

LEILA MILENA DIAZ CAMACHO

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES E CARACTERIZAÇÃO
DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DE *Chrysolaena obovata*
(ASTERACEAE)**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2016

LEILA MILENA DIAZ CAMACHO

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES
MICROSSATÉLITES E CARACTERIZAÇÃO
DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE
POPULAÇÕES DE *Chrysolaena obovata*
(ASTERACEAE)**

Tese apresentada ao Instituto de Botânica da
Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
DOUTