Palavras-chave: Filogeografia; Barreira Geográfica; DNA Cloroplastidial; DNA Nuclear.

ABSTRACT

Evolutionary history of *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. in the south of the Atlantic Forest. Laura Pilati. The Atlantic Forest (AF) is one of the most biodiverse biomes in Brazil, due in part to its wide variation in latitude. This variation allows different niches shaped by different climatic conditions. One of the vegetation formations in the southern region of AF is the Araucaria Forest that occurs in association with large areas of grasses known as "Campos". Phylogeographic studies with species from the central and northern regions of AF show that the climatic oscillations of the glacial periods of the Pleistocene influenced the pattern of distribution and structuring of species. In the south of AF during the last ice ages, climatic conditions seem to have favored the expansion of grass areas, in contrast, the Araucária Forests that were restricted to refuges in the river valleys. Studies have shown that rivers and their valleys have acted as geographical barriers in structuring species. There are few studies in the literature related to the evolutionary history of species adapted to colder climatic conditions occurring in the southern regions of AF, as well as the role of these possible barriers in the expansion of these populations. *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. popularly known as macela, is a species widely distributed in the grassy areas of southern AF and adapted to the cold climate, therefore, the evaluation of the genetic structure of its populations may provide important data on the influence of Pleistocene climatic oscillations on the structure of these populations, as well as, contribute to the understanding of the evolutionary history of the vegetation of AF. In this study, eight populations of *A. flaccida* collected in the southern region of AF were evaluated, four of which were collected in the north of the Uruguay river valley and four in the south. The intergenic chloroplast regions *trnL-trnF* and *psbA-trnH* and the nuclear DNA region (nDNA) ITS 4 and 5 were sequenced. The concatenated sequences for the two chloroplast regions generated a fragment of 1264 bp and the analysis of all sequences obtained identified 61 haplotypes. The nDNA sequences were 674 bp length and generated 47 ribotypes. The populations showed high nucleotide and haplotypic diversity. The neutrality and Bayesian Skyline Plot tests showed that there was a slight population expansion, in a period of colder climate, during the penultimate glacial maximum (210-140 thousand years ago), followed by stability in population size until the Holocene. The statistical significance of the SSD and HRAG indexes did not validate the multimodal pattern presented by the mismatch distribution charts, corroborating the population expansion observed around 200 thousand years ago. A high phylogeographic structure for *A. flaccida* and a high number of exclusive haplotypes and ribotypes were observed in populations north and south of the Uruguay river valley. All the data obtained corroborate that the Uruguay river valley may have acted as a geographical barrier limiting the gene flow between the populations of macela in southern AF. Also, the high diversity of populations and population stability during the Pleistocene shows, as observed for other species, the existence of large areas of occurrence of cold-climate species in southern Brazil during the last glacial periods.

Keywords: Phylogeography; Geographic Barrier; Chloroplast DNA; Nuclear DNA.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Filogeografia da América do Sul	1
1.2	História Evolutiva do Bioma Mata Atlântica	3
1.3	Teoria dos Refúgios para a Mata Atlântica	5
1.4	Refúgios no Sul da Mata Atlântica	6
2	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivo Geral	10
2.2	Objetivos Específicos	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1	Coleta de Material Vegetal e Extração de DNA	11
3.2	Amplificação por PCR e Sequenciamento	12
3.3	Edição e Alinhamento das Sequências	14
3.4	Análises Estatísticas	14
4	RESULTADOS	16
4.1	Diversidade Genética e História Demográfica	16
4.2	Rede de Haplótipos e Estrutura Populacional	21
5	DISCUSSÃO	26
5.1	Diversidade Genética e História Demográfica	26
5.2	Estrutura Populacional de <i>Achyrocline flaccida</i>	29
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
	REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 Filogeografia da América do Sul

Os padrões e processos históricos responsáveis pela distribuição geográfica dos organismos nos biomas podem ser estudados por meio da Filogeografia (AVISE et al., 1987), que faz uma conexão entre as áreas de estudos evolutivos como a genética de populações, filogenia e biogeografia, relacionando a variação genética das linhagens e sua distribuição geográfica, a fim de desvendar quais processos foram determinantes nessa distribuição (AVISE, 2009). Os estudos filogeográficos realizados com espécies ocorrentes nos biomas da América do Sul vem aumentando consideravelmente segundo a revisão feita por Turchetto-Zolet et al. (2013). Por meio destes estudos, torna-se possível esclarecer padrões histórico-evolutivos, testar hipóteses biogeográficas e até mesmo inferir processos demográficos históricos de uma espécie (AVISE et al., 1987; AVISE, 2000).

Dessa forma, ao entender quais forças evolutivas atuaram na distribuição geográfica de determinada espécie, os resultados obtidos podem ser extrapolados para outras espécies com padrões semelhantes de distribuição com o objetivo de fornecer um padrão biogeográfico mais completo sobre os biomas (BRANDÃO, 2018). Revisões dos padrões filogeográficos de alguns biomas específicos da América do Sul, como Amazônia, Mata Atlântica e Pampa já foram publicados (ANTONELLI et al., 2010; MARTINS, 2011; FREGONEZI et al., 2012).

Dentre as ferramentas disponíveis para estudos filogeográficos, os marcadores moleculares baseados em sequenciamento que avaliam SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) se tornam a melhor opção pois, são fontes de variação genética sendo possível avaliar uma mutação ou polimorfismo que tenha ocorrido em apenas um nucleotídeo (CHO et al., 1999; BRUMFIELD et al., 2003).

Os marcadores SNPs são altamente abundantes e distribuídos nos genomas da maioria dos organismos, incluindo as plantas (CHAGNÉ et al., 2007), o que os torna um excelente marcador para estudos de adaptação, evolução, filogenia e demografia populacional. Em comparação com outros marcadores, principalmente com microssatélites, os SNPs apresentam baixas taxas de variação, o que os tornam evolutivamente estáveis para o desenvolvimento desses estudos (JEHAN; LAKHANPAUL, 2006). Entre os marcadores moleculares frequentemente utilizados em estudos filogenéticos e filogeográficos de plantas temos os baseados em DNA nuclear (nDNA) e em DNA cloroplastidial (cpDNA).

Além destes marcadores as sequências do espaçador interno transcrito (ITS) para RNA ribossômico são utilizadas em estudos filogenéticos de plantas desde a década de 1990 (HAMBY; ZIMMER, 1992; BALDWIN, 1992). Essa região é uma parte do DNA, que é transcrito na parte do RNA não-funcional localizado entre os RNAs ribossômicos estruturais (rRNA) em um RNA precursor comum (HAO et al., 2010). A utilização do ITS na taxonomia e filogenia molecular pode ser explicada pela disponibilidade de *primers* universais, seus níveis consideráveis de variação genética, facilidade de isolamento e de amplificação de suas regiões (ÁLVAREZ; WENDEL, 2003; FELINER; ROSSELLÓ, 2007).

Contudo, para as plantas a utilização de sequências não codificantes do DNA cloroplastidial tem sido a classe preferencial para os estudos evolutivos. Os genes de cpDNA são extremamente conservados, devido ao fato de que este DNA possui apenas herança maternal na maioria das angiospermas, além de raras taxas de recombinação e baixo índice mutacional (RESENDE-MOREIRA et al., 2017; ZHAO et al., 2017). Por possuir uma taxa evolutiva lenta, esses marcadores são ideais para medidas filogenéticas e tem permitido elucidar padrões históricos e avaliar a diversidade genética dentro de populações e entre elas (BORSCH; QUANDT, 2009; BAI et al., 2010). Podendo ainda fornecer informações complementares sobre fluxo gênico e diversificação em diferentes espécies, sejam elas endêmicas, com potencial comercial ou medicinal (HARTL; CLARK, 2010; ZHAO et al., 2017).

Atualmente há uma tendência na utilização de cpDNA e de nDNA em estudos relacionados a filogeografia (WANG, M. et al., 2013; BUZATTI et al., 2018; LU et al., 2020). Assim, o estudo do polimorfismo no DNA de uma espécie utilizando a combinação desses marcadores, pode fornecer a compreensão dos processos evolutivos que compõem sua história (BRITTEN et al., 2003).

O continente Sul-Americano abriga a maior biodiversidade do planeta, além de ser composto por uma grande variedade de biomas e ecossistemas associados (MYERS et al., 2000). De acordo com Mittelbach et al. (2007) a estabilidade climática de longo prazo e o isolamento geológico que afetaram a América do Sul teriam favorecido o acúmulo gradativo de biodiversidade ao longo do tempo. A história geológica dinâmica e complexa da América do Sul é de grande importância para a compreensão das origens da alta biodiversidade atual (CARVALHO; ALMEIDA, 2011; RUZZANTE; RABASSA, 2011). Neste sentido, acredita-se que a história evolutiva deste continente tem sido associada a uma sucessão de grandes eventos geológicos e mudanças climáticas que modificou continentes e oceanos, impactando

o continente e criando diferentes cenários para a diversificação de espécies (COLINVAUX et al., 1996; BEHLING, 2002; ANTONELLI; SANMARTIN, 2011; CAVALLOTTO; VIOLANTE, 2011).

Afim de explicar os processos envolvidos na diversificação das espécies Sul-Americanas, diferentes hipóteses biogeográficas vêm sendo propostas, em que os eventos vicariantes são considerados os principais agentes responsáveis pela diversificação. Dentre as hipóteses temos o soerguimento da Cordilheira dos Andes, que desencadeou episódios geomorfológicos e climáticos, formando uma barreira abiótica e modificando profundamente a hidrologia e o clima da região (ANTONELLI et al., 2009). Estudos filogenéticos mostraram que a elevação andina agia como uma rota de dispersão para linhagens boreotropicais (BELL; DONOGHUE, 2005) e como promotora da diversificação rápida, via especiação alopátrica e deslocamento ecológico, nas terras altas (HUGHES; EASTWOOD, 2006).

Outro fator que pode ter influenciado a distribuição de algumas espécies são os rios, atuando como barreiras geográficas (WALLACE, 1852; PELLEGRINO et al., 2005; GIUDICELLI et al., 2019). As barreiras geográficas podem ser primárias, impedindo o fluxo gênico entre as populações, ou secundárias, que impediriam total ou parcialmente o fluxo gênico entre linhagens que divergiram por motivos alheios a barreira (PATTON et al., 1994; CABANNE et al., 2008). Estudos realizados por Aleixo (2004) e Fernandes et al. (2014) apontam o rio Amazonas como uma possível barreira primária, promovendo a especiação alopátrica. Para a Mata Atlântica, Pellegrino et al. (2005), Cabanne (2008), Martins (2011) e Carnaval et al. (2014), não descartam a possibilidade de rios como possível barreira ao fluxo gênico, mesmo que, não necessariamente, como uma barreira primária. Outra hipótese de diversificação seria a teoria dos refúgios florestais, pautada na ideia de que as flutuações climáticas durante o Pleistoceno levaram a especiação de táxons (HAFFER, 1969; BROWN; AB'SABER, 1979; BEHLING; NEGRELLE, 2001; BEHLING, 2002; CARNAVAL; MORITZ, 2008).

1.2 História Evolutiva do Bioma Mata Atlântica

O Brasil possui uma grande diversidade de formações vegetacionais, que estão distribuídas dentro de diferentes biomas. Os biomas brasileiros são constituídos pela Amazônia, distribuída na maior parte da Região Norte do país; Cerrado, que ocorre desde o Nordeste até as Regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil; Caatinga, distribuída na Região do

semiárido Nordeste; Mata Atlântica, distribuída desde a Região Nordeste até a Região Sul do país; Pampa, localizado na Região Sul do Brasil; e Pantanal, localizado nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (IBGE, 2004).

Dentre estes biomas, a Mata Atlântica é um dos mais biodiversos do país, sendo a segunda maior floresta tropical do continente americano. No entanto, é também um dos biomas mais degradados, restando apenas 8,5% de áreas remanescentes com pouco mais de 100 hectares da floresta original (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2017). Devido à sua fragmentação, grande diversidade e alto endemismo, este bioma foi classificado como um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade (MYERS et al., 2000). No Brasil, a Mata Atlântica abrange 17 estados, compreendendo um mosaico de diferentes tipos vegetacionais como Florestas Estacionais Decidual e Semidecidual; Florestas Ombrófilas Densa, Aberta e Mista; Mangues, Restingas e Campos de Altitude (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2013). Devido a sua grande variação latitudinal, o bioma possui diferentes climas ao longo de sua distribuição.

Estudos apontam que a formação do bioma Mata Atlântica se deu a partir do fim do Cretáceo, há aproximadamente 65 milhões de anos (COLOMBO; JOLY, 2010), sendo considerada a formação florestal mais antiga do Brasil. Alguns fatores que contribuíram para o surgimento desta floresta foram o aumento na temperatura da Terra, surgimento do Oceano Atlântico e formação das montanhas na borda costeira da América do Sul (DASILVA et al., 2011; PEIXOTO et al., 2016).

A diversificação das Angiospermas na Mata Atlântica coincidiu com o estabelecimento de um clima úmido e a formação de uma zona latitudinal. Contudo, cerca de 40% das plantas vasculares podem ter sido eliminadas na grande extinção em massa do Cretáceo. Porém, a recuperação do clima úmido há aproximadamente 50 milhões de anos favoreceu a expansão das Angiospermas ao longo da América do Sul (MORLEY, 2000).

Durante o Mioceno Médio, há aproximadamente 10 milhões de anos, as florestas tropicais eram mais extensas do que são atualmente. Entretanto, há aproximadamente 5 milhões de anos atrás, a partir do Plioceno, com os ciclos glaciais levando ao resfriamento e diminuição da umidade, houve a expansão de áreas de savana, que na América do Sul, compreendem os biomas Cerrado, Caatinga e Chaco. Com o aparecimento dessa diagonal seca, a Mata Atlântica ficou definitivamente separada das demais florestas, dando início a sua evolução de forma isolada (DASILVA et al., 2011).

Assim, durante os últimos máximos glaciais esse bioma passou por diversas mudanças em sua conformação. Estudos de Carnaval e Moritz (2008) e Carnaval et al. (2009) propõem que durante os períodos glaciais, houve a retração das florestas permitindo a expansão da vegetação de campo, resultando em remanescentes de pequenas áreas de endemismo e estabilidade climática dentro do bioma.

