



**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

**JULIANA DA ROSA**

**ESTRUTURA GENÉTICA-POPULACIONAL DA PLANTA MEDICINAL**  
***Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. BASEADA EM MARCADORES ISSR**

**GUARAPUAVA**

**2015**

**JULIANA DA ROSA**

**ESTRUTURA GENÉTICA-POPULACIONAL DA PLANTA MEDICINAL**  
***Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. BASEADA EM MARCADORES ISSR**

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

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Roberto Da Silva

**GUARAPUAVA**

**2015**

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

R788e Rosa, Juliana da  
Estrutura genética-populacional da planta medicinal *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. Baseada em marcadores issr / Juliana da Rosa. – – Guarapuava, 2015  
xi, 48 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva, 2015

Orientador: Paulo Roberto da Silva  
Banca examinadora: Liliana Essi, Rogério Pincela Mateus

Bibliografia

1. Ciências biológicas. 2. Biologia evolutiva. 3. Mata Atlântica. 4. Asteraceae. 5. Gnaphalie. 6. Macela. 7. Fluxo gênico. 8. Campos sulinos. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

CDD 581.63

À família Batista da Rosa. Especialmente à minha  
mãe Lourdes e meu pai José!

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

A Deus. Meu sustento em todos os momentos bons e difíceis. Que me leva a alcançar águas mais profundas. À Ele toda a glória sempre!

Aos meus pais Lourdes e José e à toda minha família, por todo o amor, pelo dom da vida, pelo incentivo ao meu aprimoramento educacional e por todas as orações.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto Da Silva, por acreditar em mim, por todos os ensinamentos durante o mestrado e ainda proporcionar momentos de crescimento científico e profissional.

A todos os colegas de laboratório Felipe, Renata, Bruna, Daniele, Rafaella, Antonielle, Daiane, Cláudia, Jhonnatan, Ricardo, Rafael, Letícia, Mariana, Jesus, Gabriel, obrigada por fazer dos dias no laboratório mais sorridentes, por toda a ajuda com as análises e com a discussão dos dados,.

A Rafaella Cardoso, que me ajudou a conduzir os experimentos, obrigada por todo companheirismo e por deixar meu trabalho menos difícil.

Ao meu amigo Felipe Górski por toda a ajuda durante os dias em que fiquei impossibilitada de andar, por todos os conselhos e companheirismo nas disciplinas e laboratório.

A todos os amigos do Ministério Universidades Renovadas (MUR). Obrigada por estarem em minha vida, pelas orações, por cada palavra de consolo e por todo o amor dedicado a mim. Obrigada por fazerem parte desse momento tão importante em minha vida.

E a todos que passaram por minha vida acadêmica durante os anos de estudo, todos meus professores, amigos e colegas. Todos os que passam por nossas vidas sempre deixam um pouco de si. Obrigada!

Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade. (Santo Agostinho)

## RESUMO

### **Estrutura genética-populacional da planta medicinal *Achyrocline flaccida* (Weinm.)**

#### **DC.. baseada em marcadores ISSR**

A Mata Atlântica possui alta diversidade vegetal devido as suas diversas fitofisionomias. Dentre estas formações vegetacionais, no sul do Brasil destacam-se os Campos. Apesar da importância da Mata Atlântica e suas fisionomias, estudos genéticos com plantas deste Bioma são insuficientes. *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC., conhecida popularmente como Macela, é uma planta nativa dos Campos da Mata Atlântica que, apesar de sua importância ecológica e medicinal, não possui nenhum dado genético na literatura. Atualmente, os marcadores moleculares são a ferramenta mais indicada para obtenção de dados genético-populacionais. Na literatura são descritos diversos *primers* ISSR (*Inter-simple Sequence Repeat*), porém para obtenção de dados confiáveis e com economia de recursos é necessária a utilização de *primers* robustos para a espécie em estudo. Assim, o objetivo desse estudo foi selecionar os melhores *primers* ISSR para estudos genéticos em *Achyrocline flaccida* e avaliar a diversidade e estrutura genética de populações desta espécie oriundas da região sul do Brasil. Para seleção de *primers* ISSR foram testados 42 *primers* em uma população de 20 indivíduos e para cada *primer* foram calculados os seguintes atributos: Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC), Índice do Marcador (IM) e Poder de Resolução (RP). Dentre os 42 *primers* testados, 35 apresentaram amplificação e dentre estes, com base nos resultados obtidos com os índices PIC, MI e RP, foram selecionados os 10 melhores *primers* para a espécie. Com estes *primers* foram avaliadas, quanto à diversidade e estrutura genética, sete populações (131 indivíduos) de Macela oriundas do sul do Brasil. A AMOVA evidenciou maior variabilidade genética dentro (64,7) do que entre (33,96) as populações, estando a variabilidade distribuída desigualmente entre as populações ( $F_{st}$  0,33). O fluxo gênico entre as populações variou de 5,2 a 1,68, sendo de 1,39 para todas as populações. A avaliação do agrupamento de locos, assim como os dados de presença e ausência exclusiva de locos, revela que ausências exclusivas podem estar contribuindo significativamente para a diferenciação das populações. O teste de Mantel indicou correlação positiva entre distância genética e geográfica. Quanto à análise de PCoA, os dados do agrupamento com base na distância genética de Nei e análise Bayesiana corroboram evidenciando fraca estruturação entre as

populações e confirmam os altos níveis de fluxo gênico entre as populações. Estes resultados evidenciam alta diversidade genética na espécie. A diversidade entre as populações, a estruturação e o fluxo gênico entre as populações de *Achyrocline flaccida*, indicam que ocorre e/ou ocorreu intenso fluxo gênico entre as populações do sul do Brasil. Provavelmente este fluxo gênico é potencializado pela ação antropica. Os dados aqui obtidos poderão ser importantes para o entendimento das bases genéticas da espécie e para elaboração de estratégias de conservação e/ou exploração racional da mesma.

**Palavras-chave:** Mata Atlântica; Asteraceae; Gnaphalidae; Macela; Fluxo gênico; Campos sulinos.

## ABSTRACT

### **Genetic population structure of the medicinal plant *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. based on ISSR markers**

The Atlantic Forest has a high plant diversity due to its various vegetation types. Among these vegetation formations in southern Brazil highlights the "Campos". Despite the importance of the Atlantic Forest and their vegetation types, genetic studies with plants of this biome are insufficient. *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC., popularly known as Macela, is a native plant of the grasslands that despite their ecological and medicinal importance, has no genetic data in the literature. Currently, the molecular markers is the most appropriate tool for obtaining genetic-population data. In the literature many ISSR primers (Inter-simple Sequence Repeat) are available. But, to obtain reliable data and with resource savings is necessary to use robust primers for the species under study. The objective of this study was to select the best ISSR primers for genetic studies in *Achyrocline flaccida* and assess the diversity and genetic structure of populations of this species from southern Brazil. To selection of ISSR primers were tested 42 primers in a population of 20 plants and for each primer was calculated the following attributes: Polymorphism Information Content (PIC), Marker Index (MI) and Resolution Power (RP). Among the 42 ISSR primers tested, 35 showed amplification and of these, based on the results obtained with the index PIC, MI and RP were selected the top 10 primers for the species. With these primers were evaluated the genetic diversity and structure of seven Macela populations (131 samples) from southern Brazil. The AMOVA showed greater genetic variability in (64.7) than between populations (33.96), with the variability unevenly distributed among populations ( $F_{st}$  0.33). Gene flow between populations ranged from 5.2 to 1.68, being 1.39 for all populations. The evaluation of the loci grouping, as well as the data of presence and absence of exclusive loci reveals that exclusive absences may be contributing significantly to the differentiation of populations. The Mantel test indicated a positive correlation between genetic and geographic distance. The PCoA analysis, the of data of grouping loci, the Nei genetic distance and Bayesian analysis corroborate showing weak structuring among populations and confirm the high levels of gene flow between populations. These results show high genetic diversity in the species. The diversity among populations, the structure and gene flow between the populations of *Achyrocline flaccida*

indicate that it occurs and / or there is a high gene flow among populations of southern Brazil. Probably this gene flow is increased by the anthropic action. The data obtained here may be important for understanding the genetic basis of species and development of conservation strategies and / or rational exploitation of the species.

**Keywords:** Atlantic Forest; Asteraceae; Gnaphalidae; Macela; Gene flow; Campos sulinos.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>3</b>
2.1 Mata Atlântica	3
2.2 Campos do Bioma Mata Atlântica	5
2.3 <i>Achyrocline flaccida</i> (Weinm.) DC.	7
2.4 Genética de populações e conservação	9
2.5 Marcadores Moleculares	10
2.6 ISSR ( <i>Inter-Simple Sequence Repeat</i> )	11
2.7 Seleção de <i>primers</i> para estudos genéticos	12
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
3.1 Objetivo Geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>15</b>
4.1 Seleção de <i>primers</i> ISSR para estudos genéticos em <i>Achyrocline flaccida</i>	15
4.1.1 Material vegetal	15
4.1.2 Extração do DNA	15
4.1.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Eletroforese	15
4.1.4 Análises Estatísticas	16
4.2 Análise da diversidade e estrutura genética de populações de <i>Achyrocline flaccida</i> da região sul do Brasil	18
4.2.1 Material Vegetal	18
4.2.2 Extração de DNA, Amplificação via PCR e Eletroforese	19
4.2.3 Análises estatísticas	19
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>22</b>
5.1 Seleção de <i>primers</i> ISSR para estudos genéticos em <i>Achyrocline flaccida</i>	22
5.2 Análise da diversidade e estrutura genética de populações de <i>Achyrocline flaccida</i> da região sul do Brasil	25
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>33</b>
6.1 Seleção de <i>primers</i> ISSR para estudos genéticos em <i>Achyrocline flaccida</i>	33
6.2 Análises da diversidade e estrutura genética de populações de <i>Achyrocline flaccida</i> da região sul do Brasil	35
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>40</b>



## 1. INTRODUÇÃO

As florestas tropicais apresentam ambientes com os maiores índices de diversidade do mundo, contudo a biodiversidade desses ambientes tem sido destruída (SILVA e CASTELETTI, 2005). No Brasil, o bioma Mata Atlântica está reduzida a apenas 7% da sua formação original devido à ação antropica (MMA, 2014). A grande extensão territorial da Mata Atlântica proporciona que diversas fitofisionomias se desenvolvam, dentre elas, as Florestas Ombrófilas Densas, Mistas, Aberta, Estacional Decidual, Estacional Semidecidual e ecossistemas associados, tal como, Campos de Altitude (IBGE, 2012).

Os Campos do Bioma Mata Atlântica, ocorrem geralmente formando mosaicos com a Mata de Araucárias no planalto sul (OVERBECK et al., 2009). Os Campos, de um modo geral, são caracterizados por plantas de pequeno porte, herbáceas, arbustivas e rasteiras. Os campos apresentam uma alta diversidade de espécies, dentre elas plantas de interesse forrageiro, ornamental e medicinal (OVERBECK et al., 2005).

A planta medicinal *Achyrocline flaccida* LAM. (DC), popularmente conhecida como Macela, é utilizada na medicina popular tradicional na forma de chás ou infusões para amenizar sintomas de doenças digestivas. É encontrada nas formações originais dos Campos do sul do Brasil, clareiras ou bordas de matas. Os compostos bioativos presentes nas inflorescências, caule e folhas tal como flavonóides e ácidos caféicos, são responsáveis pelas propriedades medicinais (BROUSSALIS et al., 1988; RETTA et al., 2011; RETTA et al., 2009).

A utilização de macela está associada à cultura popular, as inflorescências são coletadas em campos e beiras de estradas tradicionalmente na Sexta-feira Santa, suas inflorescências são postas para secar e guardadas para utilização posterior (VENDRUSCOLO e MENTZ, 2006). As inflorescências de Macela ainda são utilizadas na confecção de travesseiros e cobertores, devidos as propriedades calmantes. Contudo, são poucas as áreas de cultivo de Macela, assim esta ainda é extraída de populações naturais. A utilização da Macela está fortemente ligada à cultura popular e sua conservação garante a manutenção desse laço cultural entre as comunidades e a planta.

A interpretação dos *status* genético das populações naturais é importante para garantir a conservação da espécie, além de fornecer dados para futuros programas de gestão e conservação de recursos genéticos (HU et al., 2010). Diversos estudos têm sido

utilizados com marcadores genéticos a fim de revelar a estrutura e diversidade genética de populações naturais.

Os marcadores moleculares têm a vantagem de acessar as informações diretamente no genoma em estudo e terem precisão quanto às informações genéticas da espécie (FALEIRO et al., 2007). Em estudos genéticos populacionais têm se buscado marcadores eficientes e com baixo custo, por isso a escolha do tipo de marcador a ser utilizado é crucial para os estudos populacionais.

O marcador molecular ISSR é bastante utilizado em estudos onde o genoma da espécie não é conhecido, o que é uma realidade para a maioria das espécies nativas da Mata Atlântica. O ISSR torna-se barato, com uma execução menos laboriosa, com alto poder de diferenciação entre indivíduos e altos índices de polimorfismo (REDDY et al., 2002). É utilizado tanto em estudos que visam acessar a diversidade genética quanto separar indivíduos.

Dessa forma, visto a importância medicinal e para a cultura popular da espécie *A. flaccida*, estudos genéticos populacionais são justificados para o conhecimento da espécie. A interpretação da diversidade e estrutura genética das populações de Macela pode contribuir para a criação de futuras áreas de conservação e também na gestão dos recursos genéticos dessa espécie.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mata Atlântica

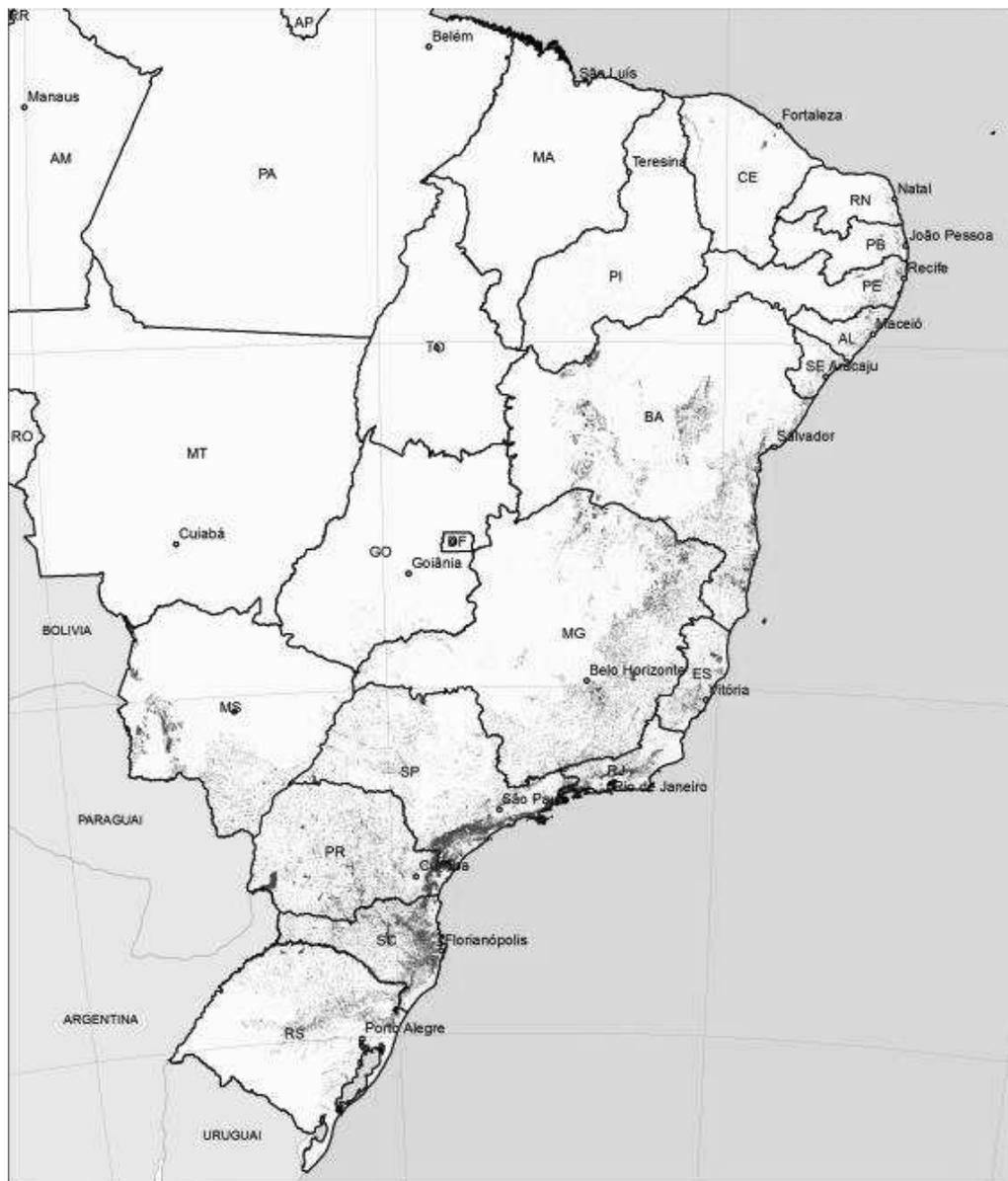
O bioma Mata Atlântica, em sua constituição original, estende-se por quase toda a costa do Brasil, indo do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul. Abrange, juntamente com seus ecossistemas associados, cerca 1,1 milhões de Km<sup>2</sup>, correspondendo a 13% do território brasileiro (MMA, 2014). Este bioma apresenta 2,7% do total de plantas descritas para todos os biomas do planeta, possui altos índices de diversidade, endemismo e complexidade de espécies (MYERS, 2000). Tamanha diversidade é reflexo de sua grande distribuição territorial, variações de altitude, diferenças nas composições dos solos, relevo e climas diferenciados, todos esses fatores contribuem para a formação de diferentes paisagens (SILVA e CASTELETI, 2005).

