



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

YURI KATAOKA SILVA

HISTÓRIA EVOLUTIVA DE *Baccharis crispa* Spreng. NO SUL DO BRASIL

GUARAPUAVA
2021

YURI KATAOKA SILVA

HISTÓRIA EVOLUTIVA DE *Baccharis crispa* Spreng. NO SUL DO BRASIL

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Da Silva

GUARAPUAVA

2021

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

S586h Silva, Yuri Kataoka
História evolutiva de *Baccharis crispa Spreng.* no sul do Brasil / Yuri
Kataoka Silva. -- Guarapuava, 2021.
vi, 41 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, em
Associação Ampla com UEPG, Programa de Pós-Graduação em Biologia
Evolutiva. Área de Concentração: Biologia Evolutiva, 2021.

Orientador: Paulo Roberto Da Silva
Banca examinadora: Luciana Cristina Vitorino, Rogério Pincela Mateus,
Renata Mussoi Giacomini

Bibliografia

1. Mata Atlântica. 2. Floresta com Araucária. 3. Campos de altitude. 4.
Filogeografia. 5. Barreira Geográfica. 6. DNA Cloroplastidial. 7. DNA
Nuclear. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva.

CDD 575

AGRADECIMENTOS

Ao professor Paulo Roberto, meu orientador e “pai científico”, por me apresentar a genética e a biologia molecular, por me aceitar em seu laboratório no qual pude ter a melhor experiência possível na construção do meu conhecimento na área, a qual considero como à “ciência do futuro”. Sou eternamente grato por todo o ensinamento que me proporcionou, por possibilitar minha participação em congressos ímpares e por me permitir realizar pesquisas com ferramentas de ciência de fronteira. Agradeço também por todo ensinamento no âmbito pessoal como conselhos, perspectivas e repreensões. Obrigado por ser meu guia e ampliar minha visão do mundo.

Aos meus pais, Adriana e Denny, por todo o apoio durante essa jornada, buscando sempre me incentivar e auxiliar em momentos de dificuldades. Às minhas irmãs, Nicole e Irina, por acreditarem em mim e me motivarem a me tornar uma pessoa melhor.

A todos os meus colegas de laboratório e colegas do mestrado, em especial Laura e Felipe, vocês me ensinaram e me ajudaram muito, vocês fazem parte desse trabalho.

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.

RESUMO

História evolutiva de *Baccharis crispa* Spreng. no sul do Brasil. Yuri Kataoka Silva. A Mata Atlântica está entre os biomas de maior diversidade do mundo. Boa parte de rica biodiversidade é devida a grande variação de latitude ocupada por este bioma. No sul da Mata Atlântica estão formações vegetacionais que são típicas de regiões de clima mais ameno, como a Floresta Ombrófila Mista (Floresta com Araucárias) e os campos de altitude. Nestes campos estão espécies adaptadas a clima mais frio e seco, com presença de temperaturas negativas nos meses mais frios do ano. Inúmeros estudos foram realizados sobre a história evolutiva de espécies ocorrentes na Mata Atlântica, ajudando a esclarecer a origem e diversificação deste bioma ao longo do tempo. Porém, estes tipos de estudos são escassos com espécies vegetais de maior abundância, ou mesmo endêmicas, das regiões frias do sul da Mata Atlântica. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo o estudo da história evolutiva de populações de *Baccharis crispa* Spreng Asteraceae do Sul do Mata Atlântica. Para o estudo foram obtidas sequências das regiões do genoma cloroplastidial (*trnL-trnF* e *psbA-trnH*) e nuclear (ITS) de indivíduos de seis populações coletadas nos municípios de Guarapuava, no Paraná, Joaçaba e Xanxerê, em Santa Catarina, e Coxilha, Panambi e Herveiras, no Rio Grande do Sul. Destas populações, as dos estados do PR e SC estão localizadas ao norte do vale do Rio Uruguai e as do RS ao sul do vale. Os resultados obtidos evidenciaram alta diversidade nucleotídica e haplotípica quando comparada com outras espécies de Asteraceae da Mata Atlântica. A avaliação dos resultados dos testes de neutralidade, do *Bayesian Skyline Plot*, da distribuição *mismatch* e das significâncias estatísticas dos índices SSD e H_{RAG} evidenciaram discreta expansão populacional nos últimos 200 mil anos, com possível expansão demográfica das populações do norte para o sul do vale do rio Uruguai. Foi observada alta estrutura filogeográfica para *B. crispa* e elevado número de haplótipos e ribotipos exclusivos nas populações ao norte e ao sul do vale do rio Uruguai. A análise de grupos genéticos mostrou que a diversidade genética é melhor explicada considerando quatro grupos genéticos, sendo dois formados pelas populações ao norte do vale do rio Uruguai e dois pelas populações ao sul do vale. A análise conjunta dos dados deste estudo corroboram que o vale do rio Uruguai pode ter atuado como uma barreira geográfica limitando o fluxo gênico entre as populações de *B. crispa* do sul da Mata Atlântica. Ainda, a alta diversidade das populações e a estabilidade populacional nos últimos 200 mil anos evidenciam a permanência de *B. crispa* no Sul do Brasil durante os últimos períodos glaciais.

Palavras-chave: Mata Atlântica; Floresta com Araucária; Campos de altitude; Filogeografia; Barreira Geográfica; DNA Cloroplastidial; DNA Nuclear.

ABSTRACT

Evolutionary history of *Baccharis crispa* Spreng. in southern Brazil. Yuri Kataoka Silva.

The Atlantic Forest is among the most diverse biomes in the world. Much of the rich biodiversity of this biome is due to the wide range of latitude occupied by this. In the south of the Atlantic Forest there are vegetation formations that are typical of regions with a milder climate, such as the Araucaria Forest and the ancient grassy fields (Campos de Altitude). In these ancient grassy fields are species adapted to a colder and drier climate, with the presence of negative temperatures in the coldest months of the year. Numerous studies have been carried out on the evolutionary history of species occurring in the Atlantic Forest, helping to clarify the origin and diversification of this biome over time. However, these types of studies are scarce with plant species of greater abundance, or even endemic, from the cold regions of the southern Atlantic Forest. In this sense, this work aimed to study the evolutionary history of populations of *Baccharis crispa* Spreng Asteraceae from the South of the Atlantic Forest. For the study, sequences were obtained from the chloroplast (*trnL-trnF* and *psbA-trnH*) and nuclear (ITS) genome regions of individuals from six populations collected in the county of Guarapuava, in Paraná state, Joaçaba and Xanxerê, in Santa Catarina state, and Coxilha, Panambi and Herveiras, in Rio Grande do Sul. Of these populations, those from the states of PR and SC are located to the north of the Uruguay River valley and those from RS to the south of the valley. The results obtained showed high nucleotide and haplotype diversity when compared to other species of Asteraceae from the Atlantic Forest. The evaluation of the results of the neutrality tests, the Bayesian Skyline Plot, the mismatch distribution and the statistical significance of the SSD and H_{RAG} indices showed a slight population expansion in the last 200 thousand years, with possible demographic expansion of populations from the north to the south of the valley of the Uruguay river. A high phylogeographic structure was observed for *B. crispa* and a high number of unique haplotypes and ribotypes in populations from north and south of the Uruguay river valley. The analysis of genetic groups showed that genetic diversity is better explained considering four genetic groups, two formed by populations north of the Uruguay River valley and two by populations south of the valley. The overall analysis of the data from this study corroborates that the Uruguay River valley may have acted as a geographic barrier limiting the gene flow between populations of *B. crispa* from the southern Atlantic Forest. Furthermore, the high diversity of populations and population stability over the last 200,000 years evidence the permanence of *B. crispa* in southern Brazil during the last glacial periods.

Keywords: Atlantic Forest; Araucaria Forest; Campos de Altitude; Phylogeography; Geographical barrier; Chloroplastid DNA; Nuclear DNA.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	05
1.1. Filogeografia da Mata Atlântica	05
1.2. História evolutiva da vegetação do Sul do Brasil	07
1.3. <i>Baccharis crispa</i> Spreng.....	09
2. OBJETIVOS	11
2.1. Objetivo geral	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Material Vegetal	12
3.2. Extração do DNA	13
3.3. Amplificação por PCR e Sequenciamento	13
3.4. Edição e Alinhamento das Sequências	15
3.5. Análises Estatísticas	15
4. RESULTADOS	17
4.1. Diversidade Genética e História Demográfica	17
4.2. Rede de Haplótipos e Estrutura Populacional	22
5. DISCUSSÃO	26
5.1. Diversidade Genética e História Demográfica	26
5.2. Estrutura Populacional de <i>Baccharis crispa</i>	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1. Filogeografia da Mata Atlântica

O continente Sul-Americano abriga a maior biodiversidade do planeta, composto por uma variedade de biomas (MYERS et al., 2000), no qual destaca-se a Mata Atlântica pela sua notável diversidade biológica e uma variedade de formações vegetacionais (MYERS et al., 2000; MARCHESE, 2015). No entanto, a reconstrução dos processos evolutivos na diversificação dessas regiões tem se mostrado uma tarefa desafiadora devido a pequena porção de espécies estudadas em um contexto evolutivo (THOMÉ et al., 2014).