1.3 Teoria dos Refúgios para a Mata Atlântica

Para a história evolutiva do bioma Mata Atlântica, foi proposta a existência de refúgios florestais durante o último período glacial do Pleistoceno. Estudos palinológicos, geológicos e de modelagem de nicho climático reconhecem três regiões de refúgio para a Mata Atlântica: um localizado na Região Norte, outro na Região Central entre o rio São Francisco e o rio Doce e, um terceiro refúgio na Região Sudeste ao sul do rio Doce (BROWN; AB'SABER, 1979; BEHLING; NEGRELLE, 2001; BEHLING, 2002; CARNAVAL; MORITZ, 2008). Foi relatada ainda a provável existência de uma região de floresta tropical estável em São Paulo estabelecida durante o final do Pleistoceno (CABBANE et al., 2008). No entanto, os autores não incorporaram ao modelo diferenças no gradiente de latitude, aliado à ausência de estudos utilizando espécies de regiões subtropicais, possivelmente resultou na ausência de refúgios ao sul da Mata Atlântica (BATALHA-FILHO; MIYAKI, 2011).

As regiões ao norte e centro da Mata Atlântica teriam mantido a estabilidade florestal em um ambiente mais úmido ao longo dos últimos 21.000 anos, constituindo refúgios florestais durante o Último Máximo Glacial (UMG). Assim, haveria maior diversidade nas populações localizadas em áreas de refúgios quando comparadas com as que ocorreram em áreas externas (CARNAVAL; MORITZ, 2008; CABANNE et al., 2008). De acordo com Hewitt (1996) espera-se que as populações que ocorrem fora das áreas de refúgio apresentem sinal de expansão populacional recente como consequência da expansão da floresta e a colonização de novas áreas no período interglacial.

No modelo de refúgios proposto por Carnaval e Moritz (2008) para a Mata Atlântica, estes ficavam restritos ao norte do bioma, principalmente em zonas costeiras com florestas tropicais, enquanto grandes contrações florestais quase eliminaram as florestas em latitudes mais altas. Posteriormente, durante o Holoceno, a região sul da Mata Atlântica seria colonizada a partir da expansão de fontes de refúgios do Norte, em direção à Região Sul (THOMÉ et al., 2014).

A existência desses refúgios vem sendo bem documentada, considerando sua presença até o limite da Região Sudeste do país, principalmente para espécies de plantas e animais tropicais (CARNAVAL; MORITZ, 2008; CARNAVAL et al., 2009; CABANNE et al., 2008; BATALHA-FILHO et al., 2010). Entretanto, estudos realizados na Região Sul do Brasil têm mostrado um padrão de refúgios diferente dos propostos para espécies tropicais. Behling (1997), por meio de estudos paleopolinológicos indicaram a presença de pólen de táxons pertencentes à Floresta de Araucária, com predominância da espécie *Araucaria angustifolia* em áreas próximas aos vales dos rios durante os períodos glaciais. Barros et al. (2015) sugeriram a existência de áreas adequadas para a ocorrência de espécies florestais em latitudes mais altas do Sul durante o UMG. Premoli et al. (2010) também identificaram a presença desses refúgios em seu trabalho. Quando avaliado, o padrão de estruturação genética e distribuição descontínua latitudinal das florestas de *A. angustifolia* na Região Sul do Brasil, também é sugerida a existência de refúgios nas latitudes mais altas da região (STEFENON et al., 2007; STEFENON et al., 2008). Em estudo realizado por Stefenon et al. (2019), os autores modelaram a distribuição de *A. angustifolia* há 20.000 anos, revelando áreas de ocorrência da espécie que poderiam ser refúgios glaciais ao sul da Mata Atlântica. A avaliação da diversidade genética da espécie também realizada pelos autores confirmou esta ocorrência.

1.4 Refúgios no Sul da Mata Atlântica

A vegetação de campo do sul da Mata Atlântica sofreu várias mudanças durante as últimas eras glaciais. Durante estes períodos, as condições climáticas eram mais frias e com menor umidade, o que permitiu a expansão das áreas de campo, onde antes predominavam florestas (BEHLING, 1997; BEHLING et al., 2004).

Essas oscilações climáticas afetaram as histórias evolutivas de espécies do sul da América do Sul. Principalmente devido a essa expansão de espécies campestres durante os períodos glaciais. No entanto, em períodos interglaciais, as temperaturas mais altas e a maior umidade levaram a contração de espécies de vegetação de campo, permitindo a expansão de espécies florestais. Ao longo do tempo, essa dinâmica de retrações e expansões entre os ambientes de floresta e campo, promoveu a fragmentação dessas áreas (BEHLING, 2002; CARNAVAL et al., 2009).

O sul da Mata Atlântica possui uma fitofisionomia particular, chamada de Floresta Ombrófila Mista, caracterizada principalmente pela presença da espécie *A. angustifolia*. Essa formação florestal que ocorre em associação com áreas de Campos Naturais, forma um sistema de mosaico que caracteriza grande parte da Região Sul do país (BACKES, 2001). A formação desse mosaico está ligada a alternância entre períodos glaciais e interglaciais durante os últimos ciclos paleoclimáticos. Durante as glaciações, os campos eram abundantes e dispersos enquanto que as florestas de Araucária estavam provavelmente presentes apenas em vales de rios (BEHLING, 1997; BEHLING 2002; STEFENON et al., 2019).

Atualmente a vegetação de Campos do bioma Mata Atlântica, é caracterizada pela presença de gramíneas, pequenos arbustos e herbáceas. Os Campos são fisionalmente representados, principalmente, pelas famílias Iridaceae, Poaceae, Oxalidaceae e Asteraceae (SAFFORD, 1999).

A família Asteraceae é a maior e mais abundante em número de espécies, compreendendo 10% de todas as espécies de plantas com flores e exibe uma incrível diversidade de formas, constituindo a maior família dentro do grupo Angiospermae (STEVENS, 2017; MANDEL et al., 2019). Segundo a filogenia proposta por Mandel et al. (2019) a família tem sua origem no final do Cretáceo, e sofreu numerosas dispersões e diversificações que foram acompanhadas por uma aceleração nas taxas de diversificação durante o Eoceno médio, coincidindo com o clima frio desse período.

Dentre as espécies da família Asteraceae, uma das mais frequentes na Região Sul do Brasil é a *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC.. Conhecida popularmente como Macela, Marcela e Macela-amarela, sua identidade é normalmente confundida com *Achyrocline satureioides* (DEBLE, 2007; DA SILVA; MACHADO; RITTER, 2007). *A. flaccida* possui porte herbáceo de até 1,5 metros de altura (Figura 1A e 1B), levemente ramificadas na base, com folhas de até 11 centímetros de comprimento e 1,5 centímetros de largura (Figura 1E), suas inflorescências são em capítulos e seus frutos do tipo cipsela (Figura 1C e 1D) (DAVIES, 2004). A espécie é diploide e apresenta conjunto cromossômico $2n = 28$ (MAZZELLA et al., 2010).

A Macela cresce espontaneamente em áreas de campos nativos e áreas de regeneração vegetacional (RETTA et al., 2008). No entanto, com a crescente degradação ambiental, suas populações ocupam além das formações de Campo, também bordas de florestas, pastagens, beiras de estradas e outros locais abertos (DAVIES, 2004).

Achyrocline flaccida é uma das plantas nativas mais comumente usadas na medicina popular na América do Sul, devido à presença de compostos bioativos como flavonóides, flavonas e ácidos caféicos em suas infrutescências, folhas e caules que são responsáveis por suas atividades biológicas (BROUSSALIS et al., 1988; RETTA et al., 2008). Esta espécie é utilizada principalmente no tratamento de distúrbios gástricos e estados inflamatórios (TEIXEIRA; BASSANI, 1997; GARCÍA et al., 1999) e para relaxamento quando utilizada dentro dos travesseiros e cobertores (VENDRUSCOLO; MENTZ, 2006).

A espécie possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a Venezuela, Bolívia e Colômbia (BADILLO; GONZALES-SÁNCHEZ, 1999), até a metade norte da Argentina (CABRERA, 1978) e Uruguai (GIANGUALANI, 1976). No Brasil, a espécie ocorre de forma abundante na Região Sul e em algumas áreas altas da Região Sudeste (FLORA DO BRASIL 2020), porém, seu limite de ocorrência não ultrapassa a barreira de clima quente e seco formada pelos biomas do Cerrado e Caatinga (Figura 1F).

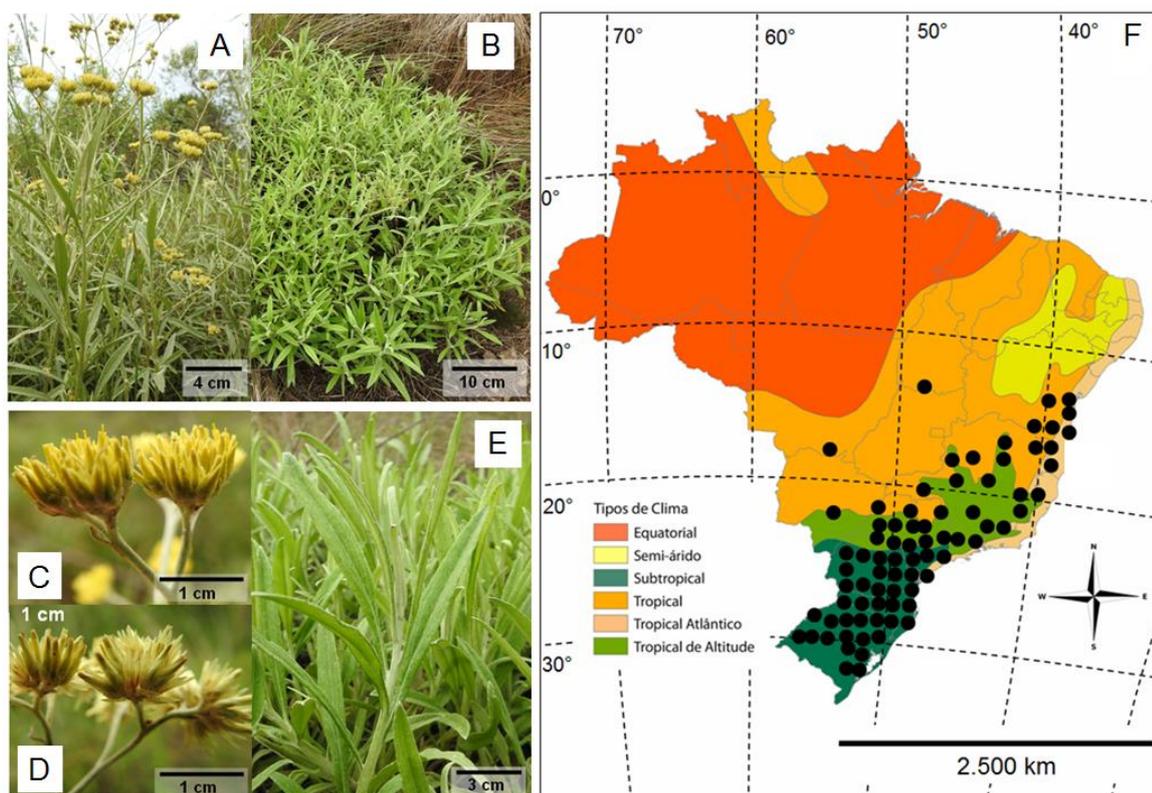


Figura 1. Características fenológicas e mapa de distribuição da espécie *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. A) Aspecto de uma planta da espécie em estado reprodutivo e em B) em seu estado vegetativo. C) Detalhe da inflorescência na fase de polinização e em D) a inflorescência na fase de dispersão. E) Detalhes da parte vegetativa da espécie. F) Mapa adaptado de Deble (2007) com os pontos de ocorrência da espécie no Brasil.

Estudos feitos por Behling (1997) e Behling et al. (2005) comprovam a presença de espécies de Asteraceae há aproximadamente 20 mil anos atrás nos Campos de Altitude do Sul do Brasil. Sendo assim, por ser uma espécie abundante, bem distribuída na Região Sul do país e estar adaptada a um clima frio *A. flaccida* se mostra um bom modelo biológico para fornecer informações sobre a dinâmica populacional das herbáceas do Sul do Brasil durante os últimos períodos glaciais. Provavelmente, essas espécies que dependem de frio para seu desenvolvimento colonizaram regiões diferentes dos refúgios do Pleistoceno descritos para florestas tropicais. Devido ao fato de cada espécie possuir características biológicas próprias, as mudanças na sua distribuição geográfica e estrutura genética podem ter respondido de maneira diferente às oscilações climáticas do Quaternário (HEWITT, 2000).

Além das oscilações climáticas, também podem existir barreiras físicas à dispersão entre as populações. Especialmente em espécies com capacidade de dispersão limitadas, as populações podem ser parcialmente isoladas apenas pela distância. Barreiras físicas, como rios ou montanhas, geralmente aumentam os efeitos da limitação da dispersão, promovendo a estruturação populacional. Algumas barreiras podem ser semipermeáveis e permitem trocas ocasionais de linhagens genéticas, mas outras podem bloquear toda a troca de genes por períodos substanciais de tempo evolutivo (AVISE, 2009). A estruturação genética de populações que são fragmentadas por uma barreira de dispersão depende da duração da barreira física e da história demográfica das populações disjuntas (TURCHETTO-ZOLET et al., 2013). A presença de rios como barreiras já foi relatada por Giudicelli et al. (2019) na Região Sul do Brasil para espécies do gênero *Petunia*. Em trabalho utilizando seis das oito populações de *A. flaccida* avaliadas no presente estudo, os autores Rosa et al. (2017) ao observarem o padrão de diversidade e estruturação genética da espécie a partir de marcadores dominantes, propuseram que a presença do vale do rio Uruguai pode ser uma barreira entre essas populações. Diversos estudos baseados em análises de sequências de DNA têm revelado um pouco da história filogeográfica e demográfica de diferentes populações de espécies vegetais em diversos locais do mundo (CARON et al., 2000; PREMOLI et al., 2010; WANG et al., 2013; MAIA et al., 2017). No entanto, estudos como este ainda são escassos na Região Sul do Brasil, tornando as pesquisas sobre a história evolutiva e atuação de barreiras geográficas na estrutura genética das populações de *A. flaccida* ainda mais importantes. Neste sentido, o estudo das populações de *A. flaccida* do Sul da Mata Atlântica poderão fornecer dados importantes, que auxiliarão no conhecimento da história vegetacional do Sul brasileiro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade, estrutura genética e filogeográfica de populações de *A. flaccida* separadas pelo vale do rio Uruguai.

2.2 Objetivos Específicos

- Estimar a diversidade genética de oito populações de *A. flaccida* a partir das sequências de DNA cloroplastidial e nuclear;
- Analisar a estrutura filogeográfica e genética espacial da distribuição das populações;
- Inferir dados sobre a expansão populacional da espécie;
- Avaliar o efeito do vale do rio Uruguai como uma barreira física na estruturação das populações.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de Material Vegetal e Extração de DNA

Foram coletadas folhas de oito populações da espécie *A. flaccida*. Estas populações estão localizadas nos três estados da Região Sul do Brasil, nos municípios de Guarapuava e Marialva no Paraná; Campos Novos e Xanxerê em Santa Catarina; Coxilha, Panambi, Herveiras e Itapuca no Rio Grande do Sul, totalizando quatro populações localizadas ao norte do vale do rio Uruguai e quatro populações localizadas ao sul do vale. Para cada população foram coletadas folhas de 7 a 11 indivíduos (Tabela 1). As folhas de cada planta foram acondicionadas em sílica gel até o momento da extração do DNA.

Para a extração do DNA, as folhas foram trituradas com o auxílio do nitrogênio líquido (N₂) até a obtenção de um pó bem fino. Posteriormente o material vegetal foi armazenado sob refrigeração (-20°C) até o momento da extração do DNA. O protocolo para a extração do DNA utilizado foi o proposto por Doyle e Doyle (1987). Nos tubos contendo 100 mg de material vegetal, foram adicionados 700 µL de tampão composto por: 20 mM de EDTA (ácido etilenodiamino); 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0 (tris (hidroximetil) /aminometano); 1,4 M de NaCl (Cloreto de sódio); 2% de CTAB (Brometo de cetil-trimetilamônio); e 0,4% de β-mercaptoetanol. Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria (65°C) por 45 minutos, lavadas com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugadas por 10 minutos à 12.000 rpm por duas vezes.

O DNA então foi precipitado com isopropanol, seguido de diversas lavagens com etanol para a obtenção de amostras livres de contaminantes. Após a secagem do DNA (*pellet*) por 12 horas, este foi ressuspensão em 100µL de tampão TE, tratado com RNase a 10mg.mL⁻¹ e incubado a 37°C por aproximadamente 1 hora. Posteriormente, o DNA foi precipitado em 10 µL de acetato de sódio 3 M e 200 µL de etanol gelado. Depois de sucessivas lavagens com etanol, as amostras foram ressuspensas em água ultrapura e armazenadas à -20°C até a sua utilização.

Tabela 1. Locais de coleta e número de indivíduos amostrados de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC.

População	Estado	Coordenadas geográficas	Localização*	Número de indivíduos	
				Cloroplastidial	Nuclear
Marialva	PR	23°24'35.25"S 51°47'42.75"O	Norte	9	10
Guarapuava	PR	25°22'12.81"S 51°30'25.44"O	Norte	9	9
Campos Novos	SC	27°20'10.58"S 51°21'08.86"O	Norte	7	7
Xanxerê	SC	26°51'35.77"S 52°21'50.46"O	Norte	11	9
Panambi	RS	28°21'11.94"S 53°28'30.99"O	Sul	9	10
Coxilha	RS	28°05'37.18"S 52°16'23.36"O	Sul	10	10
Itapuca	RS	28°48'37.58"S 52°16'52.27"O	Sul	8	10
Herveiras	RS	29°26'06.04"S 52°40'10.20"O	Sul	7	10

* Referente ao vale do rio Uruguai

3.2 Amplificação por PCR e Sequenciamento

Após a extração do DNA, as regiões do DNA cloroplastidial, *trnL-trnF* intergênica, *psbA-trnH* intergênica e nuclear ITS (*Internal Transcribed Spacer*), foram amplificadas pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 2.

As regiões do DNA cloroplastidial e nuclear foram amplificadas utilizando 20ng de DNA genômico, 1 X de tampão de PCR, com 1,0 mM de MgCl₂, 10 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,25 mM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polimerase e água ultrapura para completar um volume final de 10 µL. Para a região *trnL-trnF* intergênica, o programa de amplificação foi: desnaturação inicial de 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C (temperatura de pareamento) por 1 min, 72°C por 1 min e 10 min à 72°C para a extensão final. Para a região *psbA-trnH*: desnaturação inicial de 94°C por 5 min, em seguida, 30 ciclos de 94°C por 45 s, 55°C por 45 s, 72°C por 50 s e para extensão final 72°C por 4 min. Para a região ITS: desnaturação inicial a 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 s, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min, finalizando a extensão final a 72°C por 7 min.

Para comprovar a amplificação das regiões a serem sequenciadas, os produtos da PCR foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose com concentração de 1,8%, corados com brometo de etídio e visualizados em fotodocumentador sob luz ultravioleta (UV). Foi utilizado como padrão de peso molecular o marcador DNA *Ladder* 100pb.

Tabela 2. Relação dos *primers* e suas sequências utilizados para amplificação de regiões do DNA cloroplastidial (intron do gene *trnL* e região intergênica *psbA-trnH*) e nuclear de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC.

<i>Primers</i>	Sequência dos <i>primers</i> 5' – 3'	Tamanho de fragmento esperado (pb)	Referência
<i>trnL</i>	CGAAATCGGTAGACGCTACG	1015	Taberlet et al., 1991
<i>trnF</i>	ATITGAACTGGTGACACGAG		
<i>trnH</i>	CGCGCATGGTGGATTACAAAATC	495	Sang et al., 1997
<i>psbA</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	645	White et al., 1990
ITS 5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG		
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

Após a confirmação da amplificação, foi realizada nova amplificação por PCR como descrito anteriormente, porém, com um volume final de 40 μ L, para obter quantidade suficiente de produto para o sequenciamento. Parte dos produtos foram novamente resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 1,8%. Confirmada a amplificação, os produtos da amplificação foram purificados utilizando o kit de purificação GenElute da Sigma Aldrich ou por meio da precipitação do DNA com etanol como descrito por New England Biolabs (2017) com modificações, que consistem em adicionar 150 μ L de etanol absoluto ao produto da PCR, deixá-lo por 12 horas a -20°C , posteriormente centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante e, em seguida, adicionar 300 μ L de etanol 70%, centrifugar por 2 minutos e descartar o sobrenadante. Por fim, secar as amostras por 2 horas a 37°C e ressuspende-las em 30 μ L de água ultrapura.

Os produtos de PCR purificados foram quantificados em eletroforese utilizando gel de agarose a 1,8%, corados com brometo de etídio e visualizados em fotodocumentador sob luz UV, utilizando como base os marcadores DNA fago λ 100ng/uL e DNA *Ladder* 100 pb. Foi avaliada a concentração de DNA obtida e preparada para cada indivíduo, uma solução contendo 50 ng de DNA e 4,5 picomol dos respectivos *primers* utilizados na amplificação descritos na tabela 2. As amostras foram secas a 60°C . O sequenciamento foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA. O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação de cadeia utilizando o aparelho *ABI-Prism 3500 Genectic Analyzer* (Applied Biosystems).

3.3 Edição e Alinhamento das Sequências

As sequências obtidas foram avaliadas e editadas manualmente para correção de erros. Após, foi realizado o alinhamento múltiplo a partir do programa ClustalW (THOMPSON et al., 1994) no programa BioEdit 7.0.5 (HALL, 2005) e posteriormente editadas por inspeção visual para correção de erros. Foram obtidas 69 sequências de cpDNA e 75 sequências de nDNA. A ferramenta BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL et al., 1997) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foi utilizada para verificar homologias das sequências obtidas com sequências depositadas no *Genbank*.

3.4 Análises Estatísticas

Foram definidos três grupos a partir das oito populações, sendo um grupo contendo as oito populações de *A. flaccida*, um grupo formado pelas quatro populações localizadas ao norte do vale do rio Uruguai e o terceiro grupo composto pelas quatro populações ao sul do vale. Todas as análises estatísticas foram realizadas para as sequências das duas regiões cloroplastidiais concatenadas. As sequências obtidas para a região de nDNA foram utilizadas para análises de diversidade genética e obtenção do número de ribotipos.

O índice de diversidade haplotípica (Hd), número de sítios polimórficos (S), diversidade nucleotídica (π) e número de haplótipos (H) foram estimados utilizando o programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A média da diversidade genética dentro das populações (Hs) foi obtida a partir do programa DnaSP (LIBRADO; ROZAS, 2009). A análise de variância molecular (AMOVA), índice de diferenciação genética (PhiPT) análogo ao F_{ST} , e o fluxo gênico (Nm) foram calculados no programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Todos os índices citados anteriormente foram calculados para os três grupos avaliados no trabalho.

A rede de haplótipos foi obtida pela abordagem de *median-joining* (BANDELTA et al., 1999), implementada no *software* NETWORK 5.0.1.1 (<http://www.fluxus-engineering.com>), a fim de inferir as relações filogenéticas entre os haplótipos. O número de grupos genéticos entre as populações amostradas foi inferido por meio da análise Bayesiana utilizando o pacote GENELAND 4.0.5 (GUILLOT; SANTOS, 2010) disponível no programa R (<http://www.cran.r-project.org/>). Este método mostra grupos genéticos distintos e detecta

descontinuidades genéticas através da distribuição geográfica da espécie. Foi utilizado o k variando de 1 a 10. A corrida teve 1000000 interações de Cadeia de Monte Carlo Markov (MCMC) com um *thinning* de 100 e *burnin* de 1000.

A fim de inferir variações no tamanho efetivo da população ao longo do tempo foi realizada à análise *Bayesian Skyline Plot* (BSP), utilizando o pacote estatístico BEAST 2 (DRUMMOND et al., 2005). O modelo evolutivo de substituição de nucleotídeos que melhor se adequou aos nossos dados foi previamente selecionado pelo critério de Akaike (KELCHNER; THOMAS, 2007), utilizando o jModelTest 2.1.5 (DARRIBA et al., 2012). O modelo de substituição nucleotídica calculado que melhor explica a evolução das sequências foi HKY. Os parâmetros de análise no BEAST foram criados no BEAUTi 2.0 (BOUCKAERT et al., 2014), usando um relógio molecular relaxado com distribuição log-normal (selecionado pelo fator Bayes como o modelo de evolução mais adequado: $\log_{\text{elognormalclock}} - \log_{\text{estricclock}} = 13,34$; KASS; RAFTERY, 1995). Devido à falta de uma taxa de substituição específica para as regiões de cpDNA de *A. flaccida*, foi assumida uma taxa de substituição de $1,52 \times 10^{-9}$ (WOLFE et al., 1987). Portanto, foi estabelecido $1,0 \times 10^{-9}$ como limite mínimo e $3,0 \times 10^{-9}$ como limite máximo para a taxa de substituição de nucleotídeos nesta análise. Foi realizada uma corrida de 200 milhões de gerações, com todas as árvores amostradas a cada 20.000 gerações. Obteve-se a convergência e a estabilidade da análise (ESS > 200) e o gráfico BSP através do Tracer 1.7 (RAMBAUT et al., 2018).

Para testar se *A. flaccida* passou por uma recente expansão populacional, as distribuições de *mismatch* pareadas foram calculadas usando o Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) para o total de populações e grupos de populações ao norte e sul do vale do rio Uruguai definidos. A soma dos quadrados do desvio (SSD) e o índice de *Harpending's Raggedness* (H_{RAG}) foram utilizados como método estatístico para testar a validade dos modelos de expansão. A significância foi determinada com 1000 permutações de bootstrap paramétricas. O gráfico da distribuição *mismatch* foi obtido no programa DnaSP (LIBRADO; ROZAS, 2009) e no mesmo programa testes de neutralidade foram realizados para verificar se as populações estavam sob neutralidade seletiva, incluindo D de Tajima (TAJIMA, 1989) e estatística F_s de Fu (FU, 1997).

4. RESULTADOS

4.1 Diversidade Genética e História Demográfica

Para as regiões espaçadoras intergênicas *trnL-trnF* e *psbA-trnH* foram obtidos fragmentos de 811 e 453 pares de bases (pb) respectivamente. As duas regiões concatenadas geraram fragmentos de 1264 pb com 318 sítios polimórficos para todas as populações. Para a região do nDNA ITS4 e ITS5 foram obtidos fragmentos de 674 pb, com um total de 108 sítios polimórficos para todas as populações (Tabela 3).

Para o cpDNA a diversidade nucleotídica e haplotípica total foi de $0,026 \pm 0,013$ e $0,992 \pm 0,005$, respectivamente. A diversidade nucleotídica foi mais alta nas populações ao norte do vale ($\pi = 0,030 \pm 0,014$) do que ao sul ($\pi = 0,009 \pm 0,004$). Enquanto a diversidade de haplótipos foi semelhante nos dois grupos. Os dados de diversidade haplotípica para o nDNA foram semelhantes entre os três grupos avaliados e de diversidade nucleotídica seguiram o padrão apresentado para o cpDNA (Tabela 3).

Foi observada diferenciação genética moderada entre todas as populações para o cpDNA ($\Phi_{PT} = 0,19$) e muito alta para nDNA ($\Phi_{PT} = 0,57$). Quando comparadas entre elas, as populações dos grupos norte e sul do vale do rio Uruguai apresentaram diferenciação genética média para cpDNA e alta para nDNA. Ao serem avaliadas como grupos únicos as populações ao norte e ao sul apresentaram baixa diferenciação genética para cpDNA e alta para nDNA (Tabela 4).

A AMOVA baseada em cpDNA para os diferentes grupos testados evidenciou que a maior variação foi encontrada dentro das populações quando comparada com a variação entre as populações. Para as sequências de nDNA os resultados foram semelhantes para os mesmos grupos testados, exceto entre todas as populações que apresentou uma maior variação entre as populações (57%) do que dentro delas (43%). O fluxo gênico por dispersão de sementes (cpDNA) entre as populações de *A. flaccida* foi de 2,06. O fluxo gênico entre as populações ao norte e entre as populações ao sul do vale foi elevado, 6,70 e 2,13 respectivamente (Tabela 4). O fluxo gênico por meio da dispersão de pólen (nDNA) foi mais baixo entre todos os grupos testados quando comparado com o cpDNA (Tabela 4).

Tabela 3. Diversidade genética e dinâmica evolutiva das populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. obtidas com base em 69 sequências de cpDNA e 75 sequências de nDNA.