A Mata Atlântica reúne formações diversificadas e heterogêneas. A diversidade de espécies reflete a diversidade de formações vegetais dentro do bioma. O domínio da Mata Atlântica inclui diversas fitofisionomias como Florestas Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Estacional Decidual. Remanescentes desse bioma são associados a ecossistemas que incluem os manguezais, restingas e Campos de Altitude (IBGE, 2012). Contudo, o crescimento populacional, a expansão urbana descontrolada, a industrialização e o desenvolvimento agrícola tem levado à destruição dos habitats.

A Mata Atlântica é, provavelmente, o ecossistema mais devastado e mais seriamente ameaçado do planeta (GALINDO LEAL e CÂMARA, 2005). Atualmente a Mata Atlântica foi reduzida a 7% da formação original, com grande fragmentação (MMA, 2014) (Figura 1). A ação antropica durante os séculos de colonização levou a uma perda de hábitat comprometendo a sobrevivência da fauna e da flora presentes nesse bioma. A perda da biodiversidade inclui perda de ecossistemas, populações, variabilidade genética e de espécies (GALINDO LEAL e CÂMARA, 2005). Devida a alta biodiversidade, alto grau de ameaça e de endemismo, a Mata Atlântica é uma área de conservação prioritária, considerado um *hotspot* de diversidade por Myers et al., (2000), onde as ações de conservação seriam mais urgentes.

Da mesma forma que a Mata Atlântica está altamente ameaçada, a formação dos Campos sulinos, uma fitofisionomia deste bioma, também está sob forte pressão antropica.

Uma das barreiras para a conservação dessa formação, assim como da Mata Atlântica, é a escassez de conhecimento dessas formações. O estado de conservação dos Campos sulinos é pouco conhecido, já que a avaliação da cobertura dos remanescentes mais importantes permanece incipiente e estudos relacionados às espécies componentes desse ambiente são poucos (OVERBECK et al., 2009). Assim, a necessidade de estudos com plantas nativas associadas aos Campos do Bioma Mata Atlântica faz-se necessário.



**Figura 1.** Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica 2010/2011. A área em amarelo representa a cobertura original da Mata Atlântica; a área verde são os remanescentes da mata no ano de 2010/2011. **Fonte:** Fundação SOS Mata Atlântica, 2012.

## 2.2 Campos do Bioma Mata Atlântica

A vegetação dos campos do sul do Brasil está incluída em dois biomas: no Pampa, correspondente à metade sul do estado do Rio Grande do Sul, e no bioma Mata Atlântica (Figura 2). Os campos do Bioma Mata Atlântica, ocorrem geralmente formando mosaicos com a Mata de Araucárias no planalto sul Brasileiro (ao norte do Rio Grande do Sul, em Santa Catarina e no Paraná) (OVERBECK et al., 2009). A formação de mosaicos com, principalmente as Florestas Ombrófilas Mistras, mantém uma alta diversidade florística e estrutural onde espécies das duas formações podem ser encontradas co-ocorrendo (OVERBECK et al., 2009).



**Figura 2.** Mapa dos ecossistemas de Campos do sul do Brasil. Fonte: PILLAR et al., 2006.

O mosaico formado entre a floresta e os campos, pode ser explicado por sua formação ao longo do tempo geológico. A alternância entre períodos glaciais e interglaciais foi determinante para processos de expansão e retração das formações dos campos e das florestas. A expansão mais recente dos campos sulinos está associada ao último período glacial há 18 mil anos atrás. Durante o Último Máximo Glacial (UMG) os campos eram abundantes e dispersos enquanto que as florestas de Araucária estavam presentes apenas em vales de rios (BEHLING, 1997; BEHLING 2002).

Estudos palinológicos no sul do Brasil detectaram uma dominância da vegetação de campo no Último Máximo Glacial e também entre o início e a metade do Holoceno. Entretanto, a avaliação polínica demonstrou expansão florestal sobre os campos, entre os últimos cinco mil e 930 anos, devido ao clima úmido que se estabeleceu (BEHLING et al., 2004). A expansão florestal deixou os campos restritos às áreas de elevada altitude e clima mais frio. Nas condições climáticas atuais os Campos de Altitude representam relictos de um clima mais seco (BEHLING et al., 2004). Entretanto, após o período de colonização e posterior desmatamento das áreas de florestas as plantas típicas de campos puderam se expandir e colonizar novos ambientes que antes eram exclusivos das espécies florestais.

Fitogeograficamente, os Campos do Bioma Mata Atlântica estão na região Neotropical e fazem parte do domínio biogeográfico amazônico, fazendo parte da província do Paraná (CABRERA e WILLINK, 1980).

A província do Paraná apresenta relevo ondulado, com alta precipitação pluviométrica (acima de 1500 mm), sem estação seca e temperaturas médias anuais variando em torno de 16 e 22°C. Apesar de ocorrência de geada e neve, nas regiões mais elevadas (CABRERA e WILLINK, 1980). Os ambientes encontrados nos Campos associados ao Bioma Mata Atlântica são distintos dos ambientes encontrados nos Campos associados ao bioma Pampa (Província Pampeana), entretanto as vegetações campestres são consideradas mais ou menos conectadas (OVERBECK et al., 2009).

Os Campos do Bioma Mata Atlântica, de um modo geral são ecossistemas naturais com alta diversidade de espécies vegetais, caracterizado pela presença de gramíneas, herbáceas e pequenos arbustos. Os Campos são fisionomicamente representados, principalmente pelas famílias Amaryllidaceae, Asteraceae, Campanulaceae, Cyperaceae, Juncaceae, Oxalidaceae, Poaceae, Rubiaceae, Verbenaceae, Fabaceae e Iridaceae (SAFFORD, 1999). Comparado a parâmetros globais, os Campos estão entre as comunidades campestres com maior nível de riqueza de espécies (OVERBECK et al., 2005).

Conservar os Campos garante a manutenção da biodiversidade, que presta serviços ambientais úteis as comunidades humanas, como a estabilização de ecossistemas, conservação de recursos hídricos, disponibilização de polinizadores e ainda como fonte de recursos genéticos vegetais. Além de fornecerem plantas com interesse forrageiro, ornamental e medicinal, bem como importância social e cultural (OVERBECK et al., 2009).

No Brasil os Campos associados ao bioma Pampa (no Rio Grande do Sul) são mais bem estudados (quanto a dados florísticos, fitossociológicos e também genéticos) que os Campos associados ao bioma Mata Atlântica. Considerando a importância das espécies dos Campos sulinos (Pampa e Mata Atlântica) o Ministério do Meio Ambiente classificou-os como áreas prioritárias para a conservação a fim de que a biodiversidade desses locais possa ser preservada (Fundação SOS Mata Atlântica, 2000).

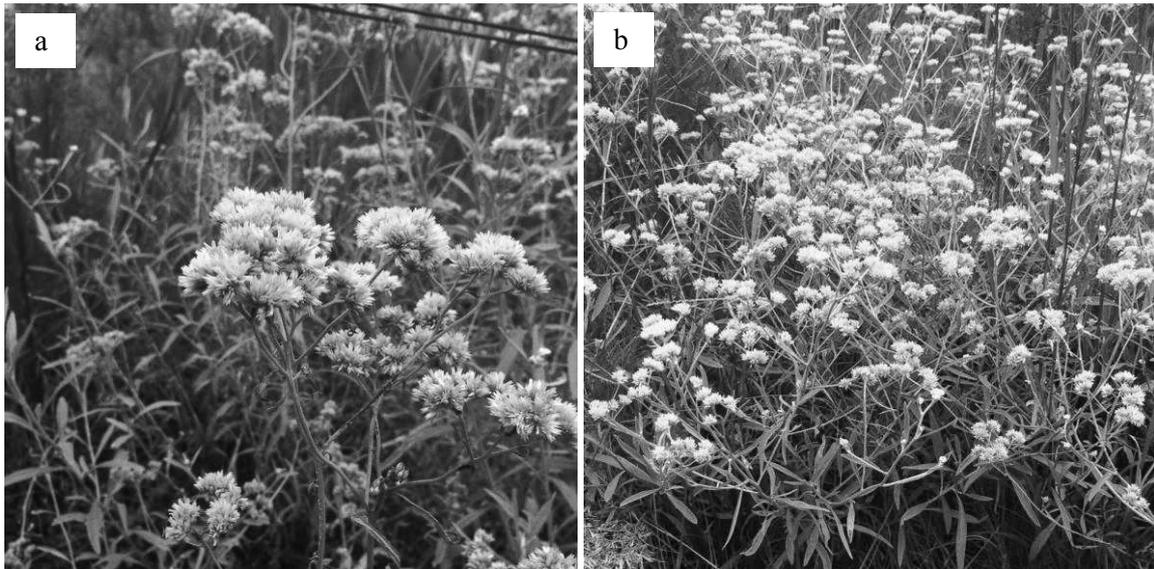
### **2.3 *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC.**

*Achyrocline flaccida* (Figura 3) possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde Venezuela, Colômbia e Bolívia, até metade norte da Argentina, Uruguai e Brasil (Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo) (DEBLE, 2007). Esta espécie está associada tanto aos Campos do Bioma Mata Atlântica quanto aos Campos do Bioma Pampa.

O gênero *Achyrocline* compreende mais de 40 espécies em sua maioria sulamericanas e faz parte da família Asteraceae. *A. flaccida* é a espécie do gênero *Achyrocline* mais frequente no sul e sudeste do Brasil; sua identidade é normalmente confundida com *Achyrocline satureioides*, (DEBLE, 2007). É conhecida popularmente como marcela, macela e macela-amarela (SILVA et al., 2007). A pouca exigência de nutrientes e bom desenvolvimento em solos degradados juntamente com a grande capacidade de colonização faz com que *Achyrocline flaccida* se desenvolva e ocupe diversas áreas.

O crescimento e desenvolvimento da Macela ocorrem em solos pedregosos e arenosos, em terrenos montanhosos ou planos e áreas abertas. Com o desmatamento de áreas florestais, populações de macela passaram a ocupar além das formações de Campo também bordas de matas, áreas sujeitas a queimadas periódicas, beiras de estrada e outros locais abertos (DAVIES et al., 2004).

*Achyrocline flaccida* é caracterizada por serem plantas de aspecto herbáceo, até 1,5 m de altura, ligeiramente ramificada na base, mas com ramos perpendiculares ou ascendentes ao longo do eixo principal, pilosas. Folhas de até 11 cm de comprimento e 1,5 cm de largura, em forma de lança. As inflorescências são chamadas capítulos, que se reúnem em grupos densos (DAVIES et al., 2004).



**Figura 3.** Aspectos da espécie *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. (a) Destaque para as inflorescências (b) Estrutura vegetativa.

Na cultura popular a macela é utilizada como planta medicinal em forma de chás ou infusões, suas características medicinais são comprovadas farmacologicamente. Entre as principais atividades estão: atividade antioxidante e citoprotetora (MORQUIO et al., 2004), antiviral (GARCÍA et al., 1999), efeito inibitório em tumores e na atividade mitogênica de células do baço (FERNÁNDEZ et al., 2002). Na cultura popular é utilizada principalmente para o tratamento das afecções do trato digestivo (SILVA et al., 2007).

Diversos compostos bioativos estão presentes nas folhas, flores e caule, destacam-se flavonóides, flavonas e ácidos caféicos (BROUSSALIS et al., 1988; RETTA et al., 2011). Além de óleos essenciais (RETTA et al., 2009).

A utilização de macela está associada à cultura popular, as inflorescências são coletadas em campos e beiras de estradas tradicionalmente na Sexta-feira Santa, suas inflorescências são postas para secar e guardadas para utilização posterior (VENDRUSCOLO e MENTZ, 2006). As inflorescências de Macela ainda são utilizadas na confecção de travesseiros e cobertores, devidos as propriedades calmantes. Contudo, são poucas as áreas de cultivo de Macela, esta ainda é extraída de populações naturais. A utilização da Macela está fortemente ligada à cultura popular e sua conservação garante a manutenção desse laço cultural entre as comunidades e a planta.

O número cromossômico de *A. flaccida* é  $2N = 28$  (MAZZELA et al., 2010). Contudo, ainda não há na literatura estudos genético-populacionais da espécie.

## 2.4 Genética de populações e conservação

Estudos em genética de populações descrevem padrões de variação dentro e entre populações e como essa variação é influenciada pelos processos evolutivos como deriva genética, gargalos de garrafa, fluxo gênico, seleção natural e outros (FUTUYMA, 2005). Os estudos genéticos populacionais, atualmente têm visado compreender os processos evolutivos que envolvem as populações para inferir estratégias de conservação das espécies (CRUZ et al., 2011; KIANI et al., 2012; HUANG et al., 2014).

A boa gestão e preservação de populações ameaçadas dependem de uma boa compreensão das espécies, incluindo tanto os níveis de distribuição quanto da variação genética (MING-QIAN et al., 2011). A preservação da diversidade genética dentro das espécies é um dos principais alvos da conservação, isto devido a variação genética ser um fator importante para as espécies se adaptarem às mudanças ambientais (HU et al., 2010).

Diversos processos podem gerar diferenças na distribuição fenotípica e variação genotípica entre as populações. As mutações podem produzir novas variantes em uma população, que pode não estar presente na outra. A Deriva genética aleatória, um processo que se torna cada vez mais importante quando o tamanho da população diminui, pode levar a diferentes frequências alélicas ou a fixação de diferentes alelos em populações isoladas, (MCDERMOTT e MCDONALD, 1993).

O movimento de indivíduos e até mesmo de populações inteiras podem espalhar genes superiores e combinações de genes ao longo da distribuição da espécie, tornando esses genes comuns as populações em diferentes locais (STAKLIN 1987). O fluxo gênico é frequentemente considerado como uma força restritiva na evolução. A seleção natural tende a adaptar a população a condições ambientais locais, mas migrantes de outras populações irão introduzir genes adaptados a outras condições. Contudo, o fluxo gênico entre as populações pode impedi-los de evoluir para diferentes espécies (STAKLIN 1987).