Estudos de Filogeografia têm revelado padrões e processos históricos responsáveis pela distribuição histórica de organismos em diversos biomas, pois permitem testar hipóteses biogeográficas e até mesmo inferir processos demográficos históricos de uma espécie (AVISE et al., 1987; AVISE, 2000). Os marcadores moleculares baseados em sequenciamento são a melhor ferramenta para estudos filogeográficos, pois são fontes de variação genética e permitem avaliar o polimorfismo com base na sequência de nucleotídeos (JEHAN; LAKHANPAUL, 2006; CHO et al., 1999; BRUMFIELD et al., 2003). As sequências do espaçador interno transcrito (ITS) do marcador nuclear (nDNA) são utilizadas em estudos filogenéticos de plantas desde a década 1990 (HAMBY; ZIMMER, 1992; BALDWIN, 1992), no entanto, as sequências não codificantes do DNA cloroplastidial (cpDNA) têm sido a classe preferencial para estudos evolutivos. Esta escolha está baseada na evolução mais lenta destas regiões tornando-as ideais para medidas filogenéticas (RESENDE-MOREIRA et al., 2017; BORSCH; QUANDT, 2009; BAI et al., 2010). Ademais, a utilização combinada de cpDNA e nDNA podem fornecer melhor compreensão dos processos evolutivos que compõe a história de uma espécie (BRITTEN et al., 2003).

A Mata Atlântica é caracterizada por uma elevada biodiversidade e riqueza natural, considerada um *hotspot* de biodiversidade. Este bioma compõe a segunda maior floresta do continente americano, abrangendo 17 estados do território brasileiros (TABARELLI et al., 2005; VARJABEDIAN, 2010; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, 2013). Considerada a formação florestal mais antiga do Brasil, estudos apontam a formação da Mata Atlântica a partir do fim do Cretáceo, há aproximadamente 65 milhões de anos (COLOMBO; JOLY, 2010). Mas sua história evolutiva está associada a eventos de sucessão de grandes eventos geológicos e mudanças climáticas que modificaram continentes e oceanos, criando cenários distintos para a diversificação das espécies (COLINVAUX et al., 1996; BEHLING, 2002; ANTONELLI; SANMARTIN, 2011; CAVALLOTTO; VIOLANTE, 2011). Dentre estes

eventos, é possível destacar o soerguimento da Cordilheira dos Andes que desencadeou episódios geomorfológicos e climáticos, formando uma barreira abiótica, e as mudanças climáticas terciárias e quaternárias, que influenciaram a distribuição espacial de espécies e ambientes em todo o mundo, atuando como um motor de diversificação em regiões temperadas e tropicais (ANTONELLI et al., 2009; HEWITT, 1999; HEWITT, 2004). 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). Aleixo (2004) e Fernandes et al. (2014) sugerem a atuação do rio Amazonas como barreira promovendo especiação alopátrica. Diante disso, a história geológica dinâmica e complexa da América do Sul é de grande importância para a compreensão das origens da sua atual biodiversidade (CARVALHO; ALMEIDA, 2011; RUZZANTE; RABASSA, 2011).

A estabilidade climática de longo prazo e isolamento geológico observado na América do Sul favoreceram o acúmulo gradativo de biodiversidade (MITTELBAACH et al., 2007). As florestas tropicais eram mais extensas há cerca de 10 milhões de anos, durante o Mioceno Médio, mas, 5 milhões de anos depois, a partir do Plioceno, ciclos glaciais promovendo redução de umidade e temperatura levaram a expansão de áreas de savana, que correspondem os biomas Cerrado Caatinga e Chaco. Estes biomas formaram uma diagonal seca isolando a Mata Atlântica das demais florestas, iniciando uma evolução independente desse bioma (DASILVA et al., 2011), o qual passou por diversas mudanças em sua conformação durante as glaciações do Pleistoceno. Neste período muitas espécies migraram para latitudes mais baixas, porém outras moveram-se para refúgios, levando a fragmentação na distribuição de populações e desencadeando especiação em regiões florestadas, conhecida como hipótese de refúgio (DUMOLIN-LAPÉGUE et al., 1997; HAFFER, 1969; WHITMORE; PRANCE, 1987; RULL et al., 2008).

No paleomodelo proposto por Carnaval e Moritz (2008), na Mata Atlântica os refúgios estavam restritos ao norte do bioma, principalmente em áreas costeiras, enquanto em latitudes mais altas as florestas quase foram eliminadas por contrações florestais. Sendo assim, as formações florestais ao sul teriam sido colonizadas a partir da expansão de refúgios do norte do bioma durante o Holoceno (THOMÉ et al., 2014). As regiões ao norte e centro da Mata Atlântica teriam mantido a estabilidade populacional ao longo dos últimos 21.000 anos em um ambiente mais úmido, constituindo refúgios florestais durante o Último Máximo Glacial (UMG). A existência desses refúgios vem sendo bem documentada, porém principalmente para espécies tropicais e animais (CARNAVAL; MORITZ, 2008; CARNAVAL et al., 2009;

CABANNE et al., 2008; BATALHA-FILHO et al., 2010). No entanto, cada espécie possui características próprias, e as mudanças na sua distribuição geográfica e estrutura genética podem responder de maneiras diferentes às oscilações climáticas do Quaternário (BATALHA-FILHO; MIYAKI, 2011). E a menor disponibilidade de estudos de espécies subtropicais em comparação dados em biomas de países mais desenvolvidos possivelmente vêm dificultando a identificação de refúgios ao sul da Mata Atlântica, porém estudos mais recentes mostram prováveis ocorrências de refúgios para a região (STEFENON et al., 2019).

1.2. História evolutiva da vegetação do Sul do Brasil

A região sul da Mata Atlântica apresenta clima subtropical, principalmente nas terras altas, apresentando predominância de Floresta Ombrófila Mista e Campos de Altitude (REITZ; KLEIN, 1966). A Floresta Ombrófila Mista é caracterizada principalmente pela presença da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, uma espécie de conífera endêmica da Mata Atlântica subtropical e das terras altas do Sudeste do Brasil, além de pequenas manchas florestais na Argentina e Paraguai (HEITZ; KLEIN, 1966; LUNA; FONTANA, 2017). Os Campos de Altitude, que geralmente ocorrem em associação com a Floresta Ombrófila Mista (BACKES, 2001), são caracterizados pela presença de gramíneas, pequenos arbustos e herbáceas, representados principalmente pela presença das famílias Iridaceae, Poaceae, Oxalidaceae e Asteraceae (SAFFORD, 1999). Composto por diversas espécies adaptadas a baixa temperatura e umidade, a diversidade e estrutura populacional nos campos pode ter sido impulsionada por ciclos de expansão e retração durante as mudanças climáticas do Quaternário (BARBOSA et al., 2012; COLLEVATTI et al., 2012; BONATELLI et al., 2014).

O mosaico formado na Mata Atlântica no sul do Brasil pela presença da Floresta com Araucárias e Campos de Altitude forma um ecótono que parece estar presente nesta região a milhares de anos. Estudos paleopalinológicos realizados por Behling (1997) indicaram a presença de pólen de Araucária em áreas próximas dos rios durante os períodos glaciais. Um estudo recente de modelagem da distribuição de Araucária há 20.000 anos atrás revelou áreas de possíveis ocorrências da espécie no sul do Brasil, formando assim possíveis refúgios glaciais para espécies arbóreas no sul da Mata Atlântica, sendo um deles o vale do rio Uruguai (STEFENON et al., 2019). Também, em estudos paleopalinológicos foram encontrados pólen de inúmeras espécies de gramíneas nestes períodos no Sul do Brasil (BEHLING, 1997; BEHLING, 2002), inclusive nas áreas onde também estavam presentes pólen de Araucária (BEHLING, 1997). Estes achados comprovam que os ecótonos

relacionados a Floresta com Araucária e os Campos de Altitude apresentam uma longa história evolutiva.

Estudos realizados na Região Sul do Brasil têm demonstrado um padrão de refúgio diferente daqueles para espécies tropicais. Dados paleopolinológicos indicam a presença de táxons pertencentes à Floresta com Araucária e espécies de Campos ausentes em outras regiões (BEHLING, 1997; BEHLING, 2002; BEHLING et al., 2004). Interessante que próximos aos vales dos rios, nos períodos glaciais, foram encontrados polén de espécies florestais, dentre elas a Araucária (BEHLING, 1997). Estudos posteriores corroboraram com os dados de Behling (1997). Marchelli e Leonardo (2006), baseados em dados de marcadores de DNA plastidial, propuseram a existência de refúgios florestais em latitudes mais altas do Sul. Também, Barros et al., (2015) apontam a ocorrência de áreas adequadas para espécies florestais no Sul do Brasil durante o UMG. Mais recentemente, Stefenon et al (2019) modelaram a distribuição de *A. angustifolia* há 20.000 anos e encontraram áreas no Sul da Mata Atlântica que possivelmente foram refúgios glaciais para espécie. Estes dados corroboraram com os dados de diversidade genética e distribuição de haplótipos obtidos com genes cloroplastidias. Interessante que uma das regiões de possível refúgio para espécie engloba o vale do rio Uruguai. Estes refúgios florestais possivelmente desempenharam um papel importante na história evolutiva das espécies de campos, pois podem ter agidos como barreira ao fluxo gênico.