Índices genéticos e estatísticas	CLOROPLASTIDIAL			NUCLEAR		
	Todas	Grupo norte	Grupo sul	Todas	Grupo norte	Grupo sul
Índices de Diversidade						
Número de sítios polimórficos (S)	381	292	74	108	104	23
Diversidade Haplótipica (Hd ± DP)	0,992 ± 0,005	0,998 ± 0,007	0,976 ± 0,016	0,960 ± 0,012	0,952 ± 0,024	0,960 ± 0,019
Diversidade Nucleotídica (π ± DP)	0,026 ± 0,013	0,030 ± 0,014	0,009 ± 0,004	0,009 ± 0,005	0,017 ± 0,009	0,003 ± 0,002
Número de Haplótipos	61	35	27	47	23	28
Média da diversidade genética dentro da população (Hs)	0,810	0,895	0,794	0,668	0,671	0,667
Testes de Neutralidade						
D de Tajima	-2,531* (P<0,001)	-2,573* (P<0,001)	-2,464* (P<0,001)	-2,570* (P<0,001)	-2,611* (P<0,001)	-1,801* (0,10 >P >0,05)
Fs de Fu	-2,003* (P<0,02)	1,197* (P<0,02)	-0,317* (P<0,02)	-1,65* (P<0,02)	2,02* (P<0,02)	0,49* (P<0,02)
Expansão Demográfica						
Soma dos quadrados dos desvios	0,00152 (P=0,997)	0,00461 (P=0,869)	0,00613 (P=0,645)	0,01488* (P=0,006)	0,02739* (P=0,010)	0,01501* (P=0,038)
Índice Harpending's Raggedness	0,00144 (P=1,000)	0,00430 (P=0,926)	0,01336 (P=0,898)	0,09435* (P=0,011)	0,07839 (P=0,090)	0,12561* (P=0,045)
Expansão Espacial						
Soma dos quadrados dos desvios	0,00404 (P=0,998)	0,00910 (P=0,941)	0,00947 (P=0,891)	0,04163 (P=0,396)	0,03602 (P=0,396)	0,01791* (P=0,002)
Índice Harpending's Raggedness	0,00144 (P=0,999)	0,00430 (P=0,945)	0,01336 (P=0,993)	0,09435 (P=0,634)	0,07839 (P=0,735)	0,12561 (P=0,117)

*Valores estatisticamente significativos P > 0,05;

DP – Desvio padrão.

P – Probabilidade.

Os testes de neutralidade apresentaram valores próximos a zero. O índice de D de Tajima para cpDNA e nDNA evidenciou que houve expansão demográfica para os três grupos testados. O teste F_s de F_u apresentou valores significativos para todas as populações tanto para cpDNA, quanto para todas as populações com nDNA, demonstrando expansão populacional (Tabela 3).

Os gráficos de distribuição de *mismatch* mostraram uma distribuição multimodal para os três grupos de populações, o que levaria à conclusão de que as populações estão em equilíbrio demográfico (Figura 2). No entanto, o índice de *Harpending's Raggedness* e o teste estatístico da soma dos quadrados do desvio apresentaram valores não significativos rejeitando a hipótese de equilíbrio demográfico para todos os conjuntos de populações avaliadas a partir do cpDNA (Tabela 3).

Para as sequências de nDNA obteve-se resultados semelhantes ao cpDNA nos gráficos de distribuição de *mismatch* (Figura 3). O índice de *Harpending's Raggedness* aceitou a hipótese de expansão demográfica para todas as populações e para o grupo ao sul e rejeitou a hipótese de expansão espacial para todos os grupos testados. A soma dos quadrados do desvio aceitou a hipótese de expansão demográfica para todos os grupos e rejeitou a expansão espacial para todas as populações e grupo norte (Tabela 3).

Tabela 4. Índice de diferenciação genética (PhiPT), fluxo gênico (Nm) e Análise de Variância Molecular (AMOVA) com base em sequências do espaçador intergênico *trnL-trnF* e *psbA-trnH* de cpDNA e nas sequências do espaçador interno transcrito ITS4 e ITS5 de nDNA, para diferentes grupos das populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC.

Populações	Cloroplastidial			Nuclear		
	PhiPT	Nm	AMOVA	PhiPT	Nm	AMOVA
Todas	0,19	2,06	80% dentro e 20% entre	0,57	0,37	43% dentro e 57% entre
Norte e Sul	0,07	6,87	93% dentro e 7% entre	0,22	1,68	77% dentro e 23% entre
Norte	0,07	6,70	95% dentro e 5% entre	0,18	2,16	81% dentro e 19% entre
Sul	0,19	2,13	94% dentro e 6% entre	0,17	2,42	83% dentro e 17% entre

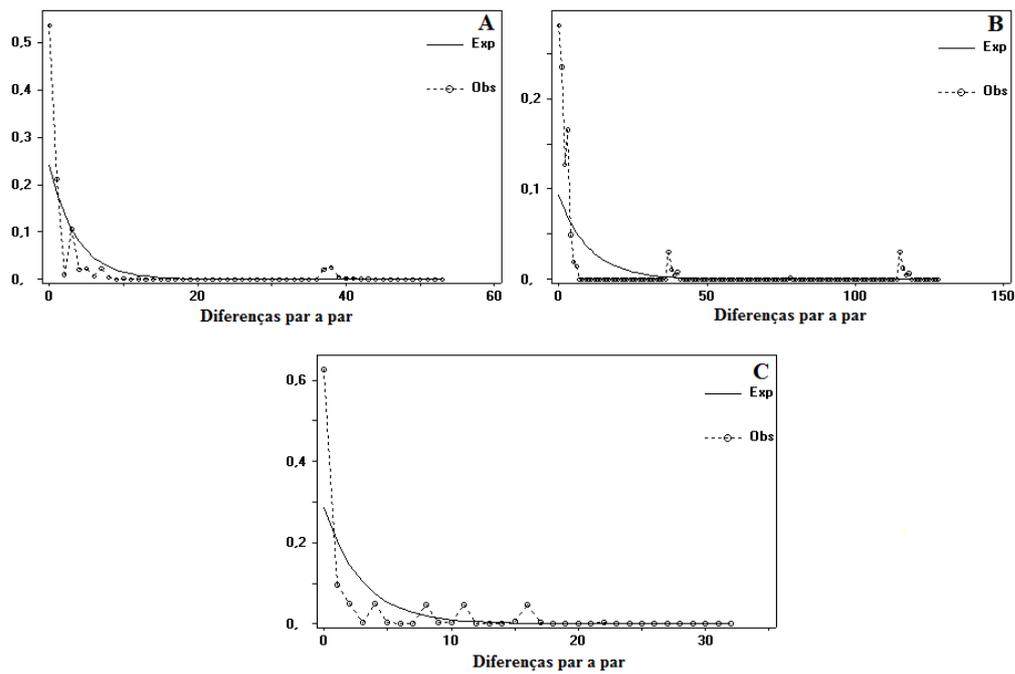


Figura 2. Gráficos de distribuição *mismatch* para as sequências de cpDNA de 69 indivíduos de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. A) Todas as populações; B) Populações ao norte do vale do rio Uruguai; C) Populações ao sul do vale do rio Uruguai.

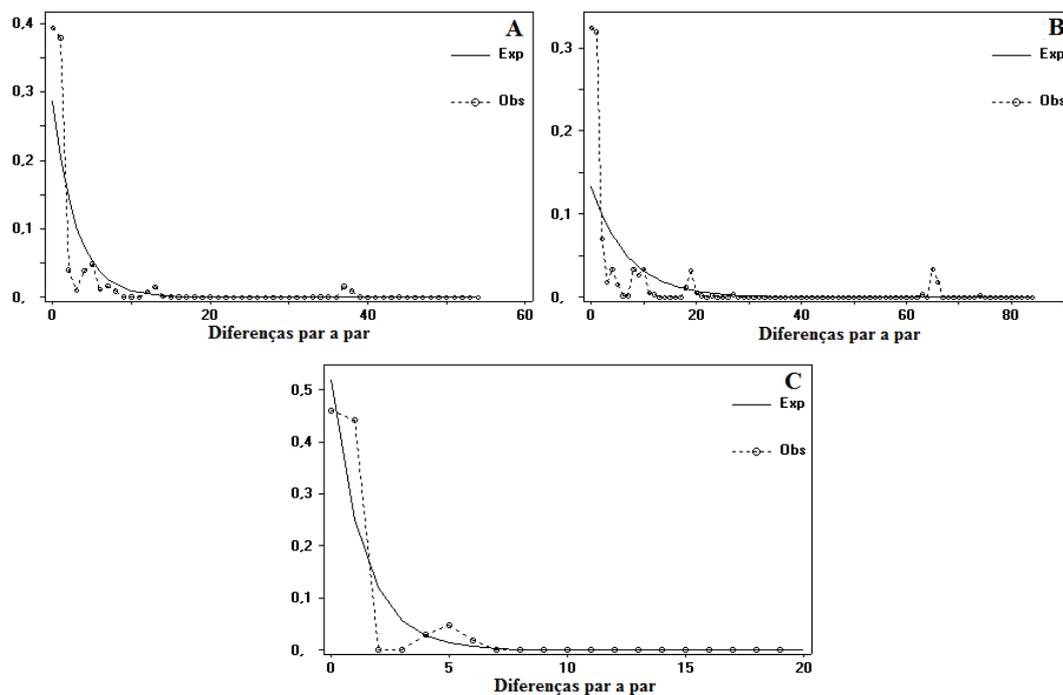


Figura 3. Gráficos de distribuição *mismatch* para as sequências de nDNA de 75 indivíduos de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. A) Todas as populações; B) Populações ao norte do vale do rio Uruguai; C) Populações ao sul do vale do rio Uruguai.

Baseado nas simulações Bayesianas utilizando cpDNA, o BSP evidenciou crescimento populacional sutil em um período de 65 mil anos compreendido entre 205 e 145 mil anos atrás para as populações de *A. flaccida* (Figura 4).

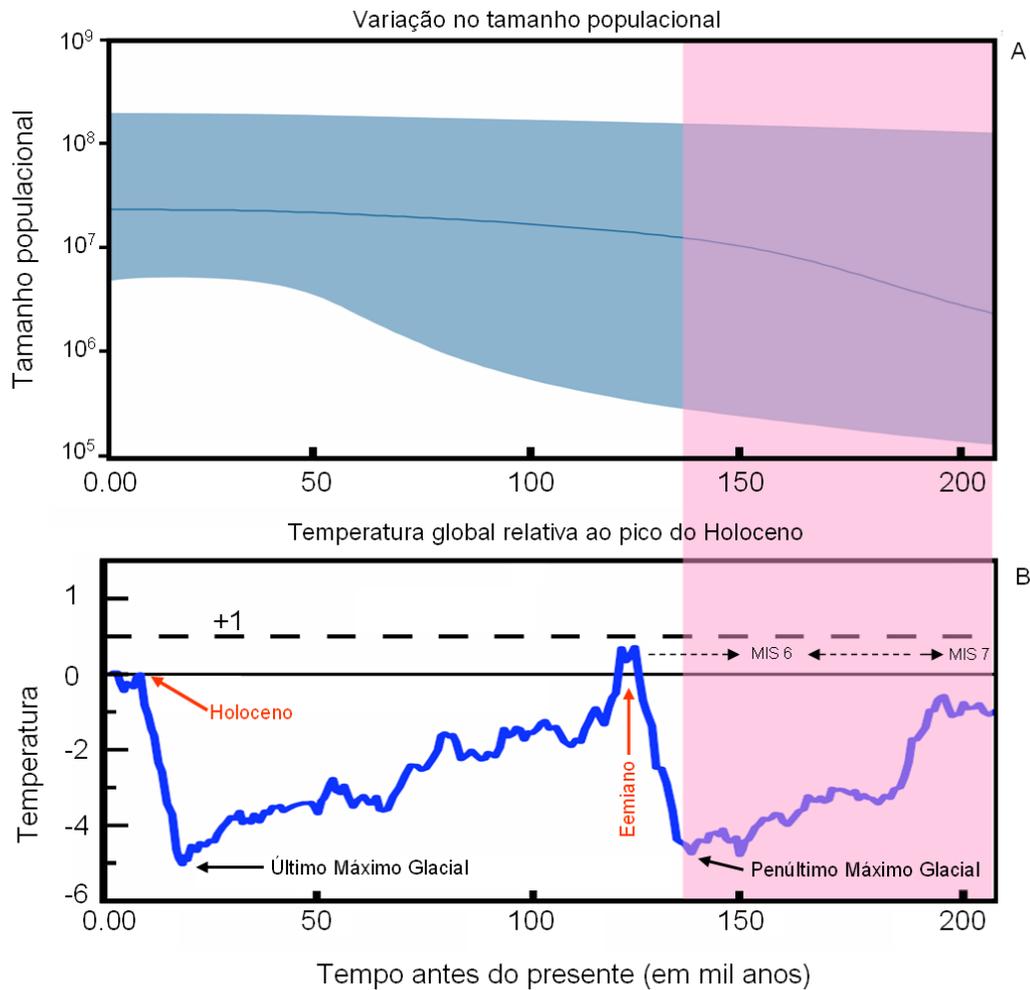


Figura 4. Relação entre o tamanho das populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC., estimado pela *Bayesian Skyline Plot* (A), e variação na temperatura da terra nos últimos 210 mil anos em relação ao pico máximo médio de temperatura do Holoceno (B). A área sombreada em rosa representa o período de maior crescimento populacional que coincide com os últimos 100 mil anos do penúltimo período glacial da terra ocorrido no final do Pleistoceno Médio, entre aproximadamente 210 e 140 mil anos. Este período corresponde ao final do estágio de isotopos marinhos MIS 7 (entre 243 e 191 mil anos antes do presente) e todo o MIS 6 (entre 191 e 130 mil anos antes do presente). Estes estágios são denominados como Glaciação de Riss (para região Alpina) e período Glacial de Illinois (para a América do Norte). A figura B foi adaptada de Lüthi et al. (2008).

4.2 Rede de Haplótipos e Estrutura Populacional

As regiões de cpDNA *trnL-trnF* e *psbA-trnH* combinadas apresentaram 61 haplótipos para os 69 indivíduos sequenciados. Foram encontrados 34 haplótipos exclusivos das populações ao norte do vale do rio Uruguai e 26 exclusivos das populações ao sul. Somente um haplótipo (H10) foi compartilhado entre os grupos de populações (Figura 5). Alguns desses haplótipos diferiam por mutações em apenas uma ou duas posições, enquanto a maioria mostrou-se mais divergente.

As 75 sequências avaliadas da região nDNA ITS 4 e ITS 5 resultaram em 47 ribotipos, sendo 19 exclusivos do grupo ao norte do vale do rio Uruguai, 24 ribotipos exclusivos do grupo sul e quatro compartilhados entre as populações ao norte e ao sul (H2, H3, H7 e H11) (Figura 6).