O fluxo gênico é responsável por manter próximos os conjuntos gênicos das populações, limitando a divergência genética que possa ocorrer. Quando as populações estão muito afastadas, o isolamento por distância pode afetar as frequências gênicas entre as populações. O isolamento pela distância geográfica e o fluxo gênico restrito gera uma

estruturação genética, devido a deriva genética ser aleatória e ocorrer localmente (HARTL e CLARK, 1997).

Diversos estudos genéticos populacionais realizados visam responder como está o *status* genético das populações naturais (HUANG et al., 2014; THRIVENI et al., 2014; GE et al., 2013; CRUZ et al., 2011). A compreensão de como as populações estão estruturadas no espaço e a diversidade genética fornecem dados que auxiliam na elaboração de estratégias de conservação e manejo dos recursos naturais, caso necessário.

## 2.5 Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares são características do DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente (MILACH, 1998). Em estudos de diversidade e variabilidade genética, os marcadores moleculares são bastante eficientes, pois as informações são acessadas diretamente no genoma das espécies-alvo, permitindo uma análise segura e sem interferência de fatores ambientais (FALEIRO et al., 2007).

O *fingerprinting* do DNA gerado pelos marcadores moleculares permite a identificação de acessos de forma rápida e objetiva. As investigações a nível molecular são importantes não só a nível ecológico ou de genética de populações, mas também para a criação e implementação de estratégias de gestão de recursos (WU et al., 2010).

O precursor de todas as técnicas para análises dessas regiões é o marcador molecular denominado RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), desenvolvido e descrito por Botstein et al. (1980). O RFLP consiste na hibridização de sequências específicas de DNA (as sondas) com o DNA total digerido por enzimas de restrição dos indivíduos amostrados. É co-dominante e apresenta alta repetibilidade apesar de ser um método bastante laborioso e de alto custo (FALEIRO et al., 2007).

Outros métodos baseados em hibridação posteriormente foram desenvolvidos como: os Minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) e os STR (*Short Tandem Repeats*). Entretanto, com a descoberta da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) diversos métodos puderam ser desenvolvidos revolucionando as técnicas em biologia molecular (FALEIRO et al., 2007)

A partir da PCR diversos marcadores moleculares foram desenvolvidos para acessar a diversidade e a variabilidade genética diretamente nas sequências de DNA. Dentre estas técnicas destaca o RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), primeiro

a ser desenvolvido, o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), os Microssatélites (ou SSR - *Simple Sequence Repeats*); e os ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (FALEIRO et al., 2007).

Com o advento do desenvolvimento dos sequenciadores de última geração os marcadores baseados em sequências expressas puderam ser utilizados. Dentre estes temos os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), ESTP (*Expressed Sequence Tag Polymorphisms*) e ASP (*Allele Specific Polymorphism*) (FALEIRO et al., 2007).

Os métodos moleculares são úteis na medida e gestão da biodiversidade. Com os métodos moleculares torna possível obter uma compreensão dos processos e dinâmica da biodiversidade, sua evolução e conservação natural, quando os marcadores certos são utilizados (ANDERSEN e LÜBBERSTEDT, 2003). Os marcadores moleculares podem fornecer informações sobre o processo de introdução e o valor envolvido de variação genética, que finalmente determina o potencial de mudança evolutiva e adaptativa de uma espécie (GARAYALDE et al., 2011).

Em plantas nativas, onde não é conhecido o genoma das espécies, marcadores derivados de *primers* não específicos, como o ISSR, tornaram-se extremamente úteis em estudos de genética de populações, pois não necessitam de conhecimento prévio do genoma das espécies-alvo.

## **2.6 ISSR (*Inter-Simple Sequence Repeat*)**

A técnica ISSR é baseada na amplificação de regiões de 100 a 3000 pb entre regiões microssatélites (RAKOCZY-TROJANOWSKA, 2004). Os *primers* apresentam de 16-25 bases, isso permite uma alta temperatura de anelamento (45-60°C) levando a uma maior especificidade (REDDY et al., 2002). Para o desenho do *primer* podem ser utilizadas quaisquer regiões microssatélites e ser 5' ou 3' ancorado por 2 a 4 nucleotídeos adicionados ao acaso (RAKOCZY-TROJANOWSKA, 2004). A amplificação dos fragmentos ocorre quando há duas regiões repetidas microssatélites idênticas, orientadas em sentidos opostos a uma distância máxima de 3000 pb (ZIETKIEWICZ et al., 1994).

O marcador ISSR apresenta a vantagem de analisar múltiplos *locos* com uma única reação de PCR, sem a necessidade de conhecimento prévio do genoma (ZIETKIEWICZ et al., 1994; WANG et al., 2009). O marcador ainda é bastante informativo devido aos altos índices de polimorfismo produzidos (RAKOCZY-TROJANOWSKA, 2004).

A técnica de ISSR é simples, fácil, eficiente, além de possuir alta reprodutibilidade. Combina a maioria das vantagens dos microssatélites (SSRs) e AFLP com a universalidade do RAPD (REDDY et al., 2002). Entretanto, deve-se destacar algumas limitações da técnica, como o caráter dominante do marcador.

Por se tratar de um marcador dominante, os alelos são revelados pela presença ou ausência de bandas, não sendo possível detectar se o genótipo é homocigoto ou heterocigoto, um fator que considera os marcadores co-dominantes superiores a esse (FALEIRO, 2007). Estudos de genética de populações apontam que esse marcador tende a produzir estimativas ligeiramente mais altas de variação dentro de cada população (NYBON, 2004). Contudo, esse marcador ainda é uma poderosa ferramenta para investigar a variação genética dentro e entre populações (GE et al., 2013).

O alto polimorfismo do marcador ISSR possibilita sua utilização em diversos estudos como diversidade genética, filogenia, marcação de genes, mapeamento do genoma e biologia evolutiva (REDDY et al., 2002).

Os ISSR se mostraram eficientes em estudos de diversidade genética com diversas plantas, tais como: *Rheum tanguticum* (HU et al., 2010); *Cattleya elongata* (CRUZ et al., 2011); *Taihangia rupestris* (WANG et al., 2011); *Viburnum treleasei* (MOURA et al., 2013); *Limonium sinense* (GE et al., 2013); *Prunus armeniaca* (LI et al., 2013); *Artemisia halodendron* (HUANG et al., 2014); *Coccinia abyssinica* (BEKELE et al., 2014); Também estudos para revelar a estrutura genética de populações (TACUATIÁ et al., 2012; THRIVENI et al., 2014 ) e na caracterização genética de espécies como *Leucadendron* sp. e *Tulipa* sp. (KIANI et al., 2012; PHARMAWATI et al., 2005).

Ainda diversos estudos com Asteraceas foram conduzidos utilizando o marcador ISSR, *Tanacetum vulgare* (WOLF et al., 2012); *Aster spathulifolius* (NGUYEN et al., 2013) *Cirsium spp.* (SHEIDAI et al., 2013); *Saussurea chabyoungsanica* (JEONG et al., 2012) *Helianthus annuus* (GARAYALDE et al., 2011).

## **2.7 Seleção de primers para estudos genéticos**

A eficiência de um marcador molecular pode ser medida pela quantidade de polimorfismo que pode ser detectado entre os acessos sob investigação (GRATIVOL et al., 2011). Alguns atributos têm sido recentemente descritos e utilizados na seleção de primers. Dentre eles destacam-se: o Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC) (ROLDÁN-

RUIZ et al., 2000), o Índice do Marcador (MI) (VARSHNEY et al., 2007) e o Poder de Resolução (RP) (PREVOST e WILKINSON, 1999).

Os valores de PIC, para marcadores dominantes, podem variar de 0 a 0,5, valores de PIC de 0,5 indicam a presença do fragmento em 50% dos genótipos e ausência em outros 50% (ROLDÁN-RUIZ et al., 2000). Portanto, quanto mais próximo de 0,5 o valor de PIC, maior será a capacidade de o primer diferenciar um grande grupo de indivíduos e estimar a diversidade e variabilidade genética dentro e entre populações.

O índice de marcação (MI) está diretamente relacionado ao PIC. Para o cálculo do índice MI o valor de PIC para cada fragmento é levado em consideração. O PIC é multiplicado pelo EMR, que considera o número total de bandas e o número de bandas polimórficas. Dessa forma o valor de MI é um balanço entre os níveis de polimorfismo e a capacidade de identificação de *locos* polimórficos (VARSHNEY et al., 2007). O MI pode ser considerado como uma medida geral da eficiência na detecção de polimorfismo (GRATIVOL et al., 2011).

Outra característica importante de um bom marcador é a capacidade de diferenciar acessos. O poder de resolução (RP) possui diversas aplicações e quanto maior o valor maior o poder de distinção entre os indivíduos da população (PREVOST e WILKINSON, 1999). O cálculo de RP considera indiretamente o número de bandas polimórficas de um *primer*, considerando também em quantos indivíduos as bandas estão presentes.

Considerando a importância ecológica e econômica da Macela, e a ausência de dados genéticos moleculares desta espécie, estudos genético-populacionais são importantes para o conhecimento da estrutura genética de suas populações. Devido à ausência de dados de sequências de DNA desta espécie e o elevado custo para obtenção, os marcadores moleculares ISSR são os mais indicados para estudos genéticos moleculares na espécie.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

Analisar a estrutura genética-populacional de *Achyrocline flaccida* da região sul do Brasil utilizando marcadores ISSR.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Selecionar os *primers* ISSR mais informativos para estudos em *A. flaccida*.
- Analisar a similaridade genética entre indivíduos e populações de *A. flaccida*.
- Interpretar índices de diversidade genética de populações de *A. flaccida* da região sul do Brasil.
- Determinar a estrutura genética de populações de *A. flaccida* da região sul do Brasil.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Seleção de *primers* ISSR para estudos genéticos em *Achyrocline flaccida*

#### 4.1.1 Material vegetal

Para a seleção de *primers* ISSR foram amostradas 20 plantas de uma população de *A. flaccida* no município de Guarapuava, Paraná. As plantas que foram amostradas estavam a no mínimo 10 metros uma da outra. De cada planta, as folhas coletadas foram acondicionadas em nitrogênio líquido e mantidas a -20°C até o momento da extração do DNA.

#### 4.1.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino. A extração foi realizada segundo a metodologia de DOYLE e DOYLE (1987). Nos tubos contendo 200 mg de material vegetal foram adicionados 700 µl de tampão composto por: 20mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); 0,1 M de Tris-HCl pH 8,0 (Tris(hidroximetil) aminometano); 1,4 M NaCl (Cloreto de sódio); 2% de CTAB (Brometo de cetil-trimetilamônio); 0,4% de b-mercaptoetanol. Os tubos foram incubados por 45 minutos a 65°C em banho-maria, as amostras foram lavadas com clorofórmio-álcoolisoamílico (24:1) em seguida centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm por duas vezes. O DNA foi precipitado com isopropanol e seguido de diversas lavagens com etanol, para a obtenção de amostras livres de contaminantes.

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

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

Para amplificação do DNA foram utilizados 42 *primers* ISSR desenvolvidos pela University of British Columbia (UBC), Vancouver, Canadá (Tabela 1). As reações de

amplificação do DNA de cada genótipo via PCR foram conduzidas em volume final de 12,5µL contendo: 20ng de DNA, 0,2µM de *primer*, 200µM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> e 1U de Taq DNA Polimerase e 1X de tampão para PCR. Para a PCR o termociclador foi programado com um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 90°C por 45 s, temperatura de anelamento do *primer* (Tabela 1) por 30s e 72°C por 60s. Foi adicionado um passo final de 72°C por 10 min para extensão final dos fragmentos.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,8% corados com brometo de etídio (0,5 µg mL<sup>-1</sup>), submetidos a corrida de 4 horas em 220 V. Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb. O resultado da eletroforese foi visualizado em luz UV e fotodocumentado com sistema digital.

**Tabela 1.** Relação dos 42 *primers* ISSR avaliados em *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. com suas respectivas sequências e temperatura de anelamento (TA).

<i>Primer</i>	Sequência*	TA (°C)	<i>Primer</i>	Sequência*	TA (°C)
UBC 807	(AG) <sub>8</sub> T	52	UBC 848	(CA) <sub>8</sub> AGG	55
UBC 808	(AG) <sub>8</sub> C	50	UBC 852	(CT) <sub>8</sub> AGA	50
UBC 809	(AT) <sub>8</sub> T	55	UBC 855	(AC) <sub>8</sub> CTT	55
UBC 810	(GA) <sub>8</sub> T	52	UBC 856	(AC) <sub>8</sub> CTA	55
UBC 811	(GA) <sub>8</sub> C	52	UBC 857	(AC) <sub>8</sub> CTG	54
UBC 813	(CT) <sub>8</sub> T	50	UBC 858	(TG) <sub>8</sub> AGT	50
UBC 814	(CT) <sub>8</sub> A	50	UBC 859	(TG) <sub>8</sub> AGC	55
UBC 815	(CT) <sub>8</sub> G	52	UBC 860	(TG) <sub>8</sub> AGA	52
UBC 817	(CA) <sub>8</sub> A	52	UBC 861	(ACC) <sub>6</sub>	52
UBC 820	(GT) <sub>8</sub> T	52	UBC 864	(ATG) <sub>6</sub>	55
UBC 822	(TC) <sub>8</sub> A	53	UBC 866	(CTC) <sub>5</sub>	55
UBC 823	(TC) <sub>8</sub> C	52	UBC 868	(GGA) <sub>6</sub>	50
UBC 824	(TC) <sub>8</sub> G	50	UBC 873	(GACA) <sub>4</sub>	50
UBC 826	(AC) <sub>8</sub> C	52	UBC 878	GGA(TGGAT)	52
UBC 827	(AC) <sub>8</sub> G	53	UBC 881	(GGGGT) <sub>3</sub>	53
UBC 828	(TG) <sub>8</sub> A	50	UBC 886	VDV(CT) <sub>7</sub>	55
UBC 834	(AG) <sub>8</sub> CTT	52	UBC 889	DBD(AC) <sub>7</sub>	54
UBC 835	(AG) <sub>8</sub> YC	52	UBC 890	VHV(GT) <sub>7</sub>	54
UBC 836	(AG) <sub>8</sub> YA	53	UBC 891	HVH(TG) <sub>7</sub>	54
UBC 840	(GA) <sub>8</sub> CTT	50	UBC 899	CATGGTGTGGTCATTGTTCCA	50
UBC 843	(CT) <sub>8</sub> AGA	54	UBC 900	ACTTCCCCACAGGTTAACACA	50

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

#### 4.1.4 Análises Estatísticas

Após a eletroforese os géis fotodocumentados foram considerados para montagem da matriz binária. Cada loco amplificado foi avaliado de acordo com a presença (1) ou

ausência (0) da banda. As informações acerca do polimorfismo seguiram o critério de Ott, (1992) onde considera polimórficos os fragmentos presentes em mais de 5% ou em menos de 95% dos indivíduos.

Para selecionar os melhores *primers*, foram determinados para cada *primer* três índices conforme segue:

Conteúdo de Informação de Polimorfismo (PIC), este índice foi calculado como proposto por Roldán-Ruiz et al., (2000) da seguinte forma:

$$PIC = 2 f_{i1} (1 - f_{i2})$$

Sendo  $f_{i1}$  a frequência dos fragmentos presentes no marcador, no mesmo loco e  $(1 - f_{i2})$  a frequência dos fragmentos ausentes no marcador, no mesmo locos.

Índice do Marcador (MI), calculado como proposto por Varshney et al., (2007) como segue a fórmula abaixo:

$$MI = PIC \times EMR$$

Aonde, por sua vez, EMR é calculado como sendo:

$$EMR = n \cdot \beta,$$

Sendo  $n$  o total de bandas amplificadas /  $n^\circ$  total de genótipos (indivíduos) e  $\beta$  o número de bandas polimórficas / número de bandas polimórficas e monomórficas.