Diversos estudos têm mostrado que nos períodos glaciais, no Holoceno Inferior e Médio, faixas campestres se estendiam por todos os estados do sul do Brasil (BEHLING, 1997; BEHLING, 2002; BEHLING et al., 2004). Esta condição se deu pela diminuição da temperatura e umidade nestes períodos que favoreceram a expansão da distribuição das espécies de plantas típicas de regiões campestres. Contudo, no Holoceno superior, entre os últimos cinco mil e 930 anos, com o aumento da temperatura e umidade nesta região, ocorreu a expansão das florestas de Araucária das regiões de refúgios, ao longo dos vales dos rios, sobre as áreas de Campos (BEHLING et al., 2004; BEHLING, 2002). Os campos antes conectados ficaram isolados nas regiões mais altas por extensas faixas de florestas formando mosaicos floresta-campo. Neste sentido, é possível que as populações de espécies de campos apresentem assinaturas genéticas destes isolamentos que podem ser detectadas nos estudos destas populações, auxiliando no entendimento da história evolutiva da Mata Atlântica no Sul do Brasil.

Estudos filogeográficos com espécies de plantas endêmicas dos campos do sul sugerem que estas apresentam uma história de estabilidade (também em refúgios) no e ao Sul

da Mata Atlântica (MARCHELLI; LEONARDO, 2006; GIUDICELLI et al., 2019). De acordo com Hewitt (1996) as populações que ocorrem em áreas de refúgio apresentam sinal de expansão populacional recente devido a colonização de novas áreas no período interglacial, mas esse efeito pode ser limitado ou ofuscado quando associado a uma barreira de fluxo gênico. Esta condição provavelmente pode ter ocorrido com as espécies de campos em algumas regiões do Sul do Brasil. Por exemplo, nas regiões próximas aos vales dos rios, a presença de florestas com Araucária, nos períodos interglaciais podem ter agido como uma barreira ao fluxo gênico entre as populações de espécies de campos ocorrentes em lados opostos destes vales (ROSA et al., 2017). Apesar de alguns dos estudos apontarem para este componente na história evolutiva das espécies de campos do sul da Mata Atlântica, a abrangência desses ainda não atingem grandes proporções comparativamente a outros biomas. Neste sentido, a maior disponibilidade de dados de espécies ocorrentes nesta região, aliada a análise de padrões filogenéticos de espécies endêmicas, são críticos para o entendimento da história evolutiva da vegetação da região e também dos efeitos das mudanças climáticas, nas espécies, como demonstrado por Rocha et al (2020).

1.3. *Baccharis crispa* Spreng.

Popularmente conhecida como Carqueja, *B. crispa* é classificada como subarbusto com altura de até um metro, apresentando caule trialado com folhas pequenas e onduladas e flores reunidas em capítulos (BUDEL; DUARTE, 2009). É uma espécie diploide com propagação pela dispersão de sementes, ou vegetativa por rizomas (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006). A espécie ocorre em campos, beiras de estradas e em diversos tipos de solos, sendo considerada pioneira, promovendo um ambiente estável para outras espécies (PAVAN-FRUEHAUF, 2000). Também, por ser fortemente adaptada a ambientes abertos é considerada invasora em pastagens (CASTRO et al., 2002).

A carqueja apresenta importância econômica, sendo utilizada na indústria de cervejaria como substituto do lúpulo, na aromatização de refrigerantes e licores, na agricultura pelas suas propriedades alelopáticas (CASTRO; FERREIRA, 2000). Porém, devido suas propriedades medicinais e amplo uso pela população, na comercialização de chás para utilização na medicina tradicional é que reside sua maior importância econômica (CASTRO; FERREIRA, 2000; LORENZI; MATOS, 2002; AULER, 2004; CARREIRA, 2007). Também, a espécie é utilizada na apicultura, pois é muito visitada por abelhas. Ainda apresenta elevada importância ecológica na manutenção de polinizadores no seu ecossistema (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006).

A espécie é um dos subarbustos mais comuns nas áreas de Campos do sul do Mata Atlântica e não ocorre no interior das florestas. Esta condição a torna um excelente modelo para estudo da história evolutiva de espécies de campos da região sul da Mata Atlântica. Neste sentido, este estudo buscou avaliar os padrões de distribuição da variação genética em populações de *B. crisper* na região Sul do Brasil e inferir sua história demográfica. Para isto, foi realizada uma análise genética baseada na variação da sequência do DNA da espécie. Também foi testada a possível presença de uma barreira geográfica para *B. crisper* na região formada pelo provável refúgio de florestas com Araucária ao longo do vale do rio Uruguai.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Auxiliar no entendimento da diversidade genética e história demográfica de *B. crispa* no Sul do Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- Quantificar a diversidade genética de seis populações de *B. crispa* utilizando sequências de DNA cloroplastidial e nuclear;
- Determinar a estrutura filogeográfica 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. Material Vegetal

Para obtenção dos dados genéticos foram amostradas seis populações da espécie *B. crispa*. As populações foram coletadas no município de Guarapuava, no Paraná, nos municípios de Joaçaba e Xanxerê, em Santa Catarina e nos municípios de Panambi, Coxilha e Herveiras, no Rio Grande do Sul. As populações do Paraná e Santa Catarina estão localizadas ao norte do vale do rio Uruguai e as populações do Rio Grande do Sul, ao sul do vale (Figura 1). Foram coletadas folhas de oito a dez indivíduos de cada população (Tabela 1). As amostras coletadas foram acondicionadas em sílica gel até o momento da extração do DNA.



Figura 1. Mapa da região Sul do Brasil com destaque para os locais de coleta das populações de *Baccharis crispa* Spreng. e localização do vale do rio Uruguai.

Tabela 1. Locais de coleta e número de indivíduos de cada população amostrada de *Baccharis crispa* Spreng.

População	Estado	Coordenadas geográficas	Localização*	Número de indivíduos	
				Cloroplastidial	Nuclear
Guarapuava	PR	25°22'12.81"S 51°30'25.44"O	Norte	10	9
Joaçaba	SC	27°07'40.57"S 51°36'58.58"O	Norte	9	10
Xanxerê	SC	26°51'35.77"S 52°21'50.46"O	Norte	10	10
Panambi	RS	28°21'11.94"S 53°28'30.99"O	Sul	9	8
Coxilha	RS	28°05'37.18"S 52°16'23.36"O	Sul	10	10
Herveiras	RS	29°26'06.04"S 52°40'10.20"O	Sul	9	10

* Referente ao vale do rio Uruguai

3.2. Extração do DNA

Para a extração do DNA, as folhas foram trituradas em nitrogênio líquido (N₂) até a obtenção de um pó bem fino, acondicionadas em microtubos, e armazenadas 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 tetracético); 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0 (tris (hidroximetil) /aminometano); 1,4 M de NaCl (Cloroeto 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 10 mg 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. A concentração de DNA foi determinada por eletroforese, utilizando gel de agarose 0.9% corado com brometo de etídeo. Foram usadas como padrão quantidades conhecidas do DNA do Fago λ.

3.3. 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 20 ng 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 de DNA cloroplastidial (intron do gene *trnL* e região intergênica *psbA-trnH*) e nuclear (Internal transcribed spacer - ITS) de *Baccharis crispa* Spreng.

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

Após a confirmação da amplificação, foi realizada nova amplificação por PCR como descrito anteriormente, porém, com um volume final de 20 µL, 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 µL 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 µL 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 µL 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 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

3.4. 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 60 sequências de cpDNA e 57 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*.

3.5. Análises Estatísticas

Foram definidos três grupos a partir das seis populações, sendo um grupo contendo as seis populações de *B. crisper*, um grupo formado pelas três populações localizadas ao norte do vale do rio Uruguai e o terceiro grupo composto pelas três 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 (H_d), 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 (H_s) foi obtida a partir do programa DnaSP (LIBRADO; ROZAS, 2009). A análise de variância molecular (AMOVA), índice de diferenciação genética (Φ_{PT}) análogo ao F_{ST} , e o fluxo gênico (N_m) foram calculados no programa GenAlEx 6.5

(PEAKALL; SMOUSE, 2012). Todos os índices citados anteriormente foram calculados para os três grupos de populações avaliados no trabalho.

A rede de haplótipos foi obtida pela abordagem de *median-joining* (BANDELT 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: $\log_{\text{e}}\log_{\text{normalclock}} - \log_{\text{e}}\log_{\text{strictclock}} = 13,34$; KASS; RAFTERY, 1995). Devido à falta de uma taxa de substituição específica para as regiões de cpDNA de *B. crispa*, 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 *B. crispa* 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 a região do nDNA ITS4-ITS5 foram obtidos fragmentos de 601 pares de bases (pb), com 35 sítios polimórficos para todas as populações. Para as regiões de cpDNA *trnL-trnF* e *psbA-trnH* foram obtidos fragmentos de 251 e 830 pb, respectivamente. As duas regiões concatenadas geraram fragmentos de 1081 pb, com um total de 232 sítios polimórficos para todas as populações (Tabela 3). Quando analisadas separadamente as populações ao norte e ao sul do vale do rio Uruguai, as sequências cloroplastidiais e nucleares foram mais polimórficas nas populações ao norte (Tabela 3).

Quando considerada todas as populações a diversidade nucleotídica e haplotípica foi maior com as sequências cloroplastidiais (Tabela 3). A comparação destes índices entre as populações ao norte e ao sul do vale do rio Uruguai, mostrou que com os marcadores cloroplastidiais a diversidade foi semelhante, enquanto que com os marcadores nucleares o grupo ao norte foi o mais diverso (Tabela 3). Este foi corroborado pelo número de haplótipos observados em cada grupo de população com cada região do genoma avaliada assim como com a média da diversidade genética dentro da população (Tabela 3).