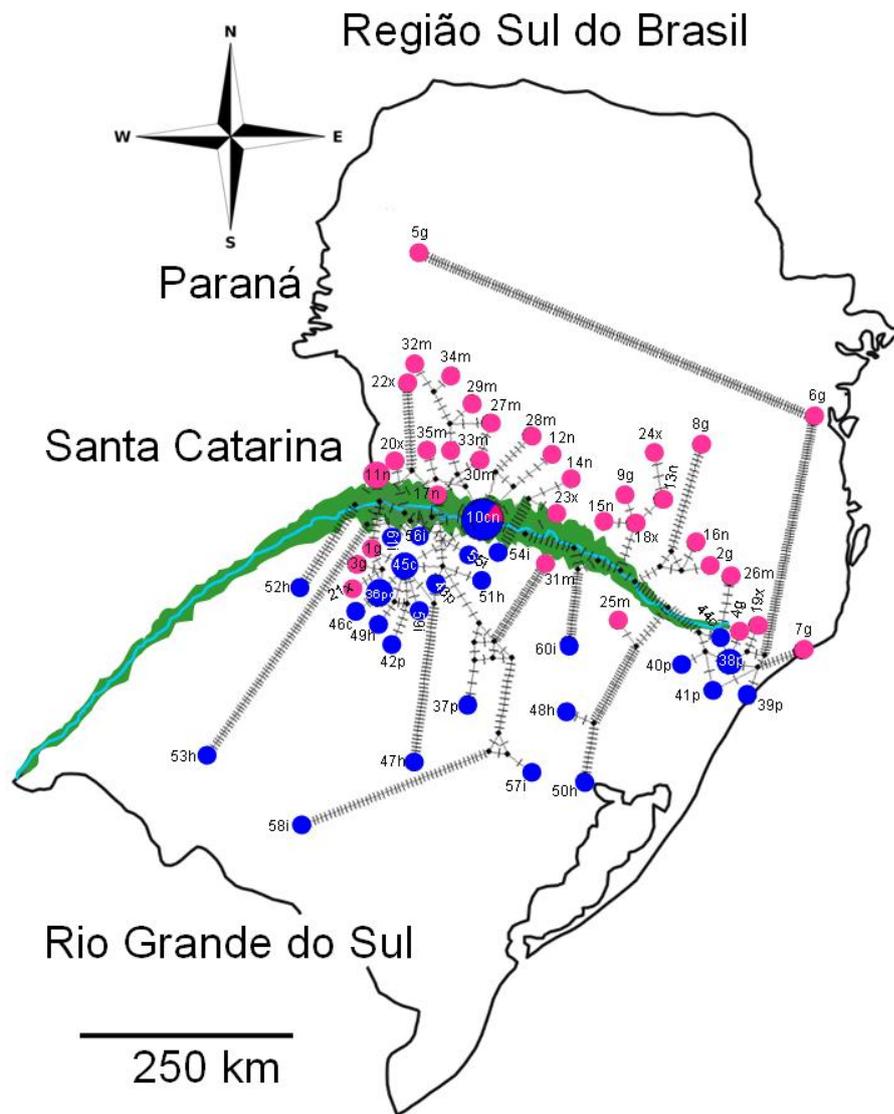


Figura 5. Mapa da Região Sul do Brasil e rede de haplótipos baseada em sequências dos espaçadores intergênicos *trnL-trnF* e *psbA-trnH* concatenadas para 69 indivíduos de oito populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. O tamanho da circunferência é proporcional à frequência do haplótipo. Os pequenos círculos pretos representam os vetores médios. A cor rosa representa os haplótipos encontrados nas populações ao norte do vale do rio Uruguai e a cor azul representa os haplótipos encontrados nas populações ao sul. Os traços transversais as linhas que conectam os haplótipos representam os passos mutacionais que diferenciam os haplótipos. A letra após o número do haplótipo representa a população em que o mesmo pertence: m – Marialva; g – Guarapuava; n – Campos Novos; x – Xanxerê; c – Coxilha; p – Panambi; i – Itapuca; h – Herveiras. Os haplótipos das populações ao norte do vale do rio (rosa) posicionados ao sul do vale são aqueles que apresentam maior relação filogenética com haplótipos ao sul do rio. A área em verde representa o vale do rio Uruguai.

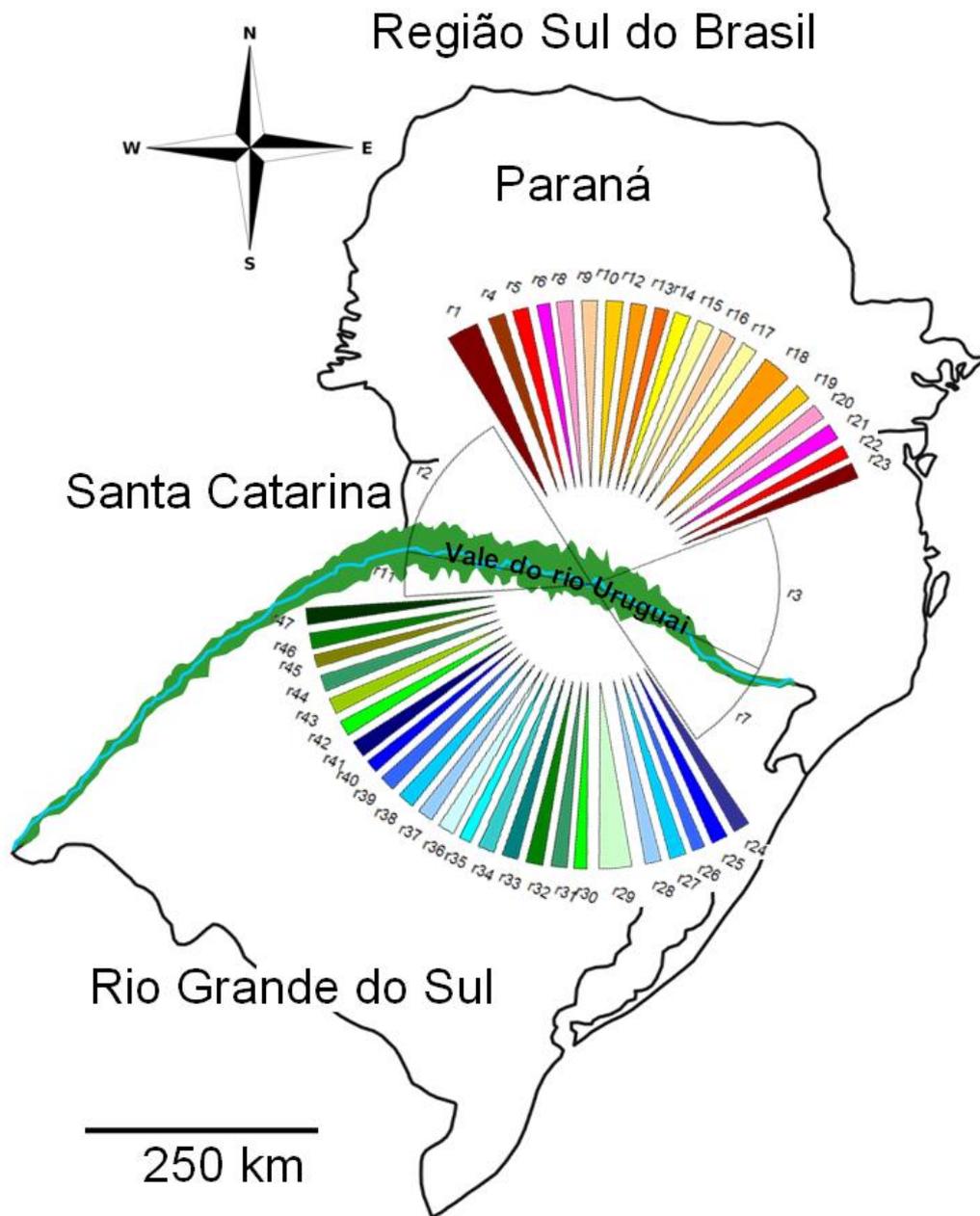


Figura 6. Mapa da Região Sul do Brasil com a distribuição dos ribotipos obtidos a partir da sequência do ITS (*Internal transcribed spacer*) de oito populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. com destaque para o vale do rio Uruguai (em verde), que possivelmente abrigou florestas de galerias durante as últimas eras glaciais. Os ribotipos em branco no gráfico de frequência são os compartilhados entre as populações norte e sul do vale. Os ribotipos coloridos são os exclusivos das populações norte e sul do vale.

Na análise Bayesiana com as sequências de cpDNA, o número de k (clusters; grupos genéticos) foi definido como cinco (Figura 7). Todos os indivíduos pertencentes a uma mesma população ficaram agrupados no mesmo grupo genético, mostrando que as populações

são homogêneas em nível regional. As populações de Coxilha, Itapuca e Herveiras, todas localizadas ao sul do vale do rio Uruguai, ficaram em um mesmo grupo genético (Figura 8). O mesmo ocorreu com as populações de Campos Novos e Xanxerê, localizadas ao norte do vale (Figura 8). As demais populações ficaram individualizadas em diferentes grupos genéticos (Figura 8). Na Tabela 5 são apresentadas as probabilidades posteriores de cada população pertencer a cada um dos grupos genéticos.

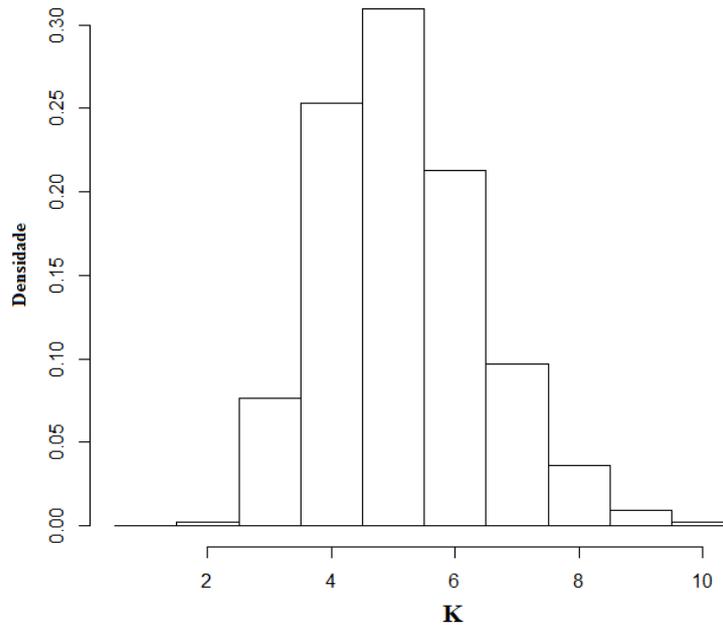


Figura 7. Determinação do número ótimo de K (grupos genéticos) para *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. pelo método Bayesiano.

Tabela 5. Probabilidade posterior de cada população de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. pertencer a cada grupo genético. Os valores sombreados em cinza correspondem ao grupo genético que apresenta a maior probabilidade. Dados obtidos com as regiões *trnL-trnF* e *psbA-trnH* concatenadas.

População	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Guarapuava	0,1650	0,1828	0,1871	0,2898	0,1753
Campos Novos	0,2376	0,2415	0,1814	0,1639	0,1757
Xanxerê	0,1821	0,2112	0,2098	0,2109	0,1860
Marialva	0,1639	0,1732	0,1899	0,1942	0,2788
Panambi	0,2105	0,1743	0,2571	0,1810	0,1771
Coxilha	0,2496	0,2280	0,1871	0,1625	0,1728
Herveiras	0,2169	0,1945	0,1895	0,1970	0,2020
Itapuca	0,2290	0,2208	0,1856	0,1871	0,1775

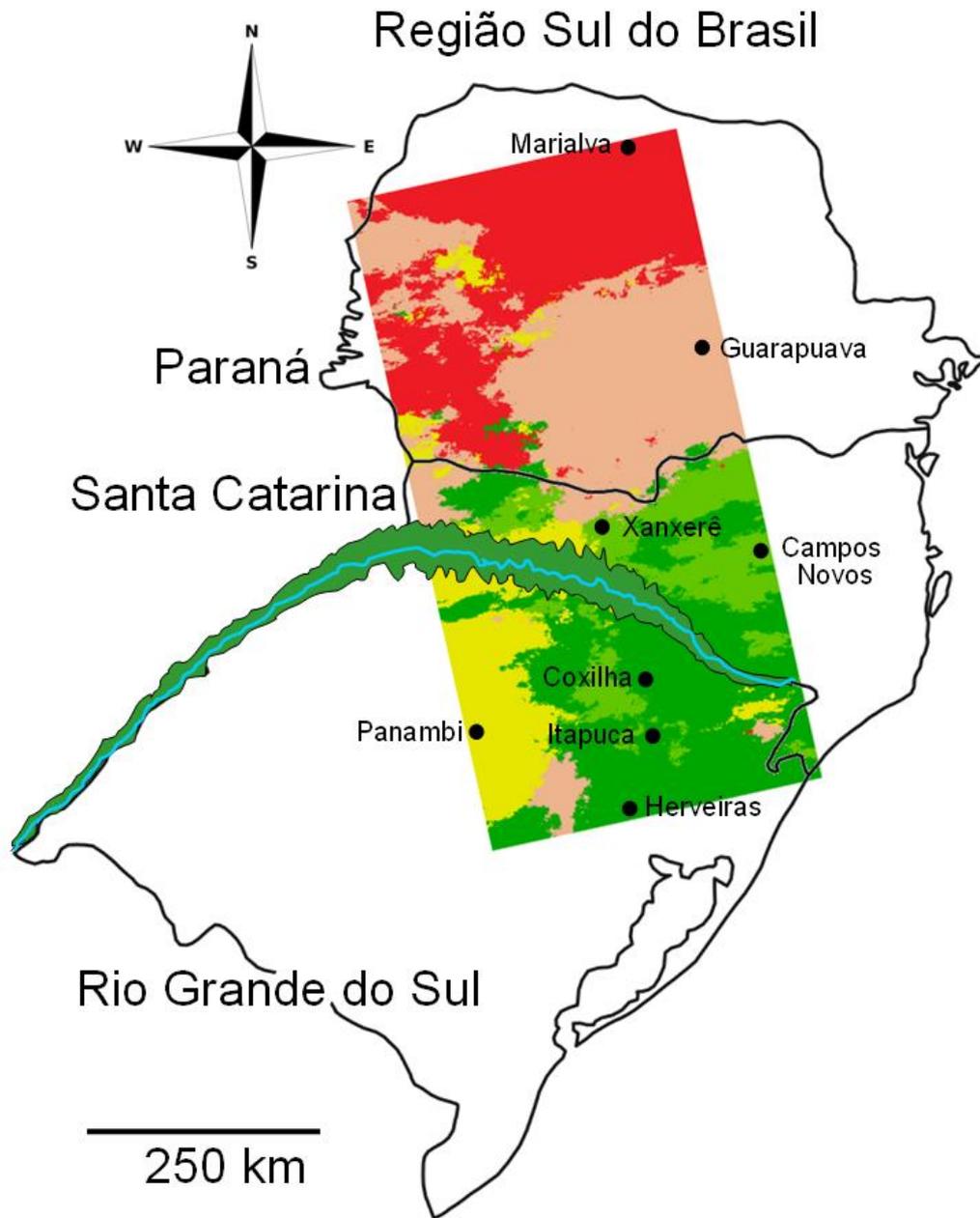


Figura 8. Mapa da Região Sul do Brasil com o posicionamento de oito populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. em cada um dos cinco grupos genéticos (Vermelho, rosa, verde claro, amarelo e verde escuro) inferidos pela análise bayesiana, baseada nas sequências dos espaçadores intergênicos *trnL-trnF* e *psbA-trnH* concatenados. A área em verde contornada por uma linha preta representa o vale do rio Uruguai.