Poder de Resolução (RP) dos *primers* também foi determinado, ou seja, a distribuição dos fragmentos pelos genótipos amostrados. O RP foi calculado de acordo com Prevost e Wilkinson (1999), da seguinte maneira:

$$RP = \sum I_b$$

Sendo  $I_b$  calculado segundo a fórmula a seguir:

$$I_b = 1 - (2 |0,5 - p|)$$

Onde  $p$  é a proporção de genótipos que contém a banda.

Após estes cálculos, foram feitas as correlações: PIC e MI, MI e RP, RP e PIC.

A seleção dos 10 melhores *primers* para estudos genéticos em *A. flaccida* foi realizada da seguinte forma: primeiramente foram identificados os 10 *primers* que apresentaram os valores mais altos para cada um dos três atributos. Após realizada a identificação foram selecionados os *primers* seguindo os critérios: 1- *primers* que coincidiram estar entre os 10 melhores para os três atributos; 2- *primers* que coincidiram estar entre os melhores para os índices de PIC e RP; 3- *primers* que apresentaram os maiores valores para MI e RP. Sempre que um *primer* era selecionado, este era descartado no critério seguinte.

## 4.2 Análise da diversidade e estrutura genética de populações de *Achyrocline flaccida* da região sul do Brasil

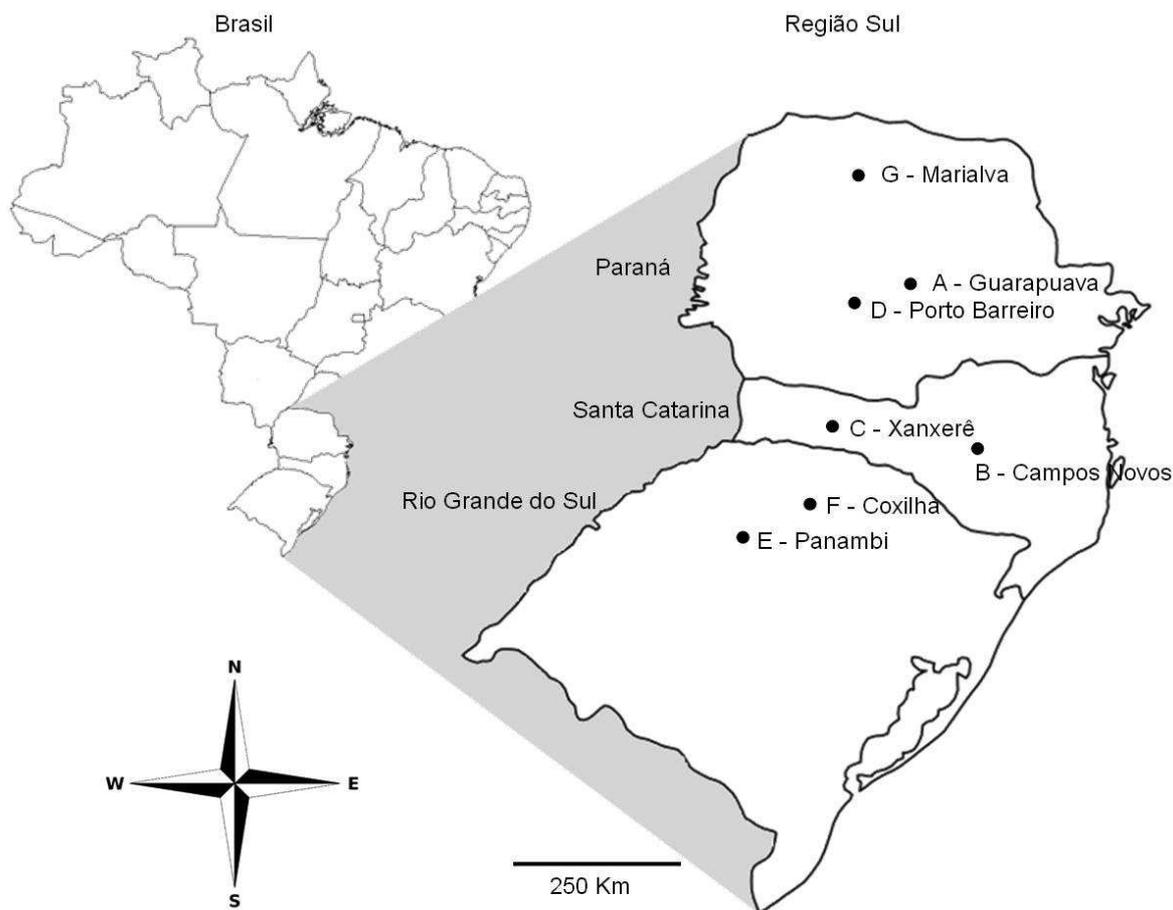
### 4.2.1 Material Vegetal

Para a avaliação do *status* genético de *A. flaccida* foram coletadas folhas de indivíduos de sete populações da espécie. Estas populações foram coletadas nos três estados do sul do Brasil, nos municípios de Porto Barreiro, Marialva e Guarapuava no Paraná, Xanxerê e Campos Novos em Santa Catarina, Panambi e Coxilha no Rio Grande do Sul. De cada população, foram coletados folhas de entre 16 a 20 indivíduos (Tabela 2). As populações foram codificadas como apresentado na tabela 2, e os locais de coleta estão representados na figura 4. As folhas de cada planta foram armazenadas em sílica gel até o momento da extração do DNA.

**Tabela 2.** Locais de Coleta e identificação das populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. UF indica a Unidade da Federação e N número de indivíduos amostrados.

Local de coleta Município	UF	Código população	da	Formação vegetal original	N
Guarapuava	PR	A		Mosaico <sup>1</sup>	20
Campos Novos	SC	B		Mosaico <sup>1</sup>	18
Xanxerê	SC	C		Transição <sup>2</sup>	16
Porto Barreiro	PR	D		Transição <sup>3</sup>	19
Panambi	RS	E		Mosaico <sup>1</sup>	20
Coxilha	RS	F		Mosaico <sup>1</sup>	18
Marialva	PR	G		Estacional Semi Decidual	20

<sup>1</sup> Floresta Ombrófila Mista e Campos; <sup>2</sup> Floresta Estacional Semidecidual e Ombrófila Mista; <sup>3</sup> Floresta Estacional Semidecidual com enclaves de Floresta Ombrófila Mista.



**Figura 4.** Localização geográfica dos pontos de coleta das populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. avaliadas neste estudo.

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

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

#### 4.2.3 Análises estatísticas

Os indivíduos de todas as populações foram genotipados de acordo com a presença e ausência de bandas, a partir desses dados foi construída uma matriz binária. A porcentagem de polimorfismo de cada *primer* ISSR foi calculada dividindo o número de bandas polimórficas pelo número total de bandas amplificadas pelo referido *primer*.

Para a avaliação do padrão de locos nas populações, primeiramente foi determinada a presença exclusiva e ausência exclusiva de locos em cada população. A ausência exclusiva é caracterizada por uma única população não apresentar um referido loco,

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

O índice de diversidade de Shannon (I), a diversidade genética de Nei (He), porcentagem de polimorfismo (P), Coeficiente de Diferenciação Genética (Gst), fluxo gênico (Nm) e de Distância genética de Nei 1978 (D), foram calculadas pelo *software* POPGENE (YEH et al., 1999).

Foram determinados também os índices de diferenciação genética  $\Phi_{ST}$ , variância e níveis de significância pela AMOVA (Análise de Variância Molecular) utilizando o *software* ARLEQUIN versão 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005). A variância genética foi dividida entre as populações e dentro das populações.

As estimativas de identidade e distância genética entre as populações de Macela foram calculadas com base em Nei 1978. A partir da matriz de distância genética de Nei foi construído um dendrograma das populações pelo Método UPGMA.

O teste de Mantel foi realizado para estimar a correlação entre distância genética de Nei (1978) e distância geográfica utilizando o programa NTSYS 2.01, com 1000 permutações (PODANI, 2000).

A análise dos Coordenadas Principais (PCoA) foi realizada no *software* NTSYS 2.01, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. A análise Bayesiana, para obtenção dos clusters (grupos genéticos), foi feita utilizando o programa STRUCTURE (PRITCHARD et al., 2010). Para determinar o número ideal de clusters (K), foram feitas simulações partindo do princípio que era possível a obtenção de qualquer número de clusters entre de 1 e 10, sendo que para cada simulação foram feitas 10 repetições. Para esta análise foi utilizado o modelo de ascendência sem mistura, e as frequências alélicas foram correlacionados por 10000 burn-in e 100000 MCMC (Markov Chain Monte Carlo) repetições após burn-in. Para definição do K (número de clusters - grupos genéticos) mais

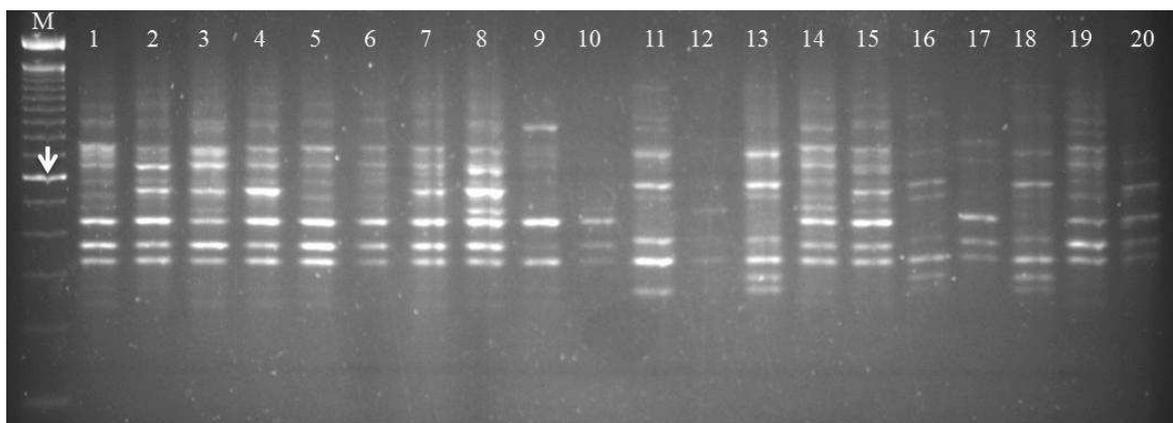
provável em relação aos propostos pela análise, foram utilizados os critérios sugeridos por EVANO et al. (2005), com o auxílio do programa STRUCTURE HARVESTER (EARL e VONHOLD, 2012).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Seleção de *primers* ISSR para estudos genéticos em *Achyrocline flaccida*

Do conjunto de 42 *primers* testados, 35 (83,3%) geraram bandas robustas e com padrão de amplificação satisfatório. O perfil de amplificação representativo em *A. flaccida* com o *primer* ISSR UBC 836 pode ser observado na figura 5.

O número total de fragmentos amplificadas foi de 375, resultando média de 10,7 bandas por *primer*. O *primer* UBC 828 apresentou o menor número de bandas, gerando apenas três bandas, já o *primer* UBC 823 apresentou o maior número, resultando em 21 bandas amplificadas. O tamanho das bandas variou de 220 pb (UBC 857) a 1200 pb (UBC 881). Do número total de bandas amplificadas, 294 apresentaram polimorfismo, resultando média de 75,78% de polimorfismo. A porcentagem de fragmentos polimórficos por *primer* variou de 12,5% (UBC 900) a 100% (UBC 808, UBC 810 e UBC 881).



**Figura 5.** Gel de agarose com o padrão de amplificação do *primer* ISSR UBC 807 em 20 indivíduos (população de Guarapuava) de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. M indica o marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb. A seta indica a banda de 600 pb do DNA Ladder.

Os valores de PIC para os *primers* ISSR avaliados neste trabalho variaram de 0,23 (UBC 900) a 0,49 (UBC 868) com média de 0,34 (Tabela 3). O MI variou de 0,72 (UBC 900) a 9,41 (UBC 891) com média de 5,53. (Tabela 3). Houve correlação positiva entre PIC e MI de ( $r^2 = 0,76$ ,  $P < 0,05$ ). Os valores de RP dos *primers* avaliados variaram de 0,27 (UBC 900) a 9,78 (UBC 834) (Tabela 3). A correlação foi positiva entre os valores de Rp e MI ( $r^2 = 0,59$ ,  $P < 0,05$ ) e entre PIC e RP ( $r^2 = 0,4$ ,  $P < 0,05$ ).

Para a seleção dos *primers* ISSR mais informativos para estudos genéticos populacionais em *A. flaccida* foram levados em consideração os três parâmetros (PIC, MI e RP). Levando em consideração os *primers* que coincidiram estar entre os 10 melhores para os três atributos (PIC, MI e RP) foram selecionados os *primers* UBC 890, UBC 834, UBC 866, UBC 808, UBC 827, UBC 807. Em seguida foram selecionados mais três *primers* que coincidiram estar entre os melhores para os índices de PIC e RP, UBC 857, UBC 848, UBC 855. E por fim foi selecionado o *primer* UBC 835 por apresentar maior valor de MI e RP. Os *primers* selecionados estão destacados em negrito na tabela 3.

**Tabela 3.** Relação dos 42 *primers* ISSR utilizados neste estudo com seus respectivos atributos em *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. PA - produto de amplificação; NF - número de fragmentos amplificados, %P - porcentagem de polimorfismo, PIC - conteúdo de informação polimórfica, MI- índice do marcador, RP - poder de resolução.

<i>Primer*</i>	PA	NF	%P	PIC	MI	RP
<b>UBC 807</b>	✓	12	83,33	0,37	5,71	5,40
<b>UBC 808</b>	✓	11	100,0	0,38	8,30	6,12
UBC 809	✓	6	66,67	0,41	6,81	2,40
UBC 810	✓	9	100,0	0,33	6,59	4,32
UBC 811	-	-	-	-	-	-
UBC 813	✓	10	60,00	0,33	4,58	2,50
UBC 814	✓	7	85,71	0,38	7,11	3,18
UBC 815	-	-	-	-	-	-
UBC 817	✓	13	76,92	0,29	4,25	3,40
UBC 820	✓	12	83,33	0,30	4,76	3,90
UBC 822	✓	5	80,00	0,35	5,81	2,00
UBC 823	✓	21	80,95	0,30	5,04	7,00
UBC 824	✓	7	42,86	0,31	2,74	1,22
UBC 826	✓	8	75,00	0,33	4,92	2,74
<b>UBC 827</b>	✓	14	78,57	0,37	6,50	6,59
UBC 828	✓	3	66,67	0,34	4,52	1,16
<b>UBC 834</b>	✓	16	93,75	0,41	8,04	9,78
<b>UBC 835</b>	✓	16	93,75	0,30	5,54	5,89
UBC 836	✓	13	84,62	0,30	5,05	4,53
UBC 840	-	-	-	-	-	-
UBC 843	✓	9	84,62	0,30	5,05	4,53
<b>UBC 848</b>	✓	18	72,22	0,39	5,49	7,68
UBC 852	-	-	-	-	-	-
<b>UBC 855</b>	✓	10	70,00	0,37	5,14	4,00
UBC 856	✓	6	83,33	0,32	5,03	2,60
<b>UBC 857</b>	✓	14	71,43	0,39	5,48	5,89
UBC 858	✓	11	54,55	0,37	4,50	3,29
UBC 859	✓	4	50,00	0,28	3,13	0,71
UBC 860	✓	4	75,00	0,32	4,95	1,33
UBC 861	-	-	-	-	-	-
UBC 864	-	-	-	-	-	-
<b>UBC 866</b>	✓	14	85,71	0,38	6,82	6,89
UBC 868	✓	5	60,00	0,49	6,53	2,71
UBC 873	✓	8	75,00	0,30	4,24	2,60
UBC 878	-	-	-	-	-	-
UBC 881	✓	9	100,0	0,34	7,07	4,33
UBC 886	✓	18	88,89	0,31	5,17	6,50
UBC 889	✓	11	72,73	0,35	5,58	3,89
<b>UBC 890</b>	✓	14	92,86	0,43	8,90	9,22
UBC 891	✓	17	88,24	0,43	9,41	3,33
UBC 899	✓	12	66,67	0,32	4,66	3,29
UBC 900	✓	8	12,50	0,23	0,72	0,27

\* *primers* em negrito foram os selecionados para estudos genéticos em *A. flaccida* de acordo com os critérios utilizados neste trabalho;

✓apresentou amplificação; - não apresentou amplificação

## 5.2 Análise da diversidade e estrutura genética de populações de *Achyrocline flaccida* da região sul do Brasil

Os 10 *primers* ISSR avaliados nas sete populações de *A. flaccida* amplificaram 221 locos, destes 190 (85,97%) foram polimórficos considerando os indivíduos de todas as populações. Em nível de espécie todos os locos foram polimórficos, entretanto a nível populacional o valor o polimorfismo foi menor (Tabela 4). O polimorfismo dentro de cada população variou de 55,2% (pop. D) a 63,8% (pop. B) (Tabela 4).