Os testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu foram negativos para todos os grupos de populações estudados quando utilizado o cpDNA (Tabela 3). O maior valor negativo tanto para o D como para o F_s foi observado quando considerada todas as populações. Para nDNA os testes apresentaram valores negativos para o grupo sul, e positivos para os demais, F_s de Fu foi significativo apenas para o grupo sul, indicando sutil expansão populacional nesse grupo, entretanto o grupo norte apresentou valor positivo e significativo, indicando possível sutil contração populacional para esse grupo (Tabela 3).

A diferenciação genética observada entre todas as populações foi moderada para o nDNA ($\Phi_{PT} = 0,226$) e para cpDNA ($\Phi_{PT} = 0,228$). Quando comparadas entre elas, as populações dos grupos norte e sul do vale do rio Uruguai apresentaram diferenciação genética muito alta para nDNA e baixa para cpDNA (Tabela 4).

A AMOVA fundamentada em cpDNA evidenciou para todos os grupos testados uma maior variação dentro das populações quando comparada com a variação entre as populações (Tabela 4). Para as sequências de nDNA para todas as populações e as populações ao norte a

variação foi maior dentro das populações. Já, para os grupos norte e sul e Sul a variação foi maior entre as populações (Tabela 4). O fluxo gênico foi menor que 1 quando considerada as populações do sul com cpDNA e norte e sul e sul com nDNA (Tabela 4).

Os gráficos de distribuição *mismatch* tanto para as análises considerando as diferentes regiões genômicas avaliadas (nDNA e/ou cpDNA) como para os diferentes grupos avaliados (todas, norte, sul) mostraram distribuição bimodal (Figura 2 e 3), sendo um indicativo de que as populações permaneceram em equilíbrio demográfico. Entretanto a análise de expansão demográfica e espacial utilizando o índice de *Harpending's Raggedness* e o teste estatístico da soma dos quadrados não foram significativas usando o cpDNA, ou quando significativas, próximo a zero, não validando o equilíbrio das populações. Também, na análise de expansão demográfica usando nDNA, a soma dos quadrados dos desvios e o Índice de *Harpending's Raggedness* apresentaram valores próximos a zero e não significativos, exceto quando considerado todas as populações (Tabela 5). Para expansão espacial baseada em nDNA, ambos os índices apresentaram valores próximos a zero e não significativos (Tabela 5).

Tabela 3. Diversidade genética e dinâmica evolutiva das populações de *Baccharis crispa* Spreng., obtidas com base em 57 sequências de cpDNA e 57 sequências de nDNA.

	CLOROPLASTIDIAL			NUCLEAR		
	Todas	Grupo norte	Grupo sul	Todas	Grupo norte	Grupo sul
Índices de Diversidade						
Número de sítios polimórficos (S)	232	189	122	35	34	4
Diversidade Haplótipica (Hd ± DP)	0,9912 ±0,0057	0,9852 ± 0,0124	0,9921 ± 0,0133	0,7914 ± 0,0471	0,9064 ± 0,0312	0,4365 ± 0,1129
Diversidade Nucleotídica (π ± DP)	0,0305 ± 0,0149	0,0327 ± 0,0163	0,0289 ± 0,0145	0,017916 ± 0,009178	0,024208 ± 0,012426	0,001470 ± 0,001181
Número de Haplótipos	47	23	26	16	13	6
Média da diversidade genética dentro da população (Hs)	0,98858	0,98925	0,99150	0,67463	0,82800	0,67703
Testes de Neutralidade						
D de Tajima	-1,50538 (P>0,10)	-1,2640 (P>0,10)	-0,37202 (P>0,10)	1,33864 (P>0,10)	2,40386 (P<0,05)	-0,36729 (P>0,10)
Fs de Fu	-12,211 (P<0,02)	-3,122 (P<0,02)	-4,752 (P<0,02)	3,010 (P<0,02)	3,364 (P<0,02)	-2,122 (P<0,02)

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 ITS4 e ITS5 de nDNA, para diferentes grupos das populações de *Baccharis crispa* Spreng.

Populações	Cloroplastidial			Nuclear		
	PhiPT	Nm	AMOVA	PhiPT	Nm	AMOVA
Todas	0,228	1,694	77% dentro e 23% entre	0,226	1,716	77% dentro e 23% entre
Norte e Sul	0,148	2,870	85% dentro e 15% entre	0,842	0,094	16% dentro e 84% entre
Norte	0,134	3,228	87% dentro e 13% entre	0,124	3,545	88% dentro e 12% entre
Sul	0,351	0,924	65% dentro e 35% entre	0,655	0,263	34% dentro e 66% entre

Tabela 5. Resultados da avaliação da expansão demográfica e espacial dos grupos de populações de *Baccharis crispa* Spreng., obtidas com base em 57 sequências de cpDNA e 57 sequências de nDNA.

Expansão Demográfica	CLOROPLASTIDIAL						NUCLEAR		
	TRNL			PSBA			Todas	Grupo norte	Grupo sul
	Todas	Grupo norte	Grupo sul	Todas	Grupo norte	Grupo sul			
Soma dos quadrados dos desvios	0,01374 (P=0,954)	0,03476 (P=0,693)	0,00672 (P=0,783)	0,01892 (P= 0,037)	0,01578 (P=0,102)	0,04755 (P= 0,010)	0,69874 (P=0.000)	0,03407 (P=0.050)	0,03326 (P=0.400)
Índice de Harpending's Raggedness	0,01386 (P=0,477)	0,03721 (P=0,591)	0,01016 (P=0,540)	0,01469 (P= 0,058)	0,02195 (P=0,039)	0,04949 (P= 0,012)	0,05709 (P=1.000)	0,01945 (P=0.250)	0,25970 (P=0.250)
Expansão Espacial									
Soma dos quadrados dos desvios	0,01032 (P=0,854)	0,02802 (P=0,717)	0,00524 (P=0,964)	0,01267 (P= 0,58)	0,01330 (P= 0,572)	0,02396 (P= 0,742)	0,02458 (P=0.680)	0,02220 (P=0.502)	0,01593 (P=0.551)
Índice de Harpending's Raggedness	0,01386 (0,772)	0,03721 (P=0,732)	0,01016 (P=0,843)	0,01469 (P= 0,774)	0,02195 (P= 0,548)	0,4949 (P= 0,715)	0,05709 (P=0.623)	0,01945 (P=0.960)	0,25970 (P=0.566)

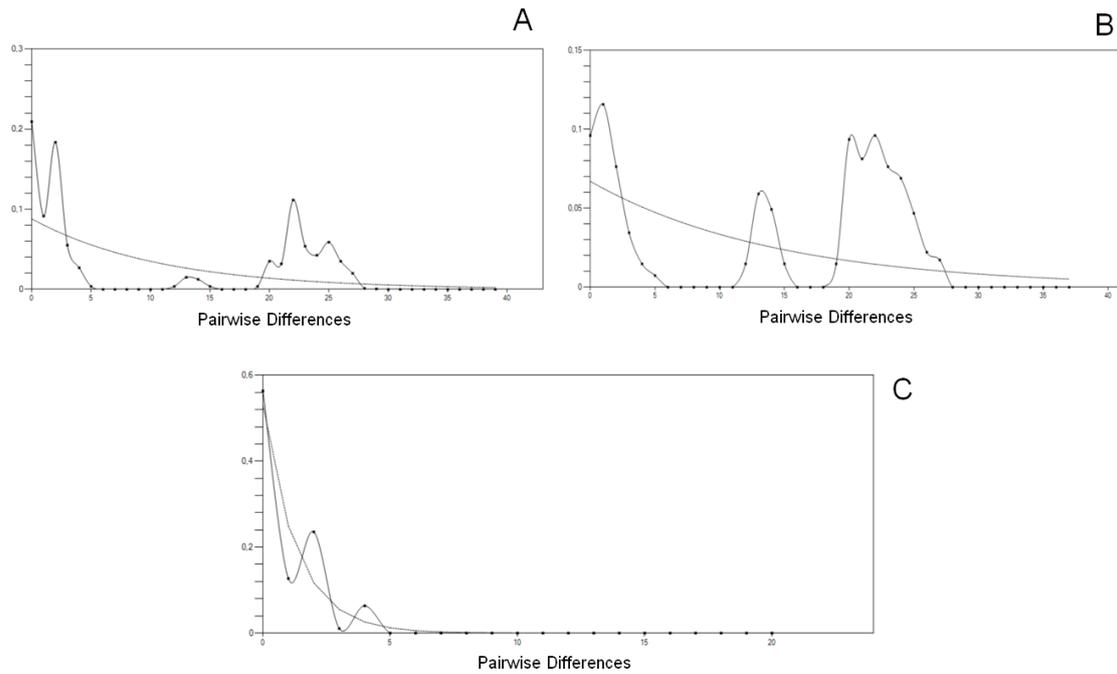


Figura 2. Gráficos de distribuição *mismatch* para as sequências de nDNA de 57 indivíduos de *Baccharis crispata* Spreng. A) Todas as populações; B) Populações ao norte do vale do rio Uruguai; C) Populações ao sul do vale do rio Uruguai.