5. DISCUSSÃO

5.1 Diversidade Genética e História Demográfica

As populações de *A. flaccida* possuem alta diversidade haplotípica e nucleotídica para ambas as regiões estudadas (cpDNA e nDNA) (Tabela 3) quando comparada com outras espécies de Asteraceae como *Lychnophora ericoides* $\pi = 0,006 \pm 0,004$ e $Hd = 0,399 \pm 0,044$ baseado no polimorfismo das regiões cloroplastidial (*trnL* intron e *psbA-trnH*) e nuclear (ITS) (COLLEVATTI et al., 2009); *Ligularia hodgsoni* $\pi = 0,00306$ e $Hd = 0,895$ (WANG et al., 2013) e também com espécies de campos como *Tibouchina hatschbachii* $\pi = 0,313 \pm 0,160$ e $Hd = 0,908 \pm 0,012$ ambas avaliadas com três regiões do DNA cloroplastidial (MAIA et al., 2017). Já, quando avaliadas separadamente as populações ao sul e ao norte do vale do rio Uruguai apresentaram alta diversidade haplotípica, porém, baixa diversidade nucleotídica foi observada no grupo de populações do sul do vale. A diversidade genética intrapopulacional (H_s) foi alta para as populações e também para os grupos (norte e sul) avaliados separadamente, corroborando com grande número de haplótipos exclusivos encontrados para cada grupo de populações. Esta alta diversidade genética pode estar relacionada com a história demográfica da espécie no sul da Mata Atlântica que será discutida posteriormente.

A análise de variância molecular demonstrou que a maior diversidade genética é encontrada dentro das populações, o que é característico de espécies pioneiras e alógamas como *A. flaccida* (NYBOM, 2004; TACUATIÁ et al., 2012). Resultados semelhantes foram obtidos para estas mesmas populações de *A. flaccida* utilizando marcadores dominantes (ROSA et al., 2017), reforçando este padrão de distribuição da variabilidade genética para a espécie.

O teste D de Tajima é baseado na diferença entre o número de sítios polimórficos e o número médio de diferenças entre pares de nucleotídeos, demonstrando eventos de expansão populacional (TAJIMA, 1989). Para os testes de neutralidade, valores negativos, significativos e muito elevados são indicativos de uma expansão populacional abrupta (AMZATI et al., 2018). A mesma interpretação é válida para o F_s de F_u (FU 1997), porém o cálculo é baseado na distribuição da frequência dos haplótipos. Os valores observados nas populações de *A. flaccida* para D de Tajima e F_s de F_u foram negativos e significativos, porém, muito próximos a zero (Tabela 3), o que indicaria discreta expansão populacional para *A. flaccida*. Já, os gráficos de distribuição de *mismatch* apresentaram um padrão multimodal o

que é esperado para populações em equilíbrio demográfico (sem expansão) (HARPENDING, 1994). No entanto, os índices de H_{RAG} e SSD, que são utilizados para validar os modelos de expansão demográfica e espacial, apresentaram valores não significativos, ou quando significativos ficaram muito próximos a zero (Tabela 3), rejeitando a hipótese de equilíbrio demográfico para as populações. Esse resultado não significativo fortalece o observado nos testes de neutralidade, que são mais sensíveis na detecção da expansão populacional (RAMOS-ONSINS; ROZAS, 2002). Desse modo, as populações de *A. flaccida* do sul da Mata Atlântica apresentaram crescimento demográfico discreto nos últimos 210 mil anos, sem variações abruptas no aumento ou declínio populacional.

A dinâmica populacional através do tempo mostrada pelo gráfico de BSP (Figura 4) corrobora com os resultados encontrados para os testes de neutralidade, evidenciando um crescimento demográfico discreto, porém contínuo. Apesar de contínuo, a expansão das populações de *A. flaccida* que ocorreu entre 210 e 145 mil anos atrás (intervalo de 65 mil anos) foi proporcionalmente 560% maior que o crescimento que ocorreu nos últimos 145 mil anos (Figura 4). Este intervalo de maior crescimento ocorreu durante o período do Penúltimo Máximo Glacial que corresponde a Glaciação de Riss (para região Alpina) e período Glacial de Illinois (para a América do Norte) e como padrão para o mundo, período MIS 6. Neste intervalo a extensão da camada de gelo foi maior do que durante o Último Máximo Glacial, indicando provável maior frio neste período (EHLERS; GIBBARD, 2004). Esta condição mais fria influenciou na distribuição das espécies sendo que provavelmente as espécies arbóreas foram drasticamente retraídas aos vales de rios. Já, as espécies mais adaptadas ao frio, comuns no sul da Mata Atlântica, podem ter expandido para as regiões abertas (BEHLING, 1997; BEHLING et al.; 2005; BARROS et al., 2015; GIUDICELLI et al., 2019). Neste sentido, esta hipótese pode explicar a maior expansão populacional observada neste trabalho para *A. flaccida* nos períodos mais frios uma vez que a espécie é adaptada a regiões de frio mais intenso.

Outro dado apresentado anteriormente que corrobora com a hipótese de estabilidade das populações de *A. flaccida* durante os últimos períodos glaciais e interglaciais é a alta diversidade genética (Tabela 3). Diversos fatores históricos e contemporâneos podem influenciar na diversidade de populações naturais, porém a persistência de grandes populações em uma determinada região é um dos mais importantes (CARNAVAL et al., 2009). A persistência das populações depende das características biológicas da espécie e da adequação do seu habitat, o que está fortemente relacionada com eventos climáticos históricos e com as características geográficas da região (HEWITT, 2000; CARVALHO et al., 2017). O período

Quaternário foi marcado por grandes oscilações climáticas que podem ter afetado a história evolutiva das espécies, principalmente na Região Sul do Brasil (BEHLING, 2002; WERNECK et al., 2012). Durante os períodos glaciais, a diminuição da temperatura e umidade favoreceram a vegetação de campo, possibilitando a permanência dessas espécies por todo sul da Mata Atlântica e sul do Brasil (BEHLING, 1997; BEHLING et al.; 2005; BARROS et al., 2015; GIUDICELLI et al., 2019). No entanto, durante períodos interglaciais, com o aumento da temperatura e umidade, era esperado a expansão das florestas de Araucária, que estavam em regiões de refúgio, ao longo dos vales dos rios, sobre as áreas de Campos (BEHLING et al., 2004; BEHLING, 2002). Esta situação levaria ao declínio populacional e, conseqüentemente da diversidade genética, das espécies de campo por perda de habitat, situação não observada em *A. flaccida*. Uma hipótese que justifica a não diminuição do tamanho populacional a níveis detectáveis em *A. flaccida* são as características de solo da região sul da Mata Atlântica. Em grande parte das regiões altas do Sul da Mata Atlântica o solo é raso não suportando florestas e isso limitou a expansão das florestas de Araucária sobre as áreas de campo formadas durante os períodos glaciais. Neste sentido, mesmo em períodos interglaciais provavelmente grandes populações de *A. flaccida* foram mantidas no sul da Mata Atlântica o que pode ter garantido a elevada diversidade genética observada nestas populações, e não observação de declínio populacional nestes períodos.

Estudos filogeográficos realizados com outras espécies da Mata Atlântica e adaptadas a regiões mais frias apoiam a constância de populações em grandes áreas geográficas durante as oscilações climáticas do Pleistoceno (JAKOB et al., 2009; COSACOV et al., 2010; PINHEIRO et al., 2011). Como exemplos temos as populações de *Vriesea incurvata* (AGUIAR-MELO et al., 2019), de *Epidendrum fulgens* (PINHEIRO et al., 2011) e de *Eugenia* seção *Phyllocalyx* (BÜNGER et al., 2016). O comportamento das populações destas espécies é diferente do observado para espécies analisadas por diversos autores (BROWN; AB'SABER, 1979; BEHLING; NEGRELLE, 2001; BEHLING, 2002; CARNAVAL; MORITZ, 2008; CARNAVAL et al., 2009) para proposição da hipótese dos refúgios do Pleistoceno para espécies ocorrentes na região Central e Norte da Mata Atlântica. Segundo esta teoria, esses refúgios florestais teriam sido responsáveis por manter o padrão de diversidade e endemismo observado hoje e também, das variações no padrão demográfico histórico das espécies. Assim, para a maioria das espécies estudadas das regiões, para quais foram propostos refúgios por estes autores, há variações abruptas no tamanho populacional ao longo do Pleistoceno como também, populações com diferentes níveis de diversidade genética. Nenhum destes padrões genéticos foram observados para a *A. flaccida*, uma vez que

as populações apresentaram crescimento contínuo durante as oscilações climáticas do Pleistoceno (Figura 4) assim como não apresentaram variação no nível de diversidade genética entre as populações (Tabela 3). Neste sentido, os dados obtidos com *A. flaccida* reforçam aqueles obtidos para demais espécies adaptadas a regiões frias, sugerindo a não limitação destas espécies em refúgios durante as oscilações climáticas do Pleistoceno.

5.2 Estrutura Populacional de *Achyrocline flaccida*

A rede de haplótipos do cpDNA indica estruturação filogeográfica das populações de *A. flaccida* uma vez que dos 61 haplótipos somente um foi compartilhado (Figura 5). Este resultado é reforçado pela alta diferenciação genética observada entre as populações ($\Phi_{PT} = 0,19$). Para o nDNA também foi observado elevado número de ribotipos exclusivos e apenas quatro compartilhados (Figura 6) e também Φ_{PT} muito alto (0,57). A alta diversidade observada aliada ao elevado número de haplótipos e ribotipos exclusivos é um padrão típico de populações que ocorrem por longos períodos (milhares de anos) em um determinado local (BUZATTI et al., 2018) estes resultados corroboram com os dados de estabilidade populacional discutido anteriormente. Ainda, dentre as principais inovações na evolução das angiospermas, está a rápida evolução das plantas herbáceas (ERIKSSON; BREMER, 1992). Por este fato, é provável que estas espécies, possam estar sofrendo uma diferenciação significativa nas suas sequências de DNA (ERIKSSON; BREMER, 1992; HAMRICK, 1996). Além disso, a subclasse Asteridae, a qual pertence *A. flaccida*, possui taxa de diversificação excessivamente alta (KUZOFF; GASSER, 2000). Neste sentido, o alto número de haplótipos exclusivos para as populações *A. flaccida*, provavelmente está relacionado com a estabilidade populacional e com a alta taxa evolutiva da espécie.

A provável alta taxa evolutiva e consequente rápida diferenciação refletiu na estruturação das populações de *A. flaccida*. Isto é constatado quando observamos que com oito populações foram obtidos cinco grupos genéticos (Figura 8). É interessante, que os dois grupos genéticos que incluíram mais de duas populações foram formados somente por populações ao sul ou ao norte do vale do rio Uruguai (Figura 8), indicando uma provável barreira geográfica limitando o contato entre as populações. Rosa et al. (2017) utilizando marcadores ISSR avaliaram a variabilidade e estrutura genética de seis das oito populações de *A. flaccida* analisadas neste estudo, e observaram um padrão de distribuição da variabilidade genética e estruturação semelhante ao encontrado em nosso estudo. Ainda, estes autores,

sugerem que o vale do rio Uruguai pode ter atuado como uma possível barreira entre as populações de *A. flaccida*.

Rio e seus vales têm demonstrado ser barreiras efetivas entre populações podendo levar a diferenciação genética de populações e consequente especiação (PELLEGRINO et al., 2005; TURCHETTO et al., 2014; JIAN et al., 2015; CAZÉ et al., 2016; DA SILVA et al., 2017; PEÇANHA et al., 2017; LI et al., 2019). Para o entendimento do vale do rio Uruguai como uma barreira para as populações de *A. flaccida* devemos considerar a história da vegetação do sul da Mata Atlântica com a presença de refúgios florestais nestas regiões. Porém, a teoria dos refúgios do Pleistoceno proposta para a Mata Atlântica, relata a presença desses refúgios somente até a Região Central da Mata Atlântica (CARNAVAL; MORITZ, 2008; THOMÉ et al., 2014). No entanto, Behling (1997; 2002) e Behling et al. (2004) já relatavam, a partir de estudos paleopolinológicos, a possível presença de florestas de galeria nos vales dos rios no sul da Mata Atlântica. Segundo estes autores, durante os períodos glaciais do Pleistoceno, os vales dos rios permaneceram com maior umidade, constituindo refúgios para as espécies arbóreas. Esta hipótese foi reforçada por Stefenon et al. (2019) que com a avaliação filogeográfica de populações de *A. angustifolia* e modelagem de nicho para a espécie ao longo do Pleistoceno evidenciaram a presença de potenciais refúgios glaciais para espécie no sul da Mata Atlântica coincidindo com a localização do vale do rio Uruguai. Este vale na sua porção central e leste se estende lateralmente da cava do rio por até 5 km em cada margem, o que poderia permitir a ocorrência de florestas contínuas por até 10 km de extensão. Neste sentido, estas florestas formadas por Araucárias e espécies associadas, poderiam formar uma barreira de até 10 km de extensão e altura variando de 20 a 35 metros, o que é de difícil transposição para sementes e pólen de uma espécie herbácea que raramente ultrapassa 1 m de altura como *A. flaccida*. Neste sentido, apesar das populações de *A. flaccida* aparentemente não terem sofrido retração e consequente estruturação devido as oscilações climáticas do Pleistoceno, o vale do rio Uruguai pode ter atuado como uma barreira (formada por Floresta de Araucária) culminando na diferenciação e estruturação genética das populações ao norte e sul deste vale conforme observado.

O fluxo gênico por meio da dispersão de pólen observado entre as populações de Macela aqui avaliadas foi baixo (Tabela 4), possivelmente a barreira gerada pelo vale do rio Uruguai entre as populações seja muito longa para que os polinizadores cruzassem, limitando o fluxo via pólen. Já, o fluxo gênico via sementes foi mais elevado, quando comparado com pólen, provavelmente devido ao fato das sementes de Macela possuírem dispersão anemocórica. No entanto, o hábito herbáceo da planta pode dificultar a sua disseminação por

longas distâncias (CORRÊA JR et al., 2006), principalmente quando da presença de barreiras altas como as Florestas de Araucária o que justificaria a estruturação observada nas populações.