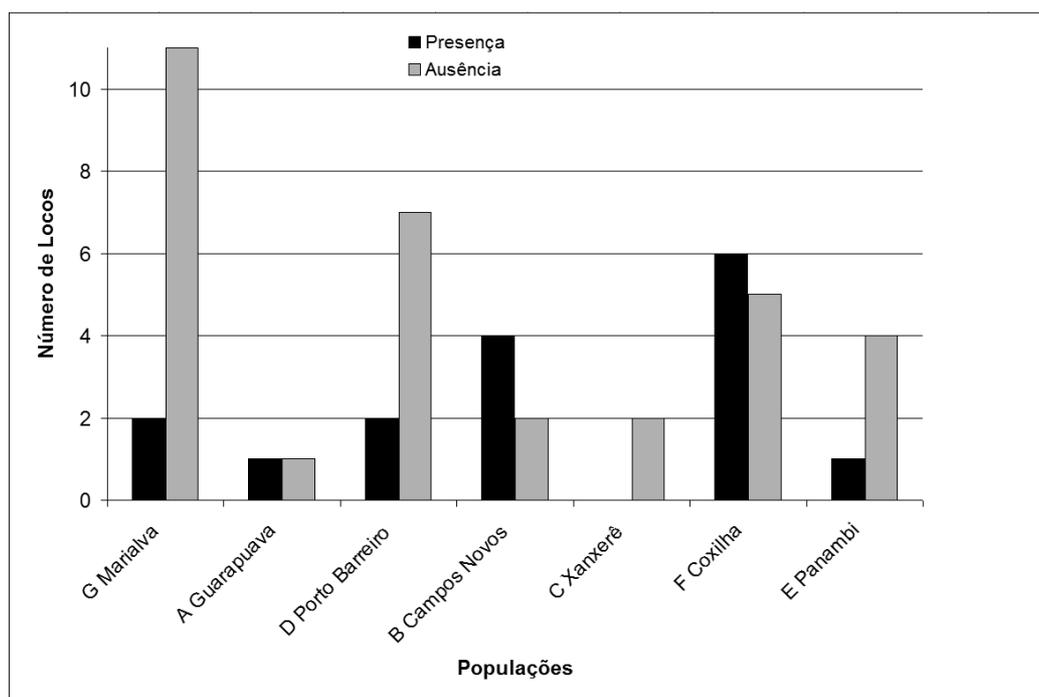
O Índice de diversidade de Shannon (I) variou de 0,23 (pop. G) a 0,31 (pop. E). Considerando todas as populações o Índice de Shannon foi de 0,37 (Tabela 6). Com relação à diversidade genética de Nei (He) as populações apresentaram índice de 0,23 e, quando analisadas as populações separadamente variou de 0,14 (pop. G) a 0,20 (pop. E) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Diversidade genética de populações de *A. flaccida* (Weinm.) DC. da região sul do Brasil. He: diversidade genética de Nei; I: índice de Shannon; P%: porcentagem de locos polimórficos.

	I	He	P%
<b>Pop A</b>	0,28	0,18	62,44
<b>Pop B</b>	0,28	0,18	63,80
<b>Pop C</b>	0,25	0,16	57,01
<b>Pop D</b>	0,26	0,17	55,20
<b>Pop E</b>	0,31	0,20	63,35
<b>Pop F</b>	0,26	0,16	59,28
<b>Pop G</b>	0,23	0,14	56,56
<b>Todas</b>	0,37	0,23	85,97

A avaliação de presença exclusiva de locos em cada população demonstrou que o maior número de locos exclusivos foi a população de F (Coxilha) (Figura 6). Já as populações que apresentaram o menor número de locos exclusivos foram as populações de Guarapuava (A) e Panambi (E) (Figura 6).

Com relação à ausência exclusiva de locos, as populações G (Marialva), D (Porto Barreiro) e F (Coxilha) apresentaram o maior valor (Figura 6). Enquanto, que as populações A (Guarapuava), B (Campos Novos) e C (Xanxerê) apresentaram os menores valores (Figura 6).

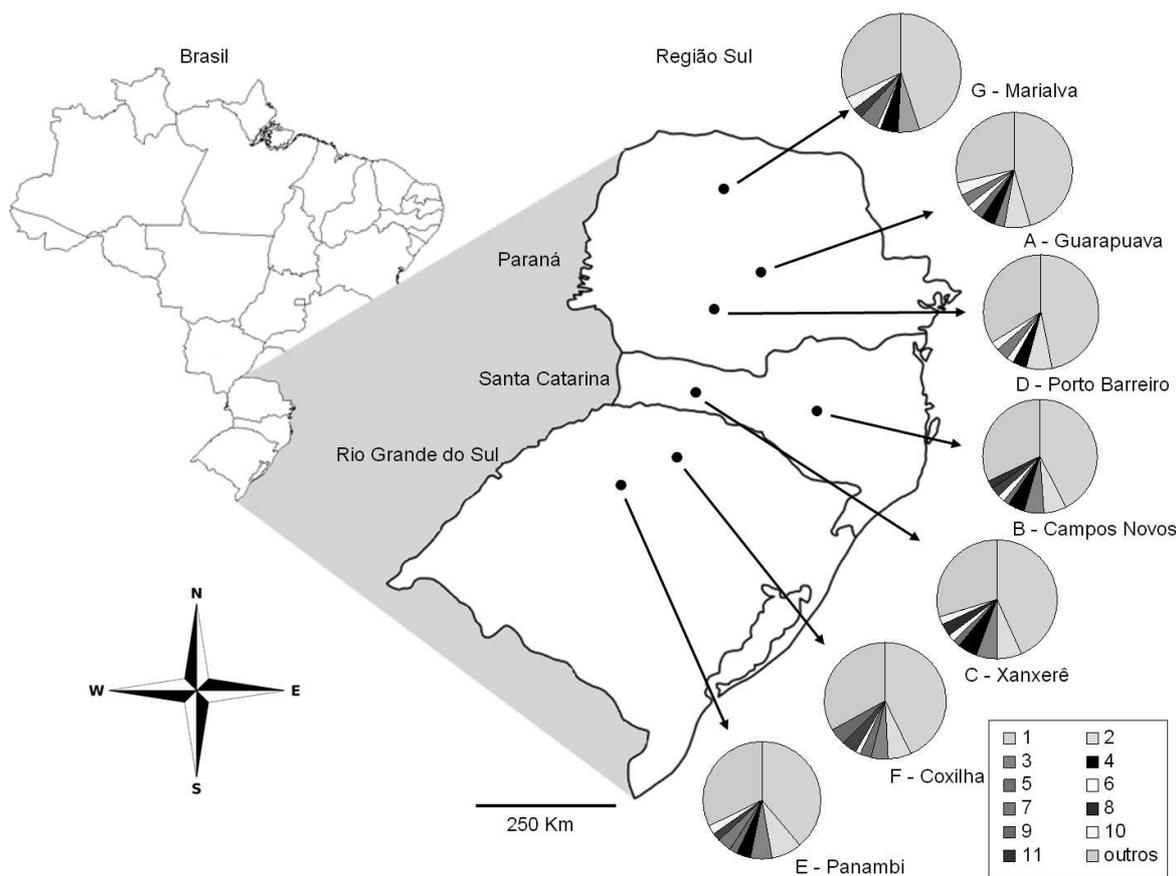


**Figura 6.** Número de presenças e ausências exclusivas de locos ISSR nas populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC.

Dos 221 locos avaliados, 99 formaram 11 grupos com no mínimo 4 locos por grupo (Tabela 5). O maior grupo foi formado por 44 locos presente em todas as populações e o menor formado por 4 locos (Tabela 5). O restante dos 122 locos não apresentaram padrão de distribuição semelhantes entre as populações e são aqui denominados de outros. Na figura 7 é possível observar a distribuição gráfica do padrão de locos nas populações de *A. flaccida* avaliadas neste trabalho.

**Tabela 5.** Padrão de presença e ausência de 11 grupos de locos ISSR nas populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. da região sul do Brasil.

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



**Figura 7.** Padrão da distribuição dos grupos de locos ISSR nas populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. da região sul do Brasil.

O fluxo gênico ( $N_m$ ) entre as populações de *A. flaccida* foi de 1,39. Quando comparadas aos pares, as populações apresentaram valores variáveis de  $N_m$  (Tabela 6). O maior fluxo gênico foi observado entre as populações de Guarapuava (A) e Porto Barreiro (D) (5,20), Guarapuava (A) e Xanxerê (C) (3,69) e Guarapuava (A) e Campos Novos (B) (3,5). Já a menor taxa de fluxo gênico foi constatada entre as populações de Marialva (G) e Coxilha (F) (1,68). O  $G_{st}$  calculado pelo POPGENE foi igual a 0,26.

**Tabela 6.** Fluxo gênico (abaixo da diagonal) e  $G_{st}$  (acima da diagonal) entre populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. estimados com base em dados gerados por marcadores ISSR.

	Pop A	Pop B	Pop C	Pop D	Pop E	Pop F	Pop G
Pop A		0,13	0,12	0,09	0,16	0,20	0,14
Pop B	3,50		0,16	0,15	0,16	0,17	0,15
Pop C	3,69	2,66		0,15	0,20	0,22	0,14
Pop D	5,20	2,79	2,80		0,19	0,23	0,17
Pop E	2,69	2,55	2,01	2,18		0,23	0,22
Pop F	1,95	2,46	1,81	2,71	1,69		0,23
Pop G	3,08	2,78	3,18	2,42	1,85	1,68	

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) evidenciou que a maior variação foi encontrada dentro das populações (66,71%) quando comparada a variação entre as populações (33,29%) (Tabela 7). O índice de diferenciação genética  $F_{st}$  que considera como a diversidade genética está distribuída dentro e entre as populações foi 0,33.

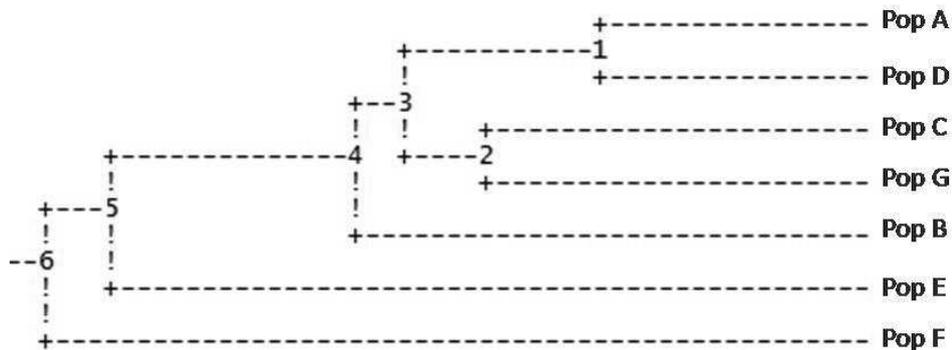
**Tabela 7.** Resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) com base nos dados dos marcadores ISSR das sete populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. coletadas na região sul do Brasil.

Fonte de variação	GL <sup>1</sup>	SQ <sup>2</sup>	Componentes da variância	Varição Total (%)
Entre populações	6	1382,99	11,28	33,29
Dentro de populações	124	2760,19	22,60	66,71
Total	130	4143,19	33,88	
$F_{st}$	0,33			

GL<sup>1</sup> graus de liberdade; SQ<sup>2</sup> Soma dos quadrados

No dendrograma obtido pelas distâncias genéticas de Nei (1978) as populações de Porto Barreiro (D) e Guarapuava (A) foram as mais próximas geneticamente, assim como as de Xanxerê (C) e Marialva (G) (Figura 8). Já, a população de Coxilha (F) foi a mais distante geneticamente das demais. As populações de Campos Novos (B), Panambi (E) e Coxilha (F) estão mais afastadas geneticamente das demais (Figura 8).

A correlação entre as distâncias genéticas de Nei (1978) (Tabela 8) e as distâncias geográficas (em Km) (Tabela 8) entre as populações, estimada pelo teste de Mantel, mostrou-se positiva e significativa ( $r = 0,77$ ;  $p < 0,01$ ).



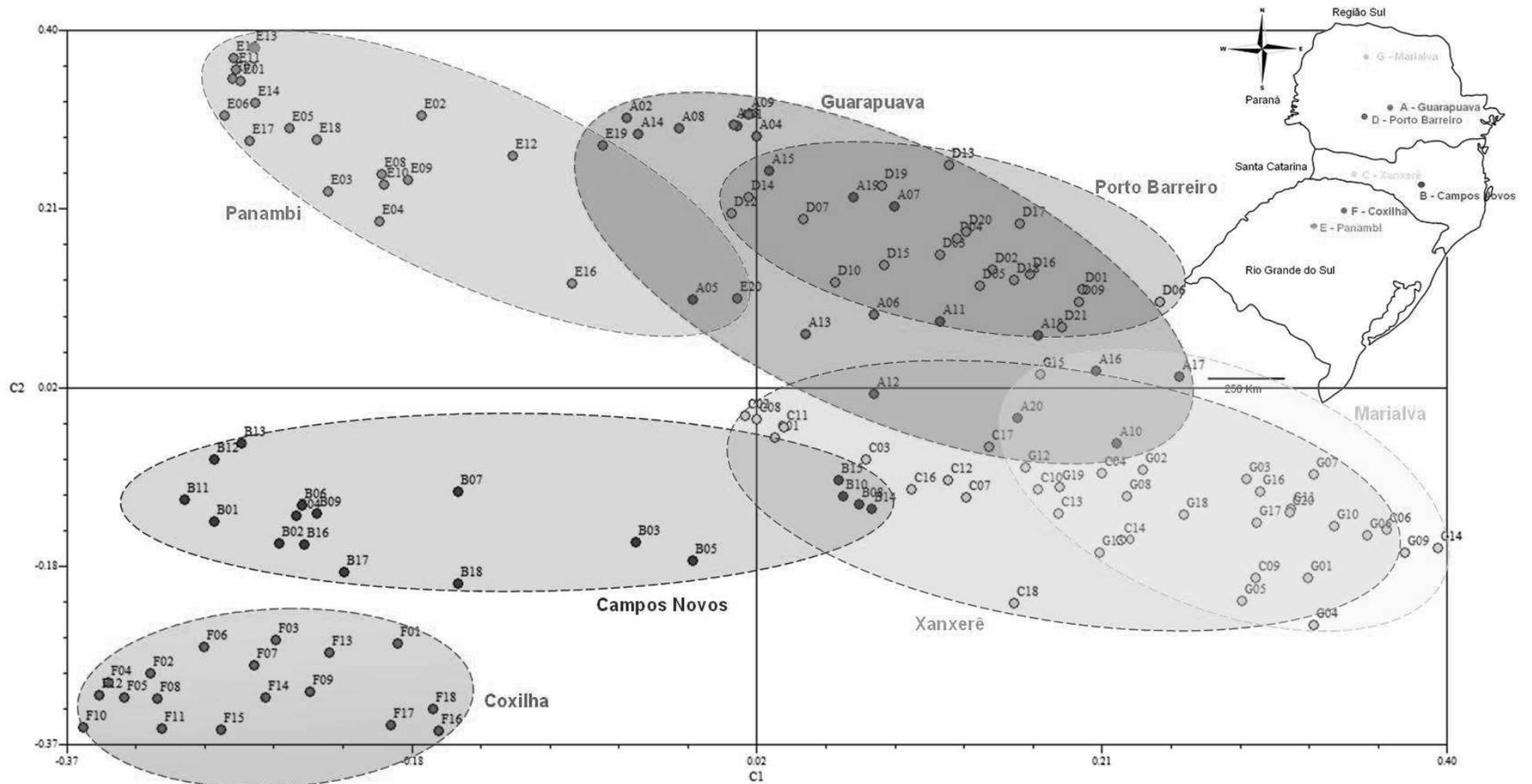
**Figura 8.** Dendrograma com base na distância genética de Nei (1978), estimada com dados de marcadores ISSR, das populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. avaliadas neste trabalho.