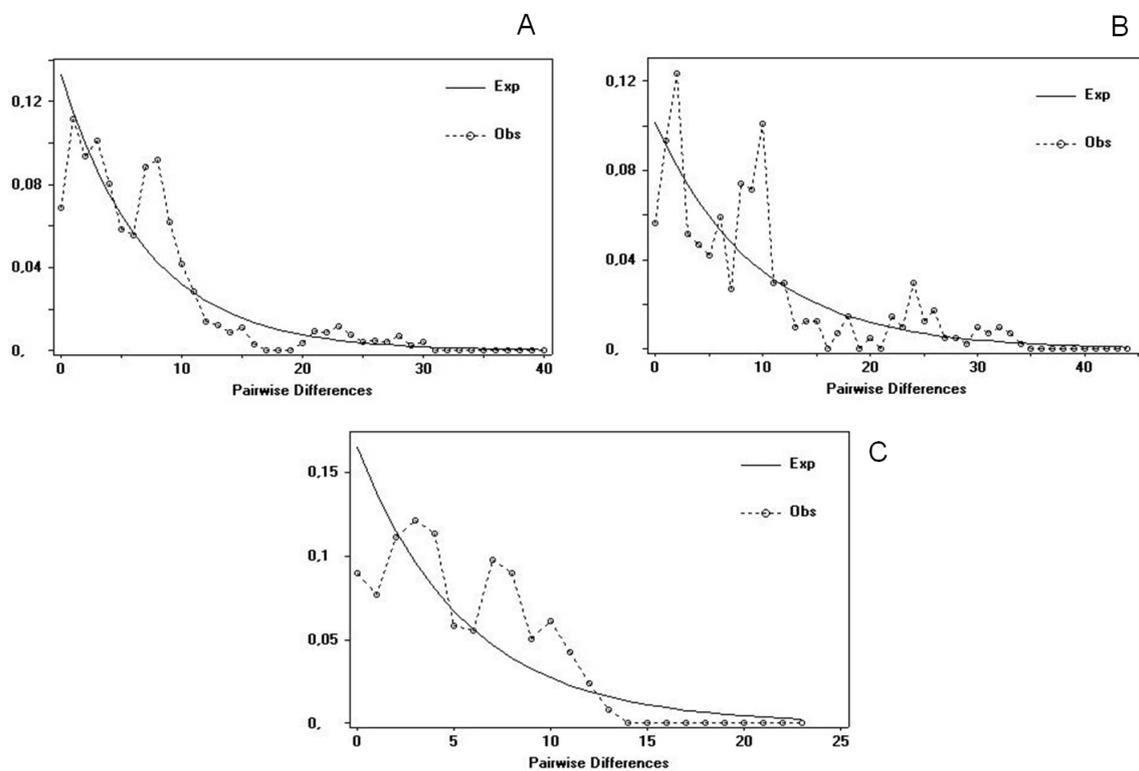


Figura 3. Gráficos de distribuição *mismatch* para as sequências de cpDNA de 60 indivíduos de *Baccharis crispata* Spreng. A) Todas as populações; B) Populações ao norte do vale do rio Uruguai; C) Populações ao sul do vale do rio Uruguai.

Baseado nas simulações Bayesianas utilizando cpDNA, o BSP evidenciou estabilidade das populações nos últimos 200 mil anos (Figura 4).

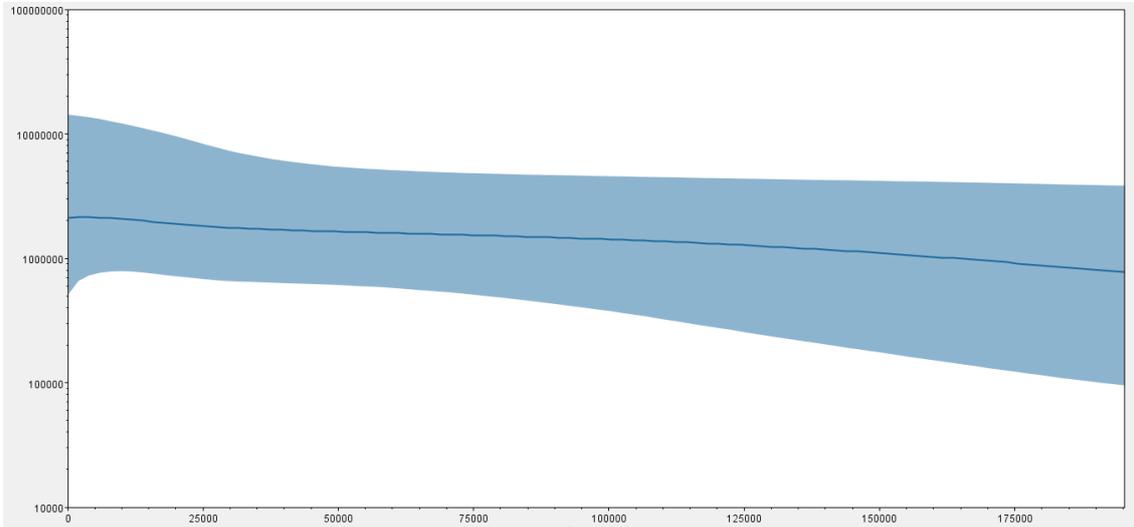


Figura 4. Tamanho das populações de *Baccharis crisper* Spreng. ao longo do tempo, estimado pela *Bayesian Skyline Plot* utilizando dados obtidos com sequências de DNA cloroplastidial.

4.2. Rede de Haplótipos e Estrutura Populacional

As regiões de nDNA ITS 4 e ITS 5 resultaram em 16 ribotipos, sendo 8 exclusivos do grupo ao norte do vale do rio Uruguai, cinco ribotipos exclusivos dos grupos ao sul e três compartilhados entre as populações ao norte e ao sul (Figura 5).

As regiões de cpDNA *trnL-trnF* e *psbA-trnH* combinadas apresentaram 47 haplótipos, sendo 21 exclusivos das populações ao norte do vale do rio Uruguai e 24 exclusivos das populações ao sul. Somente dois haplótipos foram compartilhados entre os grupos de populações ao norte e a sul do vale (Figura 6)

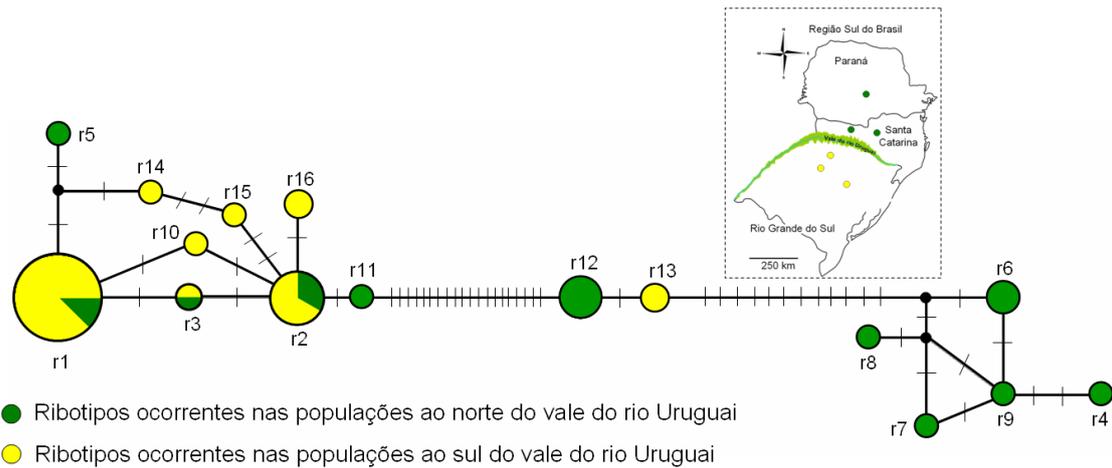


Figura 5. Rede de ribotipos obtidos a partir da sequência do ITS (*Internal transcribed spacer*) para 57 indivíduos de seis populações de *Baccharis crispa* Spreng. O tamanho da circunferência é proporcional à frequência do ribotipo. Os pequenos círculos pretos representam os vetores médios. Os traços verticais cortando as linhas que conectam os ribotipos representam os passos mutacionais que diferenciam os haplótipos. O mapa no canto superior direito identifica o local de coleta de cada população.

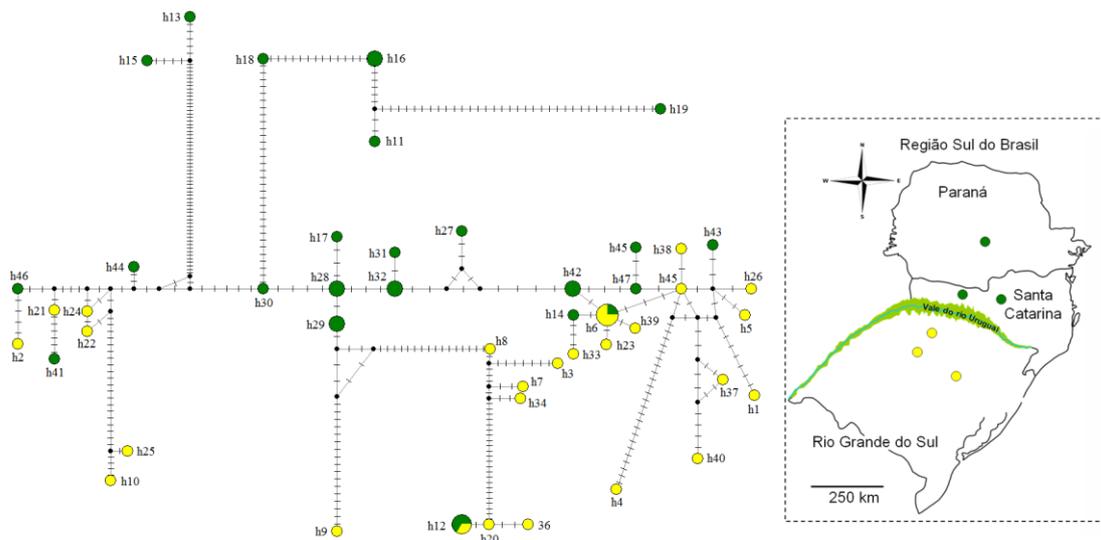


Figura 6. Rede de haplótipos obtida com as sequências dos espaçadores intergênicos *trnL-trnF* e *psbA-trnH* concatenadas de 60 indivíduos de seis populações de *Baccharis crispa* Spreng. A cor dos haplótipos estão de acordo com a localização do indivíduo no qual foi identificado, sendo os amarelos e verdes ao sul e ao norte do vale do rio Uruguai, respectivamente. O tamanho da circunferência é proporcional à frequência do haplótipo. Os pequenos círculos pretos representam os vetores médios. Cada traço que corta as linhas representa os passos mutacionais. O mapa a direita identifica o local de coleta de cada população.