As barreiras geográficas e as oscilações climáticas históricas podem, conjuntamente, moldar a variação e estrutura genética de uma espécie (EVANS et al., 2015). Em nosso estudo foram observados um alto número de haplótipos e ribotipos exclusivos para as populações separadas pelo vale do rio Uruguai, além de alta estruturação e diversidade genética. Neste sentido, nossos dados fortalecem a hipótese levantada por Rosa et al. (2017) que o vale do rio Uruguai atuou como uma barreira geográfica entre as populações de *A. flaccida*. Também, estes dados, ajudam a fortalecer a teoria da existência de grandes áreas com ocorrência de espécies herbáceas de clima frio durante os últimos períodos glaciais no Sul do Brasil.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos relacionados a história demográfica e diversidade genética, demonstraram que as populações de *A. flaccida* apresentaram crescimento contínuo durante as oscilações climáticas do Pleistoceno médio e não apresentaram variações nos seus níveis de diversidade genética, sugerindo que grandes populações de *A. flaccida* foram mantidas no sul da Mata Atlântica durante os últimos períodos glaciais. A alta estruturação populacional e a diversidade genética observada nas populações de *A. flaccida* sugerem que aparentemente suas populações não sofreram retração e consequente estruturação devido as oscilações climáticas do Pleistoceno, mas sim o vale do rio Uruguai, que manteve florestas de Araucária nos períodos glaciais e interglaciais, pode ter atuado como uma barreira geográfica delimitando as populações de *A. flaccida* levando a diferenciação e estruturação genética das suas populações ao norte e sul deste vale. Por fim, os dados obtidos neste estudo auxiliam no entendimento da dinâmica da vegetação do sul da Mata Atlântica nos últimos 200 mil de anos.

7. REFERÊNCIAS

- Achyrocline* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB108819>>. Acesso em: 22/01/2020.
- AGUIAR-MELO, C.; ZANELLA, C. M.; GOETZE, M.; PALMA-SILVA, C.; HIRSCH, L. D.; NEVES, B.; COSTA A. F.; BERED, F. Ecological niche modeling and a lack of phylogeographic structure in *Vriesea incurvata* suggest historically stable areas in the southern Atlantic Forest. *American journal of botany*. v. 106, n. 7, p. 971-983, 2019.
- ALEIXO, A. Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution*, v. 58, n. 6, p. 1303-1317, 2004.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

- ÁLVAREZ, I.; WENDEL, J. F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 29, n. 3, p. 417-434, 2003.
- AMZATI, G. S.; PELLE, R.; MUHIGWA, J. B.; KANDUMA, E. G.; DJIKENG, A.; MADDER, M.; KIRSCHVINK, N.; MARCOTTY, T. Mitochondrial phylogeography and population structure of the cattle tick *Rhipicephalus appendiculatus* in the African Great Lakes region. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 329, p. 329, 2018.
- ANTONELLI, A.; NYLANDER, J. A. A.; PERSSON, C.; SANMARTIN, I. Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 24, p. 9749-9754, 2009.
- ANTONELLI, A.; SANMARTIN, I. Why are there so many plant species in the Neotropics? **Taxon**, v. 60, n. 2, p. 403–414, 2011.
- ANTONELLI, J. A.; QUIJADA-MASCAREÑAS, A.; CRAWFORD, J. A.; BATES, J. M.; VELAZCO, P. M.; WÜSTER, W. Molecular studies and paleogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. In: HOORN, C.; WESSELINGH, G. (Org.). **Amazonia, Landscape and Species Evolution**. Hoboken: Blackwell Publishing, 2010, p. 386–404.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009.
- AVISE, J. C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge: Harvard University press, 2000, 447p.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, s/n, p. 489–522, 1987.
- BACKES, A. Determinação da idade e regeneração natural de uma população de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze em um povoamento florestal localizado no município de Caxias do Sul, RS, Brasil. **Iheringia, Série Botânica (BRAZIL)**, v. 56, s/n, p. 115-130, 2001.
- BADILLO, V. M.; GONZALEZ-SÁNCHEZ, M. Taxonomia de *Achyrocline* (Asteraceae: Gnaphalieae) em Venezuela. **Ernstia**, v. 9, n. 3, p. 187-229, 1999.
- BAI, W. N.; LIAO, W. J.; ZHANG, D. Y. Nuclear and chloroplast DNA phylogeography reveal two refuge areas with asymmetrical gene flow in a temperate walnut tree from East Asia. **New Phytologist**, v. 188, n. 3, p. 892-901, 2010.

- BALDWIN, B. G. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 3-16, 1992.
- BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.
- BARROS, M. J. F.; SILVA-ARIAS, G. A.; FREGONEZI, J. N.; TURCHETTO-ZOLET, A. C.; IGANCI, J. R. V.; DINIZ-FILHO, L. B. F. Environmental drivers of diversity in Subtropical Highland Grasslands. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 17, n. 5, p. 360–368, 2015.
- BATALHA-FILHO, H.; MIYAKI, C. Y. Phylogeography of the Atlantic Forest. **Revista da Biologia**, v. 7, s/n, p. 31-34, 2011.
- BATALHA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, A. M.; CAMPOS, L. A. O.; TAVARES, M. G.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. **Apidologie**, v. 41, n. 5, p. 534-547, 2010.
- BEHLING, H. Late Quaternary vegetation, climate and fire history in the Araucaria forest and campos region from Serra Campos Gerais (Paraná), Brazil. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v.97, n. 1-2, p. 109-121, 1997.
- BEHLING, H. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology**, v. 177, n. 1-2, p. 19–27, 2002.
- BEHLING, H.; NEGRELLE, R. R. B. Tropical rain forest and climate dynamics of the Atlantic lowland, southern Brazil, during the Late Quaternary. **Quaternary Research**, v. 56, n. 3, p. 383-389, 2001.
- BEHLING, H.; PILLAR, V. D.; ORLOÂ, C. I. L.; BAUERMANN, S. G. Late Quaternary Araucaria forest, grassland (Campos), fire and climate dynamics, studied by high-resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambara do sul core in southern Brazil. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 203, n. 3-4, p. 277-297, 2004.
- BEHLING, H.; PILLAR, V. P.; BAUERMANN, S. Late Quaternary grassland (Campos), gallery forest, fire and climate dynamics, studied by pollen, charcoal and multivariate analysis of the São Francisco de Assis core in western Rio Grande do Sul (southern Brazil). **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 133, n. 3-4, p. 235-248, 2005.

- BELL, D. C.; DONOGHUE, M. J. Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. **Organisms, Diversity & Evolution**, v. 5, n. 2, p. 147–159, 2005.
- BORSCH, T.; QUANDT, D. Mutational dynamics and phylogenetic utility of noncoding chloroplast DNA. **Plant Systematics and Evolution**, v. 282, n. 3-4, p. 169–199, 2009.
- BOUCKAERT, R.; HELED, J.; KÜHNERT, D.; VAUGHAN, T.; WU, C-H.; XIE, D.; SUCHARD, M.; RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 4, p. e1003537, 2014.
- BRANDÃO, F. H. P. **Sistemática, estrutura genética de populações e filogeografia de *Euphorbia* sect. *Brasilienses* V.W. Steinh. & Dorsey (Euphorbiaceae)**. 2018, 176 f. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica da Secretária do Meio Ambiente. São Paulo/SP, 2018.
- BRITTEN, R. J.; ROWEN, L.; WILLIAMS, J.; CAMERON, A. R. Majority of divergence between closely related DNA samples is due to indels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 8, p. 4661–4665, 2003.
- BROUSSALIS, A. M.; FERRARO, G. E.; GURNI, A.; COUSSIO, J. D. Phenolic constituents of four *Achyrocline* species. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 16, s/n, p. 401-402, 1988.
- BROWN, K. S.; AB'SABER, A. N. Ice-age refuges and evolution in the neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological and pedological data with modern biological endemism. **Paleoclimas**, n. 5, p. 1-30, 1979.
- BRUMFIELD, R. T.; BEERLI, P.; NICKERSON, D. A.; EDWARDS, S. V. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 5, p. 249–56, 2003.
- BÜNGER, M. O.; MAZINE, F. F.; FOREST, F.; BUENO, M. L.; STEHMANN, J. R.; LUCAS, E. J. The evolutionary history of *Eugenia* sect. *Phyllocalyx* (Myrtaceae) corroborates historically stable areas in the southern Atlantic Forest. **Annals of Botany**. v. 118, s/n, p. 1209–1223, 2016.
- BUZATTI, R. S. D. O.; PFEILSTICKER, T. R.; DE MAGALHÃES, R. F.; BUENO, M. L.; LEMOS-FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. Genetic and historical colonization analyses of an endemic savanna tree, *Qualea grandiflora*, reveal ancient connections between

- Amazonian savannas and Cerrado core. **Frontiers in plant Science**. v. 9, s/n, p. 981, 2018.
- CABANNE, G. S.; D'HORTA, F. M.; SARI, E. H. R.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 3, p. 760–773, 2008.
- CABRERA, A. L. Compositae. In: CABRERA, A. L. **Flora de la Provincia de Jujuy (Argentina)**. Buenos Aires: INTA, 1978, p. 268-275.
- CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C. F.; RODRIGUES, M. T.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 785-789, 2009.
- CARNAVAL, A. C.; MORITZ, C. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 7, p. 1187-1201, 2008.
- CARNAVAL, A. C.; WALTARI, E.; RODRIGUES, M. T.; ROSAUER, D.; VANDERWAL, J.; DAMASCENO, R.; PRATES, I.; STRANGAS, M.; SPANOS, Z.; RIVERA, D.; PIE, M. R.; FIRKOWSKI, C.; BORNSCHEIN, M.; RIBEIRO, L. F.; MORITZ, C. Prediction of phylogeographic endemism in an environmentally complex biome. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 281, n. 1792, p. 20141461, 2014.
- CARON, H.; DUMAS, S.; MARQUE, G.; MESSIER, C.; BANDOU, E.; PETIT, R. J.; KREMER, A. Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 8, p. 1089-1098, 2000.
- CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, E. A. B. **Biogeografia da América do Sul: Padrões & Processos**. São Paulo: Roca, 2011, 328 p.
- CARVALHO, C. S.; BALLESTEROS-MEJIA, L.; RIBEIRO, M. C.; CORTES, M. C.; SANTOS, A. S.; COLLEVATTI, R. G. Climatic stability and contemporary human impacts affect the genetic diversity and conservation status of a tropical palm in the Atlantic Forest of Brazil. **Conservation Genetics**. v. 18, s/n, p. 467–478, 2017.
- CAVALLOTTO, L. J.; VIOLANTE, A. R.; HERNANDEZ-MOLINA, J. F. Geological aspects and evolution of the Patagonian continental margin. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 103, n. 2, p. 346–362, 2011.
- CAZÉ, A. L. R.; MÄDER, G.; NUNES, T. S.; QUEIROZ, L. P.; DE OLIVEIRA, G.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; FREITAS, L. B. Could refuge theory and rivers acting as barriers

- explain the genetic variability distribution in the Atlantic Forest?. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 101, s/n, p. 242-251, 2016.
- CHAGNÉ, D.; BATLEY, J.; EDWARDS, D.; FORSTER, J. W. Single nucleotide polymorphism genotyping in plants. In: GARDINER, S. E.; RIKKERINK, E. H. A.; NIHAL DE SILVA, H. (Org.) **Association mapping in plants**. Nova York: Springer, 2007, p. 77-94.
- CHO, R. J.; MINDRINOS, M.; RICHARDS, D. R.; SAPOLSKY, R. J.; ANDERSON, M.; DRENKARD, E.; DEWDNEY, J.; REUBER, T. L.; STAMMERS, M.; FEDERSPIEL, N.; THEOLOGIS, A.; YANG, W. H.; HUBBELL, E.; AU, M.; CHUNG, E. Y.; LASHKARI, D.; LEMIEUX, B.; DEAN, C.; LIPSHUTZ, R. J.; AUSUBEL, F. M.; DAVIS R. W.; OEFNER, P. J. Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. **Nature genetics**, v. 23, n. 2, p. 203, 1999.
- COLINVAUX, P. A.; OLIVEIRA, P. E.; MORENO, J. E.; MILLER, M. C.; BUSH, M. B.; A long pollen record from lowland Amazonia: forest and cooling in glacial times. **Science**, v. 274, n. 5284, p. 85–88, 1996.
- COLLEVATTI, R. G.; RABELO, S. G.; VIEIRA, R. F. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. **Annals of Botany**, v. 104, n. 4, p. 655-664, 2009.
- COLOMBO, A. F.; JOLY, C. A. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 697-708, 2010.
- CORRÊA JR, C.; SCHEFFER, M. C.; MING, L. C. **Cultivo agroecológico de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Brasília-DF: Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2006, 75 p.
- COSACOV, A.; SERSIC, A. N.; SOSA, V.; JOHNSON, L. A.; COCUCCI, A. A. Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. **Journal of Biogeography**, v. 37, n. 8, p. 1463–1477, 2010.
- DA SILVA, R. E.; MACHADO, R.; RITTER, M. R. Espécies de “macela” utilizadas como medicinais no rio grande do sul. **Pesquisas, Série Botânica**, n. 58, p. 395-406, 2007.
- DA SILVA, W. O.; PIECZARKA, J. C.; FERGUSON-SMITH, M. A.; O'BRIEN, P. C. M.; MENDES-OLIVEIRA, A. C.; SAMPAIO, I.; ...NAGAMACHI, C. Y. Chromosomal diversity and molecular divergence among three undescribed species of *Neacomys*

- (Rodentia, Sigmodontinae) separated by Amazonian rivers. **Public Library of Science One**. v. 12, n. 8, 2017.
- DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.
- DASILVA, M. B.; PINTO-DA-ROCHA, R.; DESOUZA, A. M. História biogeográfica da Mata Atlântica: opiliões (Arachnida) como modelo para sua inferência. In: CARVALHO, C. J. B.; ALMEIDA, E. A. B. (Org.). **Biogeografia da América do Sul: Padrões & Processos**. São Paulo: Roca, 2011, p. 221-238,
- DAVIES, P. Estudios en domesticación y cultivos de especies medicinales y aromáticas nativas. **Serie FPTA-INIA**, n. 11, 2004.
- DEBLE, L. P. **O gênero *Achyrocline* (Less.) DC. (Asteraceae: Gnaphalieae) no Brasil**. 2007, 134 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria/RS, 2007.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, s/n, p. 11-15, 1987.
- DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B.; PYBUS, O. G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular Biology Evolution**, v. 22, n. 5, p. 1185–1192, 2005.
- EHLERS, J.; GIBBARD, P. L. Extent and chronology of glacials. **Quaternary Science Reviews**. v. 22, s/n, p. 1561–1568, 2004.
- ERIKSSON, O.; BREMER, B. Pollination systems, dispersal modes, life forms, and diversification rates in angiosperm families. **Evolution**. v. 46, s/n, p. 258–266, 1992.
- EVANS, L. M.; ALLAN, G. J.; DIFAZIO, S. P.; SLAVOV, G. T.; WILDER, J. A.; FLOATE, K. D.; ROOD, S. B.; WHITHAM, T. G. Geographical barriers and climate influence demographic history in narrowleaf cottonwoods. **Heredity**, v. 114, n. 4, p. 387–396, 2015.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.
- FELINER, G. N.; ROSSELLÓ, J. A. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 44, n. 2, p. 911-919, 2007.