**Tabela 8.** Estimativas da distância genética de Nei (1978) (abaixo diagonal) obtidas com dados de marcadores ISSR e distância geográficas (acima diagonal) entre as populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. avaliadas neste trabalho.

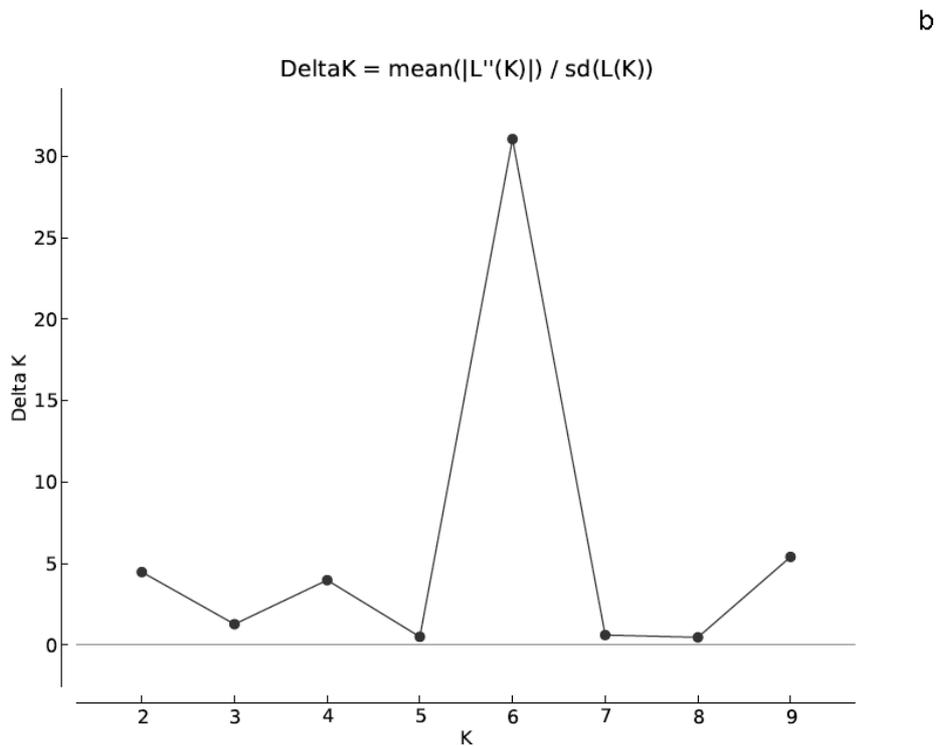
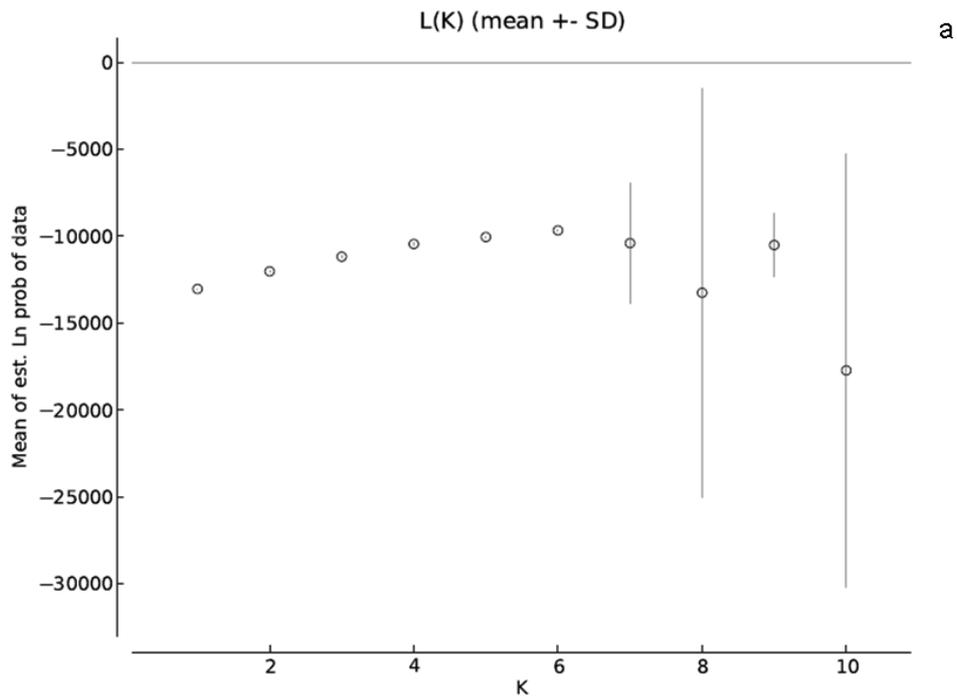
	<b>Pop A</b>	<b>Pop B</b>	<b>Pop C</b>	<b>Pop D</b>	<b>Pop E</b>	<b>Pop F</b>	<b>Pop G</b>
<b>Pop A</b>		211	186	81	380	312	210
<b>Pop B</b>	0,0578		129	215	238	136	439
<b>Pop C</b>	0,0507	0,0732		153	190	140	380
<b>Pop D</b>	0,0359	0,0727	0,0677		335	291	232
<b>Pop E</b>	0,0852	0,0898	0,1102	0,1053		115	558
<b>Pop F</b>	0,1062	0,0815	0,1074	0,1200	0,1367		520
<b>Pop G</b>	0,0589	0,0655	0,0525	0,0750	0,1140	0,1098	

A análise de coordenadas principais (PCoA) reduziu a dimensionalidade dos dados e permitiu a observação da estrutura espacial das populações quanto a sua distribuição. Desse modo, as populações F, E e B apresentaram-se isoladas nos quadrantes, entretanto as populações E e B apresentaram indivíduos afastados do centro do agrupamento da população (Figura 9). As populações A e D, C e G agruparam-se, evidenciando não estruturação (Figura 9).

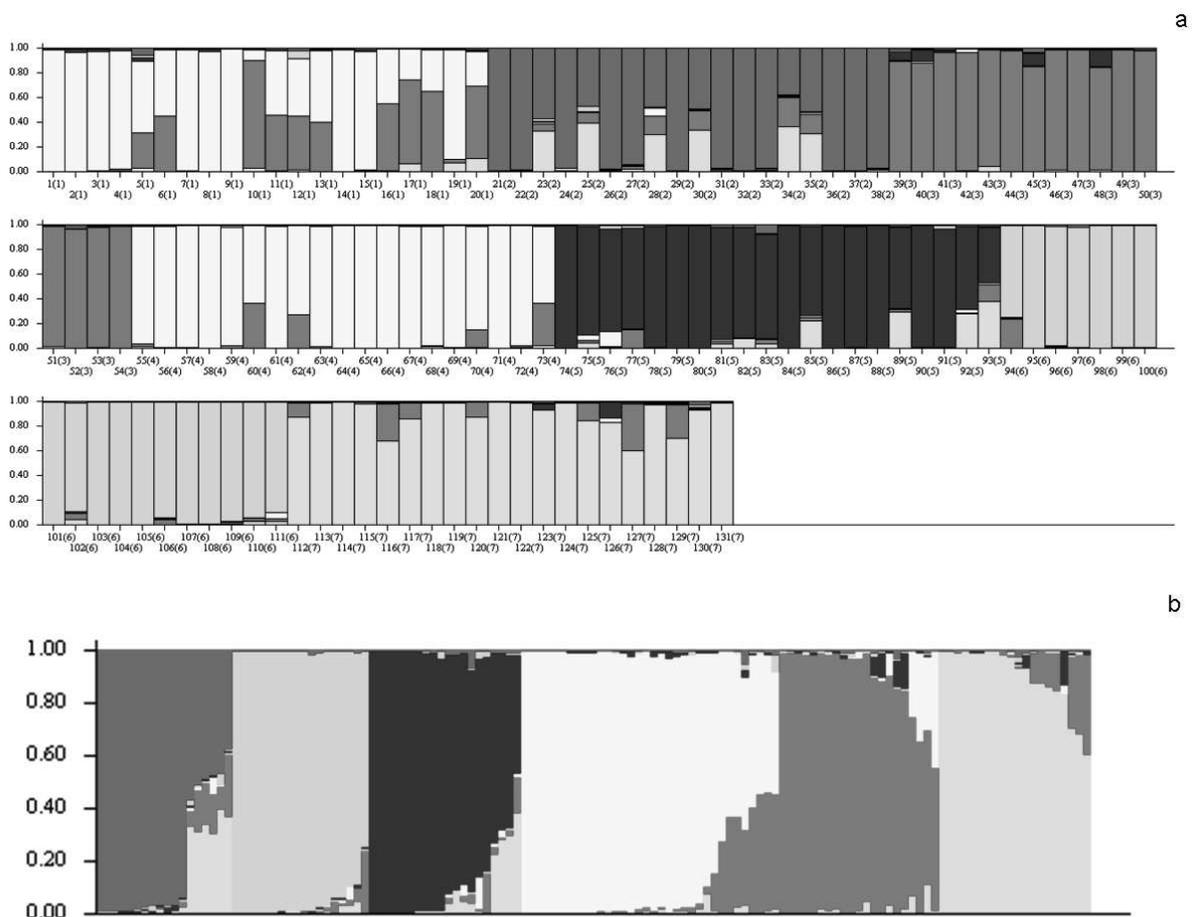
Nas simulações feitas pelo programa STRUCTURE com abordagem Bayesiana, o número de K (Clusters, grupos genéticos) foi definido como seis (Figura 10a e 10b). A distribuição dos grupos genéticos dentro das sete populações considerando indivíduos (Figura 11a) e a distribuição dos indivíduos considerando os seis grupos genéticos obtidos (Figura 11b) demonstra que as populações Porto Barreiro (D) e Guarapuava (A) pertencem ao mesmo grupo genético.



**Figura 9.** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) com base em dados obtidos com marcadores ISSR em populações de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. da Região sul do Brasil. Os círculos indicam a área ocupada por cada população nos quadrantes.



**Figura 10.** Determinação do número ótimo de K (grupos genéticos) em *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. pelo método Bayesiano utilizando dados de marcadores ISSR. a) Probabilidade das médias por valor de K. b) Estimativa pelo método de EVANO et al. (2005). Em ambas as figuras o ponto de intersecção entre o maior valor no eixo Y com o eixo X indica o número ótimo de K (grupos genéticos).



**Figura 11.** Estrutura genética de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. de acordo com os seis grupos genéticos (K) estabelecidos pela análise Bayesiana utilizando dados obtidos com marcadores ISSR. **a)** Distribuição dos grupos genéticos dentro das sete populações considerando indivíduos; **b)** Distribuição dos indivíduos considerando os seis grupos genéticos obtidos. Observe que a população de Guarapuava e Porto Barreiro formaram um único grupo genético (em amarelo) e ainda compartilham características genéticas com a população de Xanxerê (magenta).

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Seleção de *primers* ISSR para estudos genéticos em *Achyrocline flaccida*

Na literatura, diversas sequências de *primers* ISSR estão disponíveis. A escolha dos *primers* mais apropriados para análise genética de uma espécie, depende da capacidade dos mesmos em evidenciar a diversidade genética de uma maneira confiável (ROLDAN-RUIZ et al., 2000) e isto depende da qualidade das ampliações obtidas.

Bons padrões de amplificação dependem da natureza das repetições dos *primers* ISSR utilizados, da ancoragem, número de nucleotídeos por repetição, bases componentes dos *primers* e temperatura de anelamento. A porcentagem de amplificação dos *primers* ISSR em *A. flaccida* (83.3%) é satisfatória quando comparada a outros trabalhos disponíveis na literatura para Asteraceae. Em *Helianthus annuus* 50% dos *primers* apresentaram produtos de amplificação (GARAYALDE et al., 2011). Para *Carthamus tinctorious* 66,65% dos *primers* amplificaram (GOLKAR et al., 2011) e em *Aster spathulifolius* apenas 12% dos *primers* testados apresentaram produtos de amplificação eficientes (NGUYEN et al., 2013). Estes dados evidenciam que os marcadores ISSR são eficientes para acessar o genoma de *A. flaccida*.

A maioria dos estudos que selecionam *primers* ISSR para posteriores estudos genéticos levam em consideração *primers* com bandas claras e com boa reprodutibilidade (LUAN et al., 2006; GRATIVOL et al., 2011; NGUYEN et al., 2013). Em outros trabalhos o número de bandas polimórficas produzidas, tamanho da banda, a intensidade da amplificação e reprodutibilidade, são levados em consideração para a seleção dos *primers* mais informativos (KIANI et al., 2012). Entretanto, a seleção de marcadores apenas por essas características pode suprimir informações a respeito da espécie em estudo. Neste sentido o uso de metodologias baseadas em análises estatísticas devem ser levados em consideração na seleção dos *primers* mais informativos.

Os valores de PIC, para marcadores dominantes, podem variar de 0 a 0,5, valores de PIC de 0,5 indicam a presença do fragmento em 50% dos genótipos e ausência em outros 50% (ROLDÁN-RUIZ et al., 2000). Portanto, quanto mais próximo de 0,5 o valor de PIC, maior será a capacidade do *primer* diferenciar um grande grupo de indivíduos e estimar a diversidade e variabilidade genética dentro e entre populações. O PIC tem sido utilizado em outros trabalhos para determinar a eficiência dos marcadores utilizados como em *Jatropha curcas* com os marcadores AFLP e ISSR (TATIKONDA et al., 2009;

GRATIVOL et al., 2011). Em *Vetiveria zizanioides* os valores médios de PIC foram altos 0,42, enquanto que nesse trabalho encontramos média de 0,34 (SIGH et al., 2014). Essa diferença pode ser dar devido ao grande número de marcadores utilizados nesse estudo e ao alto desvio padrão dos valores de PIC, já que houve uma variação de 0,23 a 0,49.

Os *primers* que apresentaram um menor número de fragmentos obtiveram valores altos de PIC. Isso se deve ao fato de que a fórmula utilizada para o cálculo de PIC leva em consideração a média dos valores de PIC de cada fragmento, que representa a frequência dos fragmentos presentes no marcador. Logo, quanto menor o número de fragmentos, maior a chance de o resultado tender a 0,5, por se tratar de uma média.

A média do atributo MI apresentada pelos *primers* é variável de acordo com a espécie e tipos de marcadores. Em *J. curcas* a média de MI foi igual a 17,86, já em caju a média foi de 1,76 e ainda *Canna generalis* apresentou MI médio de 8,86 (GRATIVOL et al., 2011; THIMMAPPAIAH et al., 2009; PATRA et al., 2008). Em *A. flaccida* a média do MI foi 5,53 valor intermediário aos encontrados na literatura. Este dado demonstra que os marcadores ISSR utilizados são eficientes e adequados para estudos da diversidade genética em Macela.