Na análise Bayesiana com as sequências de cpDNA, o número de k (clusters; grupos genéticos) foi definido como quatro (Figura 7). De acordo com as probabilidades posteriores (Tabela 6) as populações de Guarapuava e Xanxerê, ambas localizadas ao norte do vale do rio Uruguai, ficaram em um mesmo grupo genético (Figura 8). Verificou-se o mesmo com as populações de Coxilha e Herveiras, localizadas ao sul do vale (Figura 8). As populações de Joaçaba e Panambi ficaram individualizadas em grupos genéticos distintos (Figura 8).

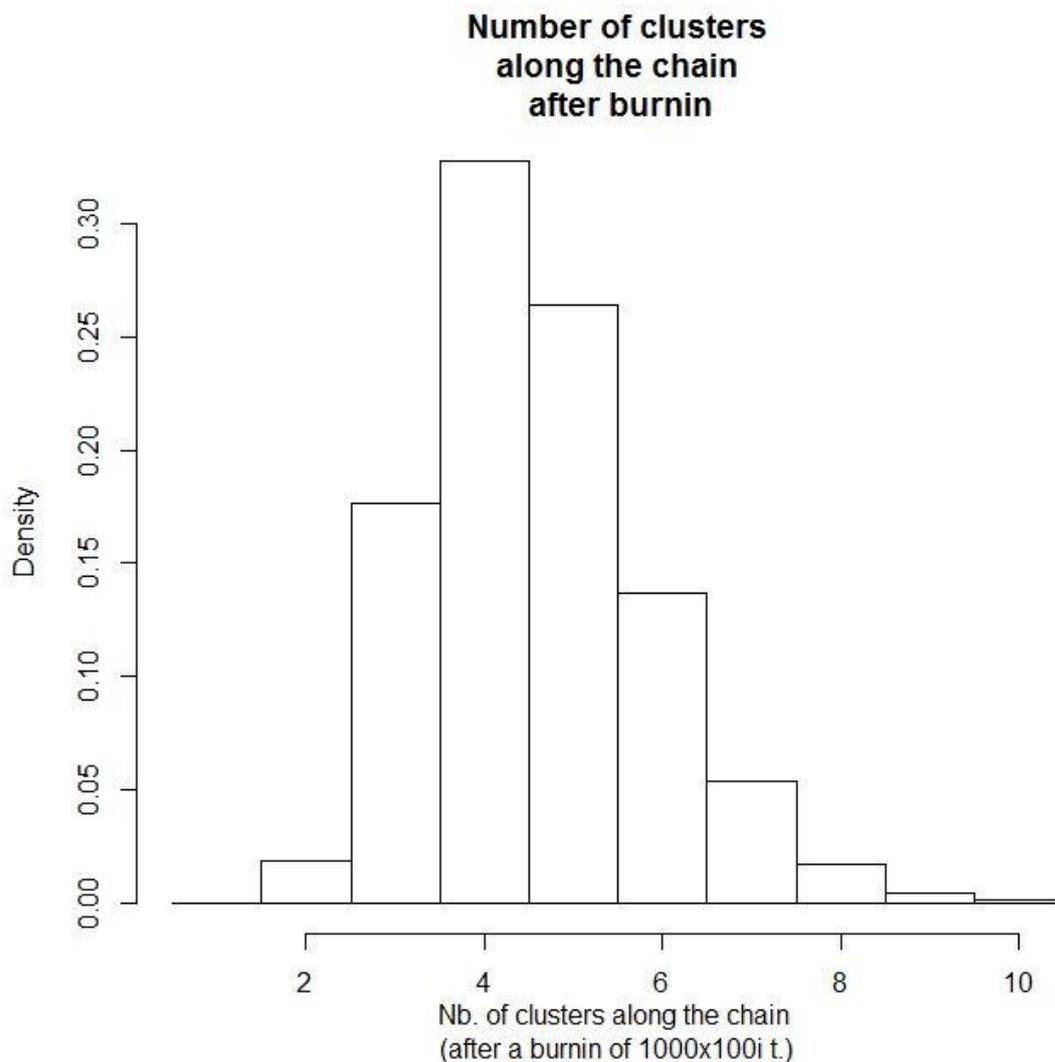


Figura 7. Determinação do número ótimo de K (grupos genéticos) para *Baccharis crispa* Spreng., através do método Bayesiano, baseado nas sequências de cpDNA.

Tabela 6. Probabilidade posterior de cada população de *Baccharis crispa* Spreng., pertencer a cada grupo genético. Os valores em destaque correspondem ao grupo

genético que apresenta a maior probabilidade. Dados obtidos com as sequências de cpDNA.

População	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Coxilha	0,2956	0,2217	0,2217	0,2608
Guarapuava	0,2028	0,3391	0,2028	0,2551
Herveiras	0,3226	0,24	0,2119	0,2253
Joaçaba	0,1929	0,2038	0,4203	0,1827
Panambi	0,2586	0,2000	0,2161	0,3251
Xanxerê	0,2485	0,3226	0,208	0,2207

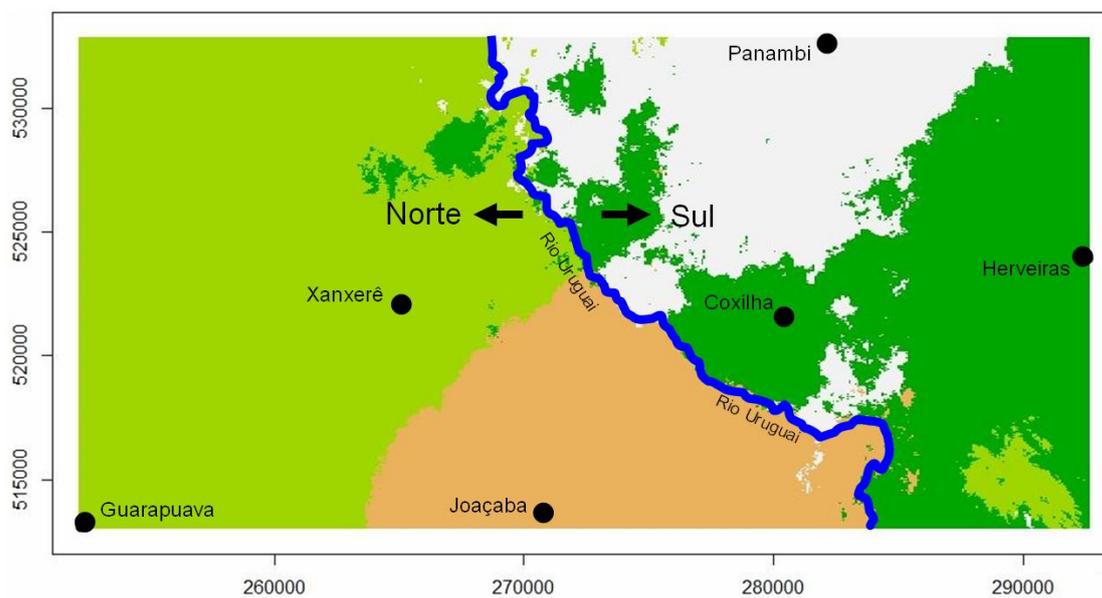


Figura 8. Posicionamento de seis populações de *Baccharis crispa* Spreng. em cada um dos quatro grupos genéticos inferidos pela análise Bayesiana, baseada nas sequências de cpDNA.