- FERNANDES, A.; COHN-HAFT, M.; HRBEK, T.; FARIAS, I. Rivers acting as barriers for bird dispersal in the Amazon. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 22, n. 4, p. 363-373, 2014.
- FREGONEZI, J. N.; TURCHETTO, C.; BONATTO, S. L.; FREITAS, L. B. Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 171, n. 1, p. 140-153, 2012.
- FU, Y-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, s/n, p. 915–925, 1997.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Relatório Anual 2013**. São Paulo, 2013. Disponível em: < <https://www.sosma.org.br/quem-somos/relatorios-e-balancos/>>. Acesso em: 17/11/2019.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Relatório Anual de Atividades 2017**. São Paulo, 2017. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/wpcontent/uploads/2018/10/AF_RA_SOSMA_2017_web.pdf> Acesso em: 17/11/2019.
- GARCÍA, G.; CAVALLARO, L.; BROUSSALIS, A.; FERRARO, G.; MARTINO, V.; CAMPOS, R. Biological and chemical characterization of the fraction with antiherpetic activity from *Achyrocline flaccida*. **Planta Medica**. v. 65, s/n, p. 343-346, 1999.
- GIANGUALANI, R. N. Las espécies argentinas del género *Achyrocline* (Compositae). **Darwiniana**, v. 20, n. 3-4, p. 549-576, 1976.
- GIUDICELLI, G. C.; TURCHETTO, C.; SILVA-ARIAS, G. A.; FREITAS, L. B. Influence of climate changes on the potential distribution of a widespread grassland species in South America. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 41, s/n, p. 125496, 2019.
- GUILLOT, G.; SANTOS, F. Using AFLP markers and the Geneland program for the inference of population genetic structure. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 6, p. 1082–1084, 2010.
- HAFFER, J. Speciation in Amazonian forests birds. **Science**, v. 165, n. 3889, p. 131–137, 1969.
- HALL, T. **BioEdit Sequence Alignment Editor for Windows 95**. 2005.
- HAMBY, R. K.; ZIMMER, E. A. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. In: SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; DOYLE, J. J. (Org.). **Molecular Systematics of Plants**. Nova York: Chapman and Hall, 1992, p. 50-91.

- HAMRICK, J. L. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. v. 351, s/n, p. 1291–1298, 1996.
- HAO, D. C.; CHEN, S. L.; XIAO, P. G.; PENG, Y. Authentication of medicinal plants by DNAbased markers and genomics. *Chinese Herbal Medicine*. v. 2, n. 4, p. 250–261, 2010.
- HARPENDING, H. C. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, s/n, p. 591–600, 1994.
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. Porto Alegre: Artmed Editora. 2010.
- HEWITT, G. M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 58, n. 3, p. 247–276, 1996.
- HEWITT, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, v. 405, n. 6789, p. 907–913, 2000.
- HUGHES, C.; EASTWOOD, R. Island radiation on a continental scale: exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 27, p. 10334–10339, 2006.
- IBGE. Mapa de biomas do Brasil. 2004.
- JAKOB, S. S.; MARTINEZ-MEYER E.; BLATTNER, F. R. Phylogeographic analyses and paleodistribution modeling indicate Pleistocene *in situ* survival of *Hordeum* species (Poaceae) in southern Patagonia without genetic or spatial restriction. *Molecular Biology and Evolution*. v. 26, s/n, p. 907–923, 2009.
- JEHAN, T.; LAKHANPAUL, S. Single nucleotide polymorphism (SNP)–methods and applications in plant genetics: a review. *Indian Journal of Biotechnology*. v. 5, s/n, p. 435–459, 2006.
- JIAN, H. Y.; TANG, K. X.; SUN, H. Phylogeography of *Rosa soulieana* (Rosaceae) in the Hengduan Mountains: refugia and 'melting' pots in the Quaternary climate oscillations. *Plant Systematics and Evolution*. v. 301, s/n, p. 1819–1830, 2015.
- KASS, R. E.; RAFTERY, A. E. Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association*, v. 90, n. 430, p. 773–795, 1995.
- KELCHNER, S. A.; THOMAS, M. A. Model use in phylogenetics: nine key questions. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 22, n. 2, p. 87–94, 2007.
- KUZOFF, R. K.; GASSER, C. S. Recent progress in reconstructing angiosperm phylogeny. *Trends in Plant Science*. v. 5, s/n, p. 330–336, 2000.

- LI, Y.; SONG, F.; ZHANG, X.; LV, G. Phylogeography suggest the Yili Valley being the glacial refuge of the genus *Ixiolirion* (Amaryllidaceae) in China. **Systematics and Biodiversity**. v. 17, n. 4, p. 385-401, 2019.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.
- LU, X.; CHEN, H.; WEI, S.; BIN, X.; YE, Q.; TANG, S. Chloroplast and nuclear DNA analyses provide insight into the phylogeography and conservation genetics of *Camellia nitidissima* (Theaceae) in southern Guangxi, China. **Tree Genetics & Genomes**. v. 16, n. 1, p. 8, 2020.
- LÜTHI, D. et al. High-resolution carbon dioxide concentration record 650,000–800,000 years before present. **Nature**. v. 453, n. 7193, p. 379–382, 2008.
- MAIA, F. R.; ZWIENER, V. P.; MOROKAWA, R.; PEREIRA, V. S.; GOLDENBERG, R. Phylogeography and ecological niche modelling uncover the evolutionary history of *Tibouchina hatschbachii* (Melastomataceae), a taxon restricted to the subtropical grasslands of South America. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 183, n. 4, p. 616–632, 2017.
- MANDEL, J. R.; DIKOW, R. B.; SINISCALCHI, C. M.; THAPA, R.; WATSON, L. E.; FUNK, V. A. A fully resolved backbone phylogeny reveals numerous dispersals and explosive diversifications throughout the history of Asteraceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 116, n. 28, p. 14083-14088, 2019.
- 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**, v. 104, n. 3, p. 499-509, 2011.
- MAZZELLA, C.; RODRÍGUEZ, M.; VAIO, M.; GAIERO, P.; LÓPEZ-CARRO, B.; SANTIÑAQUE, F. F.; FOLLE, G. A.; GUERRA, M. Karyological features of Achyrocline (Asteraceae, Gnaphalieae): Stable karyotypes, low DNA content variation and linkage of rRNA genes. **Cytogenetic and genome research**, v. 128, n. 1-3, p. 169-176, 2010.
- MITTELBACH, G. G.; SCHEMSKE, D. W.; CORNELL, H. V.; et al. Evolution and the latitudinal diversity gradient: speciation, extinction and biogeography. **Ecology Letters**. v. 10, n. 4, p. 315-331, 2007.
- MORLEY, R. J. **Origin and evolution of tropical rain forests**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2000. 378 p.

- MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853, 2000.
- NEW ENGLAND BIOLABS. **DNA Precipitation: Ethanol vs. Isopropanol**. Disponível em: <<https://bitesizebio.com/2839/dna-precipitation-ethanol-vs-isopropanol/>> Acesso em: 30/10/2019.
- NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 5, p. 1143-1155, 2004.
- PATTON, J. L.; DA SILVA, M. N. F.; MALCOL, M. J. R. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon basin: a test of the riverine barrier hypothesis. **Evolution**, v. 48, n. 4, p. 1314–1323, 1994.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537-2539, 2012.
- PEÇANHA, W. T.; ALTHOFF, S. L.; GALIANO, D.; QUINTELA, F. M.; MAESTRI, R.; GONÇALVES, G. L.; FREITAS, T. R. Pleistocene climatic oscillations in Neotropical open areas: Refuge isolation in the rodent *Oxymycterus nasutus* endemic to grasslands. **PLoS ONE**, v. 12, n. 11, p. e 0187329, 2017.
- PEIXOTO, A. L.; LUZ, J. R. P.; BRITO, M. A. **Conhecendo a Biodiversidade**. Brasília: MCTIC, CNPq, PPBio, 2016.
- PELLEGRINO, K. C.; RODRIGUES, M. T.; WAITE, A. N.; MORANDO, M.; YASSUDA, Y. Y.; SITES JR, J. W. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society**. v. 85, n. 1, p. 13-26, 2005.
- PINHEIRO, F.; BARROS, F.; PALMA-SILVA, C.; FAY, M. F.; LEXER, C.; COZZOLINO, S. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. **Journal of Biogeography**. v. 38, s/n, p. 1923–1935, 2011.
- PREMOLI, A. C.; MATHIASSEN, P.; KITZBERGER, T. Southern-most *Nothofagus* trees enduring ice ages: genetic evidence and ecological niche retrodiction reveal high latitude (54 S) glacial refugia. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 298, n. 3-4, p. 247-256, 2010.

- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**, v. 67, n. 5, p. 901-904, 2018.
- RAMOS-ONSINS, S. E.; ROZAS, J. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 12, p. 2092–2100, 2002.
- RESENDE-MOREIRA, L. C.; VASCONCELOS, P. N.; SOUTO, A. P.; MENEZES, A. P. A.; LEMOS-FILHO, J. P.; LOVATO, M. B. East-west divergence in central Brazilian Cerrado revealed by cpDNA sequences of a bird-dispersed tree species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 70, s/n, p. 247-253, 2017.
- RETTA, D.; GATTUSO, M.; GATTUSO, S.; LIRA, P. D. L.; BAREN, C. V.; FERRARO, G.; BANDONI, A. Essential oil composition of *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC.(Asteraceae) from different locations of Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 12, p. 877-881, 2008.
- ROSA, J.; WEBER, G. G.; CARDOSO, R.; GÓRSKI, F.; DA-SILVA, P. R. Variability and population genetic structure in *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC., a species with high value in folk medicine in South America. **PloS One**, v. 12, n. 8, p. e 0183533, 2017.
- RUZZANTE, D. E.; RABASSA, J. Palaeogeography and palaeoclimatology of Patagonia: effects on biodiversity. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 103, n. 2, p. 221–228, 2011.
- SAFFORD, H. D. Brazilian Páramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. **Journal of Biogeography**, v. 26, n. 4, p. 693-712, 1999.
- SANG, T.; CRAWFORD, D. J.; STUESSY, T. F. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American journal of Botany*, v. 84, s/n, p. 1120-1136, 1997.
- STEFENON, V. M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. Genetic structure of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) in Brazil: implications for the *in situ* conservation of genetic resources. **Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 516–525, 2007.
- STEFENON, V. M.; GAILING, O.; FINKELDEY, R. The role of gene flow in shaping genetic structures of the subtropical conifer species *Araucaria angustifolia*. **Plant Biology**, v. 10, n. 3, p. 356–364, 2008.
- STEFENON, V. M.; KLABUNDE, G.; LEMOS, R. P. M.; ROGALSKI, M.; NODARI, R. O. Phylogeography of plastid DNA sequences suggests post-glacial southward demographic expansion and the existence of several glacial refugia for *Araucaria angustifolia*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 2752, 2019.

- STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Disponível em:<
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>>. Acesso em:
 20/11/2019.
- TABERLET, P.; GIELLY, L.; PAUTOU, G.; BOUVET, J. Universal primers for
 amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. **Plant Molecular Biology**,
 v. 17, n. 5, p. 1105-1109, 1991.
- 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.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA
 polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585–595, 1989.
- TEIXEIRA, H. F.; BASSANI, V. L. Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos
 sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos
 nebulizados de *Achyrocline satureioides* (LAM) D.C. – Compositae – Marcela. **Caderno
 de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 151-152, 1997.
- THOMÉ, M. T. C.; ZAMUDIO, K. R.; HADDAD, C. F.; ALEXANDRINO, J. Barriers,
 rather than refugia, underlie the origin of diversity in toads endemic to the Brazilian
 Atlantic Forest. **Molecular Ecology**, v. 23, n. 24, p. 6152-6164, 2014.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the
 sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,
 position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 11,
 n. 22, p. 4673-4680, 1994.
- TURCHETTO, C.; FAGUNDES, N. J. R.; SEGATTO, A. L. A.; KUHLEMEIER, C.; SOLÍS-
 NEFFA, V. G.; SPERANZA, P. R.; BONATTO, S. L.; FREITAS, L. B. Diversification in
 the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread
Petunia axillaris complex (Solanaceae). **Molecular Ecology**. v. 23, p. 374 –389, 2014.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C.
 Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America.
Molecular Ecology, v. 22, n. 5, p. 1193–1213, 2013.
- VENDRUSCOLO, G. S.; MENTZ, L. A. Estudo da concordância das citações de uso e
 importância das espécies e famílias utilizadas como medicinais pela comunidade do
 bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 20, s/n, p.
 367-382, 2006.

- WALLACE, A. R. On the monkeys of the Amazon. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v. 14, n. 84, p. 451-454, 1852.
- WANG, J. F.; GONG, X.; CHIANG, Y. C.; KURODA, C. Phylogenetic patterns and disjunct distribution in *Ligularia hodgsonii* Hook. (Asteraceae). **Journal of Biogeography**, v. 40, n. 9, p. 1741-1754, 2013.
- WANG, M.; ZHAO, H. X.; WANG, L.; WANG, T.; YANG, R. W.; WANG, X. L.; ZHOU, Y. H.; DING, C. B.; ZHANG, L. Potential use of DNA barcoding for the identification of *Salvia* based on cpDNA and nrDNA sequences. **Gene**, v. 528, n. 2, p. 206-215, 2013.
- WERNECK, F. P.; NOGUEIRA, C.; COLLI, G. R.; SITES, J. W.; COSTA, G. C. Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. **Journal of Biogeography**, v. 39, n. 9, p. 1695-1706, 2012.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. J. W. T.; TAYLOR, J. L. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Org). **PCR protocols: A Guide to Methods and Applications**, v. 18, n. 1, 1990, 482 p.
- WOLFE, K. H.; LI, W. H.; SHARP, P. M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 24, p. 9054–9058, 1987.
- ZHAO, X. L.; GAO, X. F.; ZHU, Z. M.; GAO, Y. D.; XU, B. The demographic response of a deciduous shrub (the *Indigofera bungeana* complex, Fabaceae) to the Pleistocene climate changes in East Asia. **Scientific Reports**. v. 7, n. 1, p. 697, 2017.