A correlação positiva entre os índices de PIC e MI ( $r^2 = 0,76$ ) já era esperada, pelo fato dos valores de PIC serem utilizados na fórmula para o cálculo de MI. Outros trabalhos também apontam essa forte correlação em Mamona (*Ricinus communis* L.)  $r^2 = 0,95$  e em *Jatropha curcas* de  $r^2 = 0,66$  (VASCONCELOS JUNIOR, 2011; TATIKONDA et al., 2009). Esta observação evidencia que qualquer um dos dois parâmetros podem ser utilizados para comparar a quantidade de informação gerada pelos marcadores ISSR utilizados nesse trabalho.

Com relação ao índice RP, os *primers* que apresentaram maior número de fragmentos, na maioria das vezes são os que apresentaram maior valor de RP. Este resultado pode ser explicado pelo fato da fórmula utilizada para o cálculo de RP levar em consideração a somatória dos valores de  $I_b$  (informatividade do fragmento), levando a altos valores de RP quando os fragmentos apresentarem maior número de bandas presentes. Foi verificado também correlação significativa entre MI e RP, o que corrobora com outros trabalhos. Com os marcadores AFLP em *Jatropha curcas*, a correlação foi  $r^2 = 0,99$  (TATIKONDA et al. 2009). Em batata doce utilizando marcadores ISSR a correlação foi  $r^2 = 0,87$  (CAMARGO et al., 2013).

O índice mais adequado para a escolha de *primers* ISSR dependerá dos objetivos do estudo a serem realizados. O PIC é indicado para seleção de *primers* em estudos de diversidade genética. Enquanto que o RP é indicado para análises onde é necessário separar os indivíduos. O MI é utilizado para minimizar os efeitos de fragmentos monomórficos que reduzem os valores de PIC. Dessa forma, os três atributos devem ser utilizados para a seleção dos *primers* em estudos de genética de populações. A seleção balanceada de *primers* que contenham boa capacidade de detectar polimorfismos e ao mesmo tempo gerar um alto número de bandas e separar indivíduos são requisitos necessários para bons resultados.

A utilização dos três parâmetros (PIC, MI e RP) possibilitou a seleção dos 10 melhores *primers* ISSR para estudos genéticos em *A. flaccida* possibilitando redução de custos e diminuição do tempo das análises, sem perda de informações nos estudos de genética de populações.

## **6.2 Análises da diversidade e estrutura genética de populações de *Achyrocline flaccida* da região Sul do Brasil**

Globalmente, as plantas medicinais se tornaram ameaçadas devido às atividades humanas, como a fragmentação do habitat e extração excessiva. Com o aumento da demanda por plantas medicinais, tem havido uma exploração sem precedentes diretamente em seus habitats naturais (THRIVENI et al., 2014). Para a conservação e gestão eficaz desses importantes recursos medicinais, informações adequadas sobre a quantidade e distribuição da diversidade genética dentro e entre populações são necessárias (HAMRICK e GODT, 1990).

A porcentagem de polimorfismo tem sido usada por alguns autores como uma medida de diversidade. Em Asteraceas, valores variáveis de polimorfismo foram encontrados: 98,78% em *Aster spathulifolius* (NGUYEN et al., 2013), 65,05% em *Nouelia insignis* (LUAN et al., 2006) e 70,0% em *Carthamus tinctorious* (GOLKAR et al., 2012). Em *A. flaccida* o polimorfismo observado foi elevado (85,97%), o que indica alta variabilidade genética na espécie.

As diversidades genéticas de Nei e Shannon em *A. flaccida* apresentaram valores moderados quando avaliadas em nível de população e nível relativamente alto de diversidade quando comparadas em nível de espécie (Tabela 4). Dados semelhantes foram

observados também com marcadores ISSR na planta medicinal e ornamental *Fritillaria imperialis* (I=0,43, He=0,29, P=80,5), (BADFAR-CHALESHTORI et al., 2012) e em *Rheum tanguticum*, uma erva medicinal perene ameaçadas de extinção na China, ( I = 0,41, H = 0,26) (HU et al., 2010). Já, para a espécie medicinal e ameaçada *Coscinium fenestratum*, (I=0,29; He=0,20; P= 46%) (THRIVENI et al., 2014) e a Orquidaceae *Cattleya labiata* (I=0,29; He=0,19; P=62,03) os valores foram baixos. HAMRICK e GODT (1990) sugerem que a distribuição da diversidade genética de uma espécie de planta é influenciada pelas características específicas da espécie, como a deriva genética, o fluxo gênico, o modo de reprodução e sistema de acasalamento. A baixa diversidade intrapopulacional pode ser explicada por alguns fatores: Primeiro, a diversidade pode ser influenciada por fatores históricos, por exemplo, o efeito fundador, durante a formação de novas populações a partir de uma ou várias populações originais; Segundo, populações pequenas podem ter cruzamentos endogâmicos; E finalmente, as atividades humanas através da diminuição dos habitats e extrativismo, podem reduzir a diversidade a nível populacional.

A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que a variabilidade está desigualmente distribuída entre as populações ( $F_{st} = 0,33$ ). A maior variabilidade genética é encontrada dentro das populações (66%) do que entre elas (33%), o que é característico de espécies alógamas ou para espécies classificadas como pioneiras (NYBOM, 2004; CRUZ et al., 2011; TACUATIÁ et al., 2012). Nas Asteraceas *Viburnum treleasei* (MOURA et al., 2013) e *Artemisia halodendron* (HUANG et al., 2014) também verificaram uma grande variação dentro das populações. Estes resultados corroboram com o descrito na literatura para *A. flaccida* que a classificam como pioneira e indicam a alogamia da espécie.

A ocorrência de locos exclusivos em cada população (Figura 6) parece não contribuir significativamente para a diferenciação da distribuição da variabilidade entre as populações de *A. flaccida*. Isto é evidenciado na figura 7, onde há certa uniformidade na distribuição dos grupos de locos nas populações (grupos com frequências semelhantes). Já, a alta ausência exclusiva de locos (11) na População de Marialva (G) parece corroborar com os dados de diversidade de Shannon e Nei (índices baixos) da população. Observações feitas nos últimos 25 anos não detectaram a ocorrência de Macela na Região de Marialva, assim é possível que a população de *A. flaccida* colonizou o local nos últimos cinco anos (DA SILVA, P.R., comunicação pessoal). Os resultados obtidos neste trabalho para esta

população, e as observações de não ocorrência da espécie por um longo período na região, levam a hipótese de que essa população sofreu efeito fundador.

As populações coletadas em Guarapuava, Panambi, Coxilha, Campos Novos e Xanxerê são provenientes, em sua formação vegetal original, de Floresta Ombrófila Mista formando mosaicos com Campos, enquanto que as populações de Porto Barreiro e Marialva são oriundas de formações de Floresta Estacional Semidecidual. A Floresta Estacional Semidecidual é caracterizada por ser uma mata densa, com diversas plantas arbóreas, impossibilitando o crescimento de herbáceas heliófitas. Com a colonização humana e posterior derrubada das florestas durante os últimos 200 anos, as áreas antes com vegetação densa passaram a ser regiões abertas, o que possibilita o crescimento de plantas herbáceas, como *A. flaccida*. Assim, as populações atualmente encontradas nas regiões de Floresta Estacional Semidecidual, são provavelmente de colonização recente.

O nível de fluxo gênico (1,39) corrobora com o nível de estruturação ( $G_{st} = 0,26$ ;  $F_{st} = 0,33$ ), entre todas as populações analisadas conjuntamente. Contudo, quando analisadas par-a-par observou-se que populações próximas geograficamente apresentam maior fluxo gênico e menor grau de diferenciação (Tabela 6). Esse padrão apresentado pelas populações de *A. flaccida* levou a uma alta correlação entre as distâncias genéticas e geográficas.

Os níveis de fluxo gênico (Tabela 6) entre as populações de *A. flaccida* estudadas sugere que estas têm historicamente experimentado um nível alto de intercâmbio genético (fluxo gênico). Nesse contexto, ao considerar o fluxo gênico entre populações, é necessário levar em consideração que está sendo descrito o fluxo gênico histórico. O fluxo gênico estimado pode descrever um padrão migratório de populações ocorrido no passado e no presente, assim, os dados aqui observados não devem ser interpretados considerando somente o atual estado de isolamento das populações (LUAN et al., 2006; GODT et al., 2005).

A distribuição das populações nos quadrantes com base na análise de componentes principais (Figura 9) corrobora com o agrupamento feito pela distância genética de Nei (1978) (Figura 8). As populações Coxilha (F), Campos Novos (B) e Panambi (E) ficaram isoladas nos quadrantes 2 e 3. A população de Coxilha que é a mais distante geneticamente de todas, apresentou o maior número de locos exclusivos e terceiro maior número de ausências exclusivas (Figura 6) o que pode explicar esse agrupamento distante das demais populações.

A análise Bayesiana demonstrou que há seis grupos genéticos ou clusters ( $k=6$ ) entre as populações de *A. flaccida* analisadas (Figura 8 e 9). Em *A. spathulifolius* a análise Bayesiana apontou que dentre as 15 populações analisadas havia apenas dois clusters. Tem-se especulado que parte de uma população de *A. spathulifolius* foi separada a partir do grupo original pela ruptura geológica ocorrida no passado entre Japão e Coréia, o que explica o porquê das populações distribuídas ao longo da Costa do Japão terem estreita relação com as distribuídas no sul Coreano (NGUYEN et al., 2013). Em *Coscinium fenestratum* oito populações apresentaram número de clusters igual a dois, a justificativa para tal, sugere que essas populações têm apresentado um nível histórico de intercâmbio genético (THRIVENI et al., 2014). Em *A. flaccida*, observou-se que o número de grupos genéticos foi menor que o número de populações, devido às populações A (Guarapuava) e D (Porto Barreiro) formarem um único grupo genético. Observou-se ainda que as populações de Paraná e Santa Catarina compartilham mais características genéticas (Figura 11) e apresentam alto fluxo gênico (Tabela 6), principalmente entre as populações A, D e C, sugerindo que o fluxo gênico tem papel fundamental na formação de grupos genéticos em *A. flaccida*.

A proximidade genética e o alto fluxo gênico, aliado a distribuição das populações pela análise de componentes principais, além da análise Bayesiana, levam a hipótese de que as populações de Guarapuava “A” e Porto Barreiro “D” possam assumir um modelo de metapopulação, sendo a população “D” oriunda de um processo de colonização recente.

A análise de agrupamento UPGMA corrobora a estreita relação entre as populações do Paraná e Santa Catarina. A estrutura genética das populações naturais é fortemente afetada por fatores intrínsecos, como capacidades migratórias e sistemas de acasalamento, e os fatores extrínsecos, incluindo as características ecológicas dos seus habitats e acontecimentos históricos (GÓMEZ-GÓMEZ et al., 2012).

A formação histórica da vegetação dos Campos desses dois estados pode ter desempenhado ação decisiva nesses padrões genéticos. Diversos estudos têm mostrado que faixas campestres se estendiam por todos os estados do sul do Brasil durante os períodos glaciais, no Holoceno Inferior e Médio (BEHLING et al., 2004; BEHLING, 2002; BEHLING, 1997). A diminuição da temperatura e umidade nestes períodos favoreceram a expansão da distribuição das espécies de plantas típicas de regiões campestres nos estados do sul do Brasil. 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 por extensas faixas de florestas, e nas regiões mais altas formando mosaicos floresta-campo. Neste sentido, é possível que as populações de *A. flaccida* do Paraná e Santa Catarina foram de certa forma "contínuas" no passado o que pode justificar a alta semelhança observada entre estas populações.

A ação antrópica também deve ser levada em consideração no padrão de distribuição e da diversidade da espécie. A larga utilização e comercialização das inflorescências maduras, portadoras de sementes, ou mesmo a utilização de travesseiros e acolchoados com Macela, pode contribuir significativamente para o fluxo gênico e estrutura das populações. Testes de germinação de sementes de *A. saturoioides*, espécie muito próxima de *A. flaccida*, apontaram que 25% das sementes ainda estavam viáveis após 10 meses de armazenamento (IKUTA e BARROS, 1996). Esse fato corrobora com a hipótese de que após maduras e armazenadas as sementes de Macela podem colonizar ambientes distantes de onde foram colhidos, influenciando no intercâmbio gênico entre populações.

A Macela é uma planta medicinal vendida na maioria dos supermercados do sul do Brasil. As inflorescências que são comercializadas não passam por processamento que prejudicam a germinação, pois estas são embaladas *in natura*. Há empresas de manufaturamento da espécie nos três estados do sul e estas realizam distribuição para todos os estados do sul. Esta situação potencializa o fluxo gênico da espécie por meio de sementes podendo, juntamente com o fluxo gênico histórico, estar contribuindo para a uniformidade genética de algumas das populações aqui estudadas.

Em *A. flaccida* é possível que apesar de haver forte degradação do ecossistema que a espécie ocorre e exploração da planta diretamente em suas populações naturais, a característica rudeal da espécie e o fluxo gênico entre as populações parece ter garantido sua diversidade genética. Ainda não é possível afirmar se está havendo perda de variabilidade, pois não há dados genéticos anteriores da espécie. Diante disso, os dados obtidos aqui a respeito da diversidade e estrutura genética das populações de Macela podem contribuir para a criação de futuras áreas de conservação e também na gestão dos recursos genéticos dessa espécie.

## 7. CONCLUSÕES

- A seleção e conseqüentemente o uso de um menor número de *primers* ISSR para estudos genéticos-populacionais é vantajosa por reduzir o tempo e o custo das análises, mantendo a eficiência dos testes;

-As populações de Macela apresentaram alta diversidade;

-As correlações entre distâncias genéticas e geográficas corroboram com as taxas de fluxo gênico e diferenciação genética entre as populações de *A. flaccida*;

-A AMOVA, PCoA e análise Bayesiana indicam que as populações de Macela apresentam fraca estruturação;

-A análise Bayesiana indica que as populações de *A. flaccida* de Guarapuava, Porto Barreiro e Xanxerê têm e/ou teve alto nível de intercâmbio genético;

-O intercâmbio genético entre as populações pode atualmente está sendo potencializado pela ação antrópica, por meio da dispersão de sementes;

- Os marcadores moleculares ISSR são eficientes para estudo de genética de populações em *A. flaccida*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, J.R.; LÜBBERSTEDT, T. Functional markers in plants. **Trends in plant science**, v.8, n.11, p.554-560, 2003.
- BADFAR-CHALESHTORI, S.; SHIRAN, B.; KOHGARD, M.; MOMMENIA, H.; HAFIZI, A.; KHODAMBASHI, M.; MIRAKHORLI, N.; SORKHEH, K. Assessment of genetic diversity and structure of Imperial Crown (*Fritillaria imperialis* L.) populations in the Zagros region of Iran using AFLP, ISSR and RAPD markers and implications for its conservation. **Biochemical Systematic and Ecology**, v.42, p.35-48, 2012.
- BEHLING H. Late Quaternary vegetation, climate and fire history in the Araucaria forest and campos region from Serra Campos Gerais (Paraná), S Brazil. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v.97, p.109-121, 1997.
- BEHLING, H. South and southeast Brazilian grassland during late Quaternary times: a synthesis. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v.177, p.19-27, 2002.
- BEHLING, H.; PILLAR, V.D.; ORLÓCI L.; BAUERMAN, S.G. Late Quaternary Araucaria forest, grassland (Campos), fire and climate dynamics, studied by high-resolution pollen, charcoal and multivariate analysis of the Cambará do sul core in southern Brazil. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, n.203, p.277-297, 2004.
- BEKELE, A.; FEYISSA, T.; TESFAYE, K. Genetic diversity of anchote (*Coccinia abyssinica* (Lam.) Cogn.) from Ethiopia as revealed by ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.61, p.707-719, 2014.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- BROUSSALIS, A.M.; FERRARO, G.E.; GURNI, A.; COUSSIO, J.D. Phenolic constituents of four *Achyrocline* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 16, p.401-402, 1988.
- CABRERA, A.L. 1980. apud OVERBECK, G.E. et al. Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v.9, p.101-116, 2007.
- CAMARGO, L. K. P.; MORGOR, A. F.; RESENDE, J. T. V; DA SILVA, P.R.; Establishment and molecular characterization of a sweet potato germplasm bank of the highlands of Paraná State, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.4, n.12, p.5574-5588, 2013.
- CRUZ, D.T.; SELBACH-SCHNADELBACH, A.; LAMBERT, S.M.; RIBEIRO, P.L.; BORBA, E.L. Genetic and morphological variability in *Cattleya elongata* Barb. Rodr. (Orchidaceae), endemic to the campo rupestre vegetation in northeastern Brazil. **Plants Systematics and Evolution**, n.294, p.87-98, 2011.