5. DISCUSSÃO

5.1. Diversidade Genética e História Demográfica

As populações de *B. crisper*, quando avaliadas em conjunto, apresentaram alta diversidade nucleotídica e haplotípica para ambas as regiões cpDNA e nDNA (Tabela 3). Esta conclusão é possível uma vez que está acima do que os obtidos para outras espécies de Asteraceae. Por exemplo, a espécie *Richterago discoidea*, também ocorrente em áreas de campos no Brasil apresentou $\pi = 0.0002 \pm 0.00005$ e $Hd = 0.505 \pm 0.089$ (BARRES et al., 2019); *Lychnophora ericoides* $\pi = 0,006 \pm 0,004$ e $Hd = 0,399 \pm 0,044$ (COLLEVATTI et al., 2009); *Ligularia hodgsoni* $\pi = 0,00306$ e $Hd = 0,895$ (WANG et al., 2013). Ainda, a espécie *Tibouchina hatschbachii*, apesar de não ser uma Asteraceae, também ocorre nos Campos do Sul da Mata Atlântica e apresentou valores menores que os observados para *B. crisper* ($\pi = 0,313 \pm 0,160$ e $Hd = 0,908 \pm 0,012$) (MAIA et al., 2017). Quando avaliadas separadamente, as populações ao norte e ao sul do vale do rio Uruguai também apresentaram alta diversidade nucleotídica e haplotípica para cpDNA, entretanto, a diversidade nucleotídica foi bastante inferior no grupo de populações ao sul do vale para nDNA. Esses resultados corroboram com o número de haplótipos e a diversidade genética intrapopulacional (Hs), os quais apresentaram valores mais baixos para a população do grupo de populações ao sul do vale (Tabela 3). Esta alta diversidade para a espécie, aliada ao elevado número de haplótipos e ribotipos exclusivos (discutidos a frente), sugerem que a história demográfica de *B. crisper* nas regiões estudadas com aparente estruturação populacional está associada a presença da espécie em refúgios durante os períodos glaciais no Sul do Brasil. Esta hipótese é reforçada uma vez que prováveis áreas de refúgios já foram relatados no Sul do Brasil para espécies típicas dos Campos desta região [(*Petunia axillaris* (Lam.) Britton (GIUDICELLI et al., 2019) e *Tibouchina hatschbachii* Wurdack (MAIA et al., 2017)], Ainda, Urtubey et al (2020) propõe a presença de refúgios para a Asteraceae *Duseniella patagonica* (O.Hoffm.) K. Schum. na Argentina, reforçando que mesmo em altas latitudes, foi possível a formação de refúgios nos períodos glaciais.

A análise de variância molecular dos dados de cpDNA evidenciou que a maior diversidade genética é encontrada dentro das populações, o que é característico de espécies pioneiras como *B. crisper*, (NYBOM, 2004; CASTRO et al., 2002). Esse padrão foi consistente com o observado para populações *B. crisper* das mesmas regiões analisadas por marcadores microssatélites (MICOLINO, 2016) apoiando padrão de

distribuição da variabilidade genética observado. Um dos fatores que pode ser responsável pela manutenção da variação genética dentro das populações de *B. crispa* é o fluxo gênico uma vez que este só não foi maior que 1 nas populações ao sul (Tabela 5). O índice elevado de fluxo gênico entre as populações do norte pode estar refletindo um fluxo histórico devido estas populações terem sido mais estáveis nos últimos 200 mil anos conforme observado neste estudo (discutido a frente). Para o nDNA o fluxo gênico entre as populações do norte com as do sul foi menor que entre as populações do sul, corroborando com a maior diferenciação genética entre as populações destes grupos (Tabela 4). Esta observação evidencia que o fluxo de pólen parece ser limitado entre as populações de *B. crispa* destes grupos.

Os valores obtidos nos testes de neutralidade para as populações de *B. crispa* foram negativos para todos os grupos avaliados com cpDNA, com valores significativos somente para Fs de Fu (Tabela 3) indicando abrupta expansão das populações. Já para os dados do nDNA, somente os valores do grupo sul foram negativos, sendo também somente os valores do Fs de Fu, significativos. Estes resultados evidenciam discreta retração das populações quando avaliadas em conjunto e também para as populações ao norte do vale. Já, para as populações ao sul este índice indica discreta expansão populacional (Tabela 3). O teste de neutralidade 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 e positivos, retração populacional (AMZATI et al., 2018). A mesma interpretação é válida para o Fs de Fu (FU 1997), porém o cálculo é baseado na distribuição da frequência dos haplótipos. Neste sentido, apesar do Fs de Fu indicar expansão abrupta das populações, o D de Tajima não corrobora esta observação. Assim, os resultados do Fs de Fu devem ser interpretados com cautela, sendo necessário levar em consideração outras análises para refutar ou aceitar esta expansão. A análise da distribuição mismatch pode auxiliar nesta interpretação.

Os gráficos de distribuição *mismatch* do nDNA apresentaram padrão bimodal, sugerindo que as populações estão em equilíbrio demográfico (HARPENDING, 2004). No entanto, os índices H_{RAG} e SSD utilizados na validação de modelos de expansão demográfica e espacial, apresentaram valores significativos para expansão demográfica quando considerada todas as populações e população norte (Tabela 5). Estes resultados

sugerem estabilidade espacial das populações e leve expansão demográfica quando considerada todas as populações e as populações ao norte, indicando expansão da espécie de norte para sul. Também com os dados do cpDNA os valores e significâncias obtidos não validaram o modelo de estabilidade populacional, o que pode indicar discreta expansão demográfica. Neste sentido, os resultados de expansão populacional observado pelos valores do F_s de F_u podem ser considerados como representativos do comportamento histórico das populações de *B. crisper* aqui avaliadas.

A dinâmica populacional através do tempo demonstrada pelo gráfico BSP (Figura 4) evidenciou estabilidade populacional ao longo do Pleistoceno, com um sútil crescimento demográfico observado próximo dos últimos 30 mil anos abrangendo o final do Último Máximo Glacial. Este período tem sido relatado como de expansão populacional para as espécies de campo do sul do Brasil (GIUDICELLI et al., 2019), bem como para populações endêmicas de Asteraceae da Argentina (URTUBEY et al., 2020). Neste sentido, considerando os dados do teste de neutralidade juntamente com os de dinâmica populacional, é possível evidenciar uma possível expansão de norte para sul das populações de *B. crisper*. Ainda, a observação de estabilidade populacional nas populações ao norte do vale do rio Uruguai durante os últimos 200 mil anos potencializam a teoria de presença de refúgios durante o pleistoceno de populações de espécies de campos no Sul do Brasil. Para *B. crisper*, estes refúgios paracem ter sido mais significativos ao norte do vale do rio Uruguai.

As populações de *B. crisper* demonstraram estabilidade durante os últimos períodos glaciais provavelmente devido sua alta diversidade genética e adaptação a condições de clima frio e seco. Estas condições podem ter possibilitado a persistência de grandes populações de *B. crisper* em uma determinada região, mesmo sobre forte influência de eventos climáticos históricos e de características geográficas da região. Apesar da persistência das populações, as espécies que permanecem em refúgios em uma determinada região, como ocorreu com *B. crisper*, foram influenciadas pelos eventos paleoclimáticos do período Quaternário (CARNAVAL et al., 2009, CARVALHO et al., 2017). Dentre estes eventos, as oscilações climáticas, que alteraram significativamente a disponibilidade de habitats, são as de maior significância na distribuição e história evolutiva de diversas espécies (KNOWLES, 2001; CARNAVAL et al., 2009). No sul do Brasil, a redução da temperatura e umidade nos períodos glaciais favoreceram a vegetação do campo, em virtude da retração das formações florestais em refúgios nos vales dos rios, como relatado para as florestas de Araucária na Região Sul

do Brasil (BEHLING, 1997; BEHLING et al., 2004; STEFENON et al., 2019). Já, nos períodos interglaciais o aumento da temperatura e umidade favoreceram a expansão das formações florestais deixando os campos restritos a regiões mais altas e frias, resultando na formação de mosaicos. Esses eventos podem ter contribuído para a estruturação e diferenciação genética das populações de *B. crispa*. Essa interpretação é consistente com os resultados obtidos através da análise de variância molecular e fluxo gênico (Nm) (Tabela 4). No entanto, após o Último Máximo Glacial, apesar da elevação da temperatura o solo raso das regiões mantanhosas do sul do Brasil, pode ter dificultado a migração das florestas, e recentemente a colonização pelos humanos e posterior desmatamento das florestas, podem ter auxiliado na manutenção de grandes populações de *B. crispa*, refletindo na não observação de declínio populacional nestes períodos.

5.2. Estrutura Populacional de *Baccharis crispa*

Os ribotipos e a rede de haplótipos de cpDNA demonstram estruturação filogeográfica das populações de *B. crispa*. Esta estruturação é clara quando observamos que de 16 ribotipos, apenas 3 foram compartilhados entre indivíduos ao norte e ao sul do vale do rio Uruguai (Figura 5). O mesmo foi observado na rede de haplótipos, em que de 47 apenas dois foram compartilhados com indivíduos ao norte e ao sul do vale do rio Uruguai (Figura 6). Estes dados corroboram com a diferenciação genética observada entre as populações ($\Phi_{iPT} = 0,148$ para cpDNA e $\Phi_{iPT} = 0,842$ para nDNA). Também, quando observamos a relação filogenética entre os ribotipos e entre os haplótipos é possível observar estruturação (Figura 5) o que pode evidenciar menor intercâmbio genético entre as populações ao norte e ao sul do vale do rio Uruguai. Ainda, o alto número de haplótipos exclusivos nas populações pode ser consequência da alta taxa evolutiva observada em espécies de Asteraceae (HAMRICK 1996; WEBER et al. 2020). Neste sentido é possível hipotetizar que as populações do norte do vale do rio Uruguai tenham contribuído na formação das populações ao sul, e estas últimas rapidamente se diferenciado gerando a estruturação observada.

Dentre as seis populações de *B. crispa* avaliadas foram obtidos 4 grupos genéticos (Figura 8). Os dois grupos com as populações de Guarapuava e Xanxerê e Joaçaba representam as três populações ao norte do vale do rio Uruguai, enquanto os outros dois grupos foram formados pelas populações ao sul, Coxilha, Herveiras e Panambi (Figura 8). A distribuição geográfica dos grupos genéticos sugere uma provável barreira geográfica que pode ter limitado o fluxo gênico entre as populações ao

norte e ao sul do vale do rio Uruguai. Estes dois grupos de populações (ao norte e ao sul) estão separadas pelo vale do rio Uruguai (Figura 8). Essa interpretação é consistente com todos os demais resultados obtidos neste estudo e com o observado para *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. (ROSA et al., 2017), outra espécie de Asteraceae com biologia semelhante a de *B. crispa*.

O fluxo gênico entre as populações ao norte e ao sul do vale baseado em nDNA foi muito baixo ($N_m = 0,094$) diferindo do fluxo gênico do cpDNA ($N_m = 2,870$). Essa discrepância entre os resultados obtidos através de diferentes genomas pode ser em decorrência a diferenças no tempo de coalescência (GIUDICELLI et al., 2019). Devido a taxa de evolução mais rápida, não sofrer recombinação e herdabilidade uniparental, o efeito de redução do tamanho populacional na distribuição dos haplótipos pode ser maior no genoma cloroplastidial (COLLEVATTI et al., 2009). O fluxo gênico para o grupo norte foi elevado tanto para o genoma nuclear como para o cloroplastidial, corroborando com a permanência dessas populações por longos períodos, em regiões abertas. Esta situação, possivelmente favoreceu a dispersão de sementes e pólenes, visto que a polinização por abelhas e dispersão de sementes principalmente pelo vento não ocorrem por distâncias muito extensas (AULER; BATTISTIN; REIS, 2006).

Barreiras geográficas associadas a oscilações climáticas históricas podem moldar a variação e estrutura genética de uma espécie (EVANS et al., 2015). Para *B. crispa* a interpretação desta afirmação é consistente quando considerando a presença de refúgios florestais na história da vegetação do sul da Mata Atlântica. Apesar da teoria dos refúgios do Pleistoceno descrever majoritariamente a presença de refúgios na Mata Atlântica na região Sudeste e Norte do Brasil (CARNAVAL; MORITZ, 2008; THOMÉ et al., 2014), estudos paleopalinológicos já indicavam que estes também poderiam estar no sul deste Bioma. Isto devido a estes estudos apontarem a ocorrência de florestas de galeria nos vales dos rios no sul da Mata Atlântica (BEHLING, 1997; BEHLING, 2002; BEHLING et al., 2004). O fortalecimento desta hipótese veio com a avaliação filogeográfica de populações de *A. angustifolia* e modelagem de nicho para a espécie ao longo do Pleistoceno que evidenciaram a presença de potenciais refúgios glaciais para a espécie no sul da Mata Atlântica coincidindo com a localização do vale do rio Uruguai (STEFENON et al., 2019). Essa permanência de formações florestais ao longo do vale do rio Uruguai pode ter ocasionado a formação de uma extensa barreira, dificultado a transposição de sementes e polinizadores, podendo ter levado a diferenciação e estruturação genética observada em *B. crispa*.

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que as populações de *B. crista* apresentam elevada diversidade e estruturação genética. Também foi observado estabilidade populacional ao longo do Pleistoceno com uma sutil expansão populacional para o sul. A elevada estruturação populacional e diversidade genética evidenciam que o vale do rio Uruguai associado a permanência de florestas de Araucária nos períodos glaciais e interglaciais provavelmente consistiu em uma barreira geográfica ao fluxo gênico entre as populações de *B. crista*. Esses dados reforçam a hipótese da ocorrência de refúgios florestais para o sul da Mata Atlântica e auxiliam no entendimento da dinâmica da vegetação do sul do Brasil durante o Pleistoceno.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- 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.
- AULER, N. M. F. **Distribuição da variabilidade genética em populações de *Baccharis trimera* (Less) DC. (Carqueja) no Sul do Brasil**. 125p, Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria, 2004.
- AULER, N. M. F.; BATTISTIN, A.; REIS, M. S. Número de cromossomos, microsporogênese, e variabilidade do pólen em populações de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC] do Rio Grande de Sul e Santa Catarina. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 55-63, 2006.
- 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.
- 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.
- BANDEL, 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.
- BARBOSA, A. R.; FIORINI, C. F.; SILVA-PEREIRA, V.; MELLO-SILVA, R.; BORBA, E. L. Geographical genetic structuring and phenotypic variation in the *Vellozia hirsuta* (Velloziaceae) ochlopecies complex. **American Journal of Botany**, v. 99, p. 1477-1488, 2012.
- BARRES, L.; BATALHA-FILHO, H.; SCHNADELBACH, A. S.; ROQUE, N. Pleistocene climatic changes drove dispersal and isolation of *Richteraigo discoidea* (Asteraceae), and endemic plant of campos rupestres in the central and eastern Brazilian sky islands. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 189, p. 132-152, 2019.
- 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.; 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.
- BONATELLI, I. A.; PEREZ, M. F.; PETERSON, A. T.; TAYLOR, N. P.; ZAPPI, D. C.; MACHADO, M. C.; KOCH, I.; PIRES, A. H.; MORAES, E. M. Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. **Molecular Ecology**, v. 23, p. 3044-3063, 2014.
- 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.
- 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.
- 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.
- BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Análise morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *B. trimera* (Less.) DC., Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 45, n. 1, p. 75-86, 2009.

- 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.
- 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.
- CARREIRA, R. C. ***Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica.** p. 199, Tese (Doutorado – Área de Concentração em Botânica) – Departamento de Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2007.
- 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.
- CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: CARQUEJA (*Baccharis genistelloides*).** Viçosa: Suprema gráfica e editora Ltda, p. 102, 2000.
- CASTRO, H. G.; SILVA, D. J. H.; FERREIRA, F. A.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I. Estabilidade da divergência genética em seis acessos de carqueja. **Planta Daninha**, v. 20, n. 1, p. 33-37, 2002.
- 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.
- 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.
- COLLEVATTI, R. G.; DE CASTRO, T. G.; DE SOUZA LIMA, J.; DE CAMPOS TELLES, M. P. Phylogeography of *Tibouchina papyrus* (Pohl) Toledo (Melastomataceae), an endangered tree species from rocky savannas, suggests bidirectional expansion due to climate cooling in the Pleistocene. **Ecology and Evolution**, v. 2, p. 1024-1035, 2012.
- 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.
- 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.
- DA SILVA, M. B.; PINTO-DA-ROCHA, R. 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,
- 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.
- DUMOLIN-LAPÈGUE, B.; DEMESURE, S.; FINESCHI, V.; LE COME.; PETIT, R. **J. Genetics**, v. 146, n. 4, p. 1475-1487, 1997.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 351: 1291–1298, 1996.
- HARPENDING, H. C. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Human Biology**, s/n, p. 591–600, 1994.
- HEWITT, G. M. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**. v. 359, p. 183–195. 2004.

- 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. M. Post-glacial re-colonization of European biota. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 68, p. 87-112, 1999.
- 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.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 1ed. São Paulo: Instituto Plantarum, Nova Odessa, p. 512, 2002.
- LUNA, C.; FONTANA, M. Estado de los bosques de *Araucaria angustifolia*: especie nativa en peligro crítico. **Revista Estudios Ambientales**, v. 5, n. 2, 2017.
- 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.
- MARCHELLI, P.; LEONARDO, G. Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 591-603, 2006.
- MARCHESE, C. Biodiversity hotspots: A shortcut for a more complicated concept. **Global Ecology and Conservation**, v. 3, p. 297-309, 2015.
- MICOLINO, R. **Uso de marcadores microssatélites da família Asteraceae para estudos genéticos em Carqueja (*Baccharis crispa* Spreng., Asteraceae)**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva. Universidade Estadual do Centro Oeste, 63p. 2016.
- 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.

- 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/>>
- 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.
- PAVAN-FRUEHAUF, S. **Plantas Medicinais de Mata Atlântica: manejo sustentado e amostragem**. São Paulo: Annablume/Fapesp, p. 216, 2000.
- 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.
- 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.
- REITZ, R.; KLEIN, R. M. Araucariáceas. **Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues**, p. 62, 1966.
- 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.
- ROCHA, L. F.; CARMO, I. E. P.; PÓVOA, J. S. R.; CARVALHO, D. Effects of climate changes on distribution of *Eremanthus erythropappus* and *E. incanus* (Asteraceae) in Brazil. **Journal of Forestry Research**, v. 31, p. 353-364, 2020.
- 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.
- RULL, V. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary-Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. **Molecular Ecology**, v.17, p. 2722-2729, 2008.

- 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.
- 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.
- TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132-138. 2005.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585–595, 1989.
- 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-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.
- URTUBEY, E.; STUESSY, T. F.; JUSTEL, J. I.; NICOLA, M. V. Phylogeography and palaeomodelling of *Duseniella patagonica* (Barnadesioideae), an early-diverging member of Asteraceae endemic to the Argentinean Monte and Patagonia. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 130, n. 4, p. 726-750, 2020.
- VARJABEDIAN, R. Atlantic Rainforest Law: Environmental Regression. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 147-160. 2010.
- VIEIRA, R. F.; SILVA, S. R. In: **Estratégias para Conservação e Manejo de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais e Aromáticas**. In: RESULTADOS DA 1º REUNIÃO TÉCNICA, Brasília: Embrapa/Ibama/MMA/CNPq, p. 184, 2002.

- 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.
- WEBER, G. G.; LIMA, D. L.; PILATI, L.; SILVÉRIO, A.; DA-SILVA, P. R. Utility of heterologous microsatellite markers for population genetic studies on tropical species of Asteraceae. **Genetics and Molecular Research**, gmr18546, 2020.
- WHITMORE, T. C.; PRANCE, G. T. **Biogeography and Quaternary history in tropical America**, Oxford: Clarendon Press, 1987.
- 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.