- DAVIES, P. Plantas Aromáticas y Medicinales In: **Estudios de domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas**, serie 11. FPTA–INIA, Uruguay, p. 169–178, 2004.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.
- EARL, D.A.; VONHOLD, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v.4, n.2, p.359-361, 2012.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p.2611-2620, 2005.
- EXCOFFIER L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER S. ARLEQUIN: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.
- FALEIRO, F.G. **Marcadores Genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, Embrapa Cerrados, 2007.
- FERNÁNDEZ, T.; CERDÁ ZOLEZZI, P.; RISCO, E.; MARTINO, V.; LÓPEZ, P.; CLAVIN, M.; HNATYSZYN, O.; CANIGUERAL, S.; HAJOS, S.; FERRARO, G. & ALVAREZ, E. Immunomodulating properties of Argentine plants with ethnomedicinal use. *Phytomedicine*, v.9, n.6, p. 546-552, 2002.
- Fundação SOS Mata Atlântica. Cobertura da vegetação nativa da Mata Atlântica e Campos sulinos. In: Pinto, L. P. Relatório Técnico do Projeto “**Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Floresta Atlântica e Campos sulinos**”. 1.ed. Belo Horizonte: Conservation International do Brasil, 2000. p.24-79.
- Fundação SOS Mata Atlântica. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica 2012/2011**. Disponível em: < <http://www.sosma.org.br/blog/25-anos-atlas-da-mata-atlantica-mais-floresta-monitorada-e-protegida/>>. Acesso em: 27/12/2012.
- FUTUYMA, D.G. **Evolution**. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, USA, 2005.
- GALINDO LEAL, C.; CÂMARA, I.G. *Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese*. In: GALINDO LEAL, C., CÂMARA, I.G. (Org.). **Mata Atlântica: biodiversidade, ameaças e perspectivas**. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2005. 472 p.
- GARAYALDE, A.F.; POVERENE, M.; CANTAMUTTO, M.; CARRERA, A.D. Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers: an approach for conservation and breeding programmes. **Annals of Applied Biology**, n.158, p.305-317, 2011.
- 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**, n. 65, p. 343-346, 1999.

- GE, D.; DAIZHEN, Z.; YANQIU, Y.; LINGLING, Z.; BEIBEI, Z. Analysis of genetic variability and population structure of the endemic medicinal *Limonium sinense* using molecular markers. **Gene**, v.520, p.189-193, 2013.
- GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; VAN DER BERG, C. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**, n.19, p.632-639, 2005.
- GODT, M.J.W; CAPLOW, F.; HAMRICK, J.L. Allozyme diversity in the federally threatened golden paintbrush, *Castilleja levisecta* (Scrophulariaceae). **Conservation Genetics**, v.6, p.87-99, 2005.
- GOLKAR, P.; ARZANI, A.; REZAEI, A.M. Genetic Variation in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) for Seed Quality-Related Traits and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p.2664-2677, 2012.
- GÓMEZ-GÓMEZ, L.; AHRAZEM, O.; HERRANZ, J.M.; FERRANDIS, P. Genetic characterization and variation within and among populations of *Anthyllis rupestris* Coss., and endangered endemism of southern Spain. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 138-147, 2012.
- GRATIVOL, C.; LIRA-MEDEIROS, C.F. HEMERLY.; A.S.; FERREIRA, P.C.G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.4245-4256, 2011.
- HAMRICK, J.L.; GODT, M.J.W. Allozyme diversity in plant species. **Plant population genetics, breeding, and germplasm resources**. Sinauer Associates, Sunderland, p.43-63, 1990.
- HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles os population genetics**. Sunderland: Sinauer associetes, 3ªed. 542p, 1997.
- HU, Y.; WANG, L.; XIE, X.; YANG, J.; LI, Y.; ZHANG, H. Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.38, p.264-274, 2010.
- HUANG, W.; ZHAO, X.; ZHAO, X.; LI, Y.; LIAN, J.; YUN, J. Relationship between the genetic diversity of *Artemisia halodendron* and climatic factors. **Acta Oecologica**, n.55, p.97-103, 2014.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. Rio de Janeiro. 271p, 2012.
- IKUTA, A.R.Y.; BARROS, I.B.I. Influência da temperatura e da luz sobre a germinação de macela (*Achyrocline satureioides*). **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v.31, n.12, p.859-862, 1996.

- JEONG, J.H.; LEE, B.C.; YOO, K.O.; JANG, S.K.; KIM, Z.K. Influence of small-scale habitat patchiness on the genetic diversity of the Korean endemic species *Saussurea chabyoungsanica* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.43, p.14-24, 2012.
- KIANI, M.; MEMARIANI, F.; ZARGHAMI, H. Molecular analysis of species of *Tulipa* L. from Iran based on ISSR markers. **Plant Systematics and Evolution**, v.298, p.1515-1522, 2012.
- LI, M.; ZHAO, Z.; MIAO, X.J. Genetic variability of wild apricot (*Prunus armeniaca* L.) populations in the Ili Valley as revealed by ISSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.60, p.2293-2302, 2013.
- LUAN, S.; CHIANG, T.; GONG, X. High genetic diversity vs. Low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, Revealed by ISSR fingerprint. **Annals of Botany**, n.98, p.583-589, 2006.
- MAZZELLA, C.; RODRÍGUEZ, M.; VAIO, M.; GAIERO, P.; LÓPEZ-CARRO, B.; SANTINAQUE, 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, p.169-176, 2010.
- MCDERMOTT J.M.; MCDONALD, .B.A. Gene flow in plant pathosystems. **Journal Annual Review of Phytopathology**, v.31, n.1, p.353-373, 1993.
- MILACH, S.C.K. Principais Tipos de Marcadores Moleculares e suas Características. In MILACH, S. C. K, (ed.). **Marcadores Moleculares em Plantas**. Porto Alegre, p.17-28, 1998.
- MING-QIAN, W.; SHUANG-LIN, C.; MEI-XIA, W.; SHU-ZHEN, Y. An analysis of the genetic diversity and genetic structure of *Eucommia ulmoides* using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. **African Journal of Biotechnology**, vol. 10, n.84, p.19505-19513, 2011.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE -MMA. Mata Atlântica. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: 20 nov.2014.
- MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ARREDONDO, F.; BLASINA, F.; ECHEVERRI, C.; ABIN, J.A.; DAJAS, F. Estudio comparativo de compuestos polifenólicos, actividad citoprotectora y antioxidante en especies autóctonas del género *Achyrocline*. In: Estudios de domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas, serie 11. FPTA–INIA, Uruguay, p. 169–178, 2004.
- MOURA, M.; SILVA, L.; CAUJAPÉ-CASTELLS, J. Population genetics in the conservation of the Azorean shrub *Viburnum treleasei* Gand. **Plant Systematics and Evolutions**, n.299, p.1809-1817, 2013.
- MYERS, N.; MITTERMEIER, R.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.
- NGUYEN, H.T.T.; CHOI, K.S.; PARK, S. Genetic Diversity and Differentiation of a Narrowly Distributed and Endemic Species, *Aster spathulifolius* Maxim (Asteraceae), Revealed with

- Inter Simple Sequence Repeat Markers. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v.56, p.255–262, 2013.
- NYBOM, H., Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, n.13, p.1143-1155, 2004.
- OVERBECK, G.E.; MÜLLER, S.C.; FIDELIS, A.; PFADENHAUER, J.; PILLAR, V.D.P.; BLANCO, C.C.; BOLDRINI, I.L.; BOTH, R.; FORNECK, E.D. Os Campos sulinos: um bioma negligenciado. In **Campos sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade** (V.P.Pillar, S.C. Müller, Z.M.S. Castilhos & A.V.A. Jacques, Eds.). Ministério do Meio Ambiente, Brasília, p.26-43. 2009.
- OVERBECK, G.E.; MÜLLER, S.C.; PILLAR, V.D.; PFADENHAUER, J. Fine-scale post-fire dynamics in southern Brazilian subtropical grassland. **Journal of Vegetation Science**, v.16, p.655-664, 2005.
- PATRA, B.; ACHARYA, L.; MUKHERJEE A.K.; PANDA, M.K.; PANDA, P.C. Molecular characterization of ten cultivars of *Canna* lilies (*Canna* Linn.) using PCR based molecular markers (RAPDs and ISSRs). **International Journal of Integrative Biology**, v.2, p.129-137, 2008.
- PHARMAWATI, M.; YAN, G.; FINNEGAN, P.M. Molecular variation and fingerprint of *Leucadendron* cultivars (Proteaceae) by ISSR markers. **Annals of Botany**, n.95, p.1163-1170, 2005.
- PILLAR, V.D.; BOLDRINI, I.I.; HASENACK, H.; JACQUES, A.V. A.; BOTH, R.; MÜLLER, S. C.; EGGERS, L.; FIDELIS, A.; SANTOS, M.MG.; OLIVEIRA, J.M.; CERVEIRA, J.; BLANCO, C.; JONER, F.; CORDEIRO, J.L.; PINILLOS GALINDO, M. **Workshop "Estado atual e desafios para a conservação dos campos"**. Universidade Federal do Rio Grande do sul. Porto Alegre, 24 p. 2006. Disponível em <http://ecoqua.ecologia.ufrgs.br>.
- PODANI J. Introduction to the Exploration of Multivariate Data. English translation. **Backhuys Publishers**, Leide, p.407, 2000.
- PREVOST, A.; WILKINSON, M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars, **Theoretical Applied Genetics**, n.98, p.107-112, 1999.
- PRITCHARD, J.K.; WEN, X.; FALUSH, D. Documentation for structure software. Version 2.3. **University of Chicago**, Chicago, USA. 2010.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular & molecular biology letters**, v.9, p.221 - 238, 2004.
- REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter Sample Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, n.128, p.9-17, 2002.

- RETTA, D.S.; GATTUSO, M.A.; GATTUSO, S.; LIRA, P.D.L; VAN BAREN, C.; FERRARO, G.E.; BANDONI, A. Essential oil composition of *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. (Asteraceae) from different locations of Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, n. 36, p. 877–881, 2009.
- RETTA, D.S.; LÓPEZ, P.G.; GATTUSO, M.A.; GATTUSO, S.J.; FILIP, R.; FERRARO, G.E.; BANDONI, A.L. Optimization and Validation of the Quantitative Assay of Flavonoids in *Achyrocline satureioides* and *A. flaccida*. **Latin American Journal of Pharmacy**, n. 30, v.7, p. 1360-5, 2011.
- ROLDAN-RUIZ, I.; DENDAUW, J.; VANBOCKSTAELE, E.; DEPICKER, A.; DE LOOSE, M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). **Molecular Breeding**, n.6, p.125-134, 2000.
- SAFFORD H.D. Brazilian Páramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the Campos de Altitude. **Journal of Biogeography**, v.26, p.693-712, 1999.
- SHEIDAI, M.; ZANGANEH, S.; HAJI-RAMEZANALI, R.; NOUROOZI, M.; NOORMOHAMMADI, Z.; GHSEMZADEH-BARAKI, S. Genetic diversity and population structure in four *Cirsium* (Asteraceae) species. **Biologia**, v.68, n.3, p.384 - 397, 2013.
- SILVA, J.M.C.; CASTELETI C.H.M. **Estado da biodiversidade da Mata Atlântica Brasileira** (Ed. Por C. Galindo-Leal & I.G. Câmara), PP.43-60. Belo Horizonte: SOS Mata Atlântica/Conservação Internacional, 2005.
- SILVA, R.E.; MACHADO, R.; RITTER, M.R. ESPÉCIES DE “MACELA” UTILIZADAS COMO MEDICINAIS NO RIO GRANDE DO SUL. Pesquisas botânica, n. 58, p.395-406, São Leopoldo : Instituto Anchieta de Pesquisas, 2007.
- SINGH, R.; NARZARYA, D.; BHARDWAJA, J. Molecular diversity and SSR transferability studies in Vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L. Nash). **Industrial Crops and Products**, v.53, p.187- 198, 2014.
- SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v.236, p.787-92, 1987.
- TACUATIÁ, L. O.; EGGERS, L.; KALTCHUK-SANTOS, E.; SOUZA-CHIES, T. T. Population genetic structure os *Sisyrinchium micrathum* Cav.(Iridaceae) in Itapuã State Park, Southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.1, n.35, p.99-105, 2012.
- TATIKONDA, L.; WANI, S.P.; KANNAN, S.; BEERELLI, N.; SREEDEVI, T.K.; HOISINGTON, D.A.; DEVI, P.; VARSHNEY, R.K. AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant. **Plant Science**, v.176, p.505-513, 2009.
- THIMMAPPAIAH; SANTOS W.G.; SHOBHA D. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. **Scientia Horticulturae**, v.120, p.411-417, 2009.

- THRIVENI, H.N.; SUMANGALA, R.C.; SHIVAPRAKASH, K.N.; RAVIKANTH, G.; VASUDEVA, R.; RAMESH BABU, H.N. Genetic structure and diversity of *Coscinium fenestratum*: a critically endangered liana of Western Ghats, India. **Plant Systematics and Evolution**, v.300, n.3, p 403-413, 2014.
- TIWARI, S.; TIWARI, R.; SRIVASTAVA, R.; KUMARI, P.; SINGH, S.K. Molecular genetic analysis of *Eucalyptus tereticornis* by using RAPD markers. **European Journal of Experimental Biology**, v.3, n.6, p.103-110, 2013.
- TSUMURA, Y.; MATSUMOTO, A.; TANI, N.; UJINO-IHARA, T.; KADO, T.; IWATA, H.; UCHIDA, K. Genetic diversity and the genetic structure of natural populations of *Chamaecyparis obtusa*: implications for management and conservation. **Heredity**, v.99, p.161-172, 2007.
- VARSHNEY, R.K; CHABANE, K; HENDRE, P.S; AGGARWAL, R.K; GRANER, A. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation os genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. **Plant Science**, v.173, p.628-649, 2007.
- VASCONCELOS JÚNIOR, S.S. **Análise da Diversidade Genética entre Genótipos de Mamona (*Ricinus communis* - Euphorbiaceae) Através de Fingerprinting de DNA com marcadores AFLP e ISSR**. Dissertação de Mestrado da UFPE. 63p. Recife, 2011.
- 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. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.2, p.367-382, 2006.
- WANG, A.; YU, Z.; DING, Y. Genetic diversity analysis of wild close relatives of barley from Tibet and the Middle East by ISSR and SSR markers. **Comptes Rendus Biologies**, v.332, p.393-403, 2009.
- WANG, H.; FANG, X.; YE, Y.; CHENG, Y. High genetic diversity in *Taihangia rupestris* a rare cliff herb endemic to China, based on inter-simple sequence repeat markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.39, p.553-561, 2011.
- WOLF, V.C.; A. GASSMANN, B.M; CLASEN, A.G; SMITH, C.; MÜLLER, F. Genetic and chemical variation of *Tanacetum vulgare* in plants of native and invasive origin. **Biological Control**, v.61, n.3, p.240-245, 2012.
- WU, Y.G.; GUO, Q.S.; HE, J.C.; LIN, Y.F.; LUO, L.J.; LIU, G.D. Genetic diversity analysis among and within populations of *Pogostemon cablin* from China with ISSR and SRAP markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.38, p.63-72, 2010.
- YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T. POPGENE: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis. Version 1.31. **University of Alberta, Canada and Centre for International Forestry Research**, Canada, 1999.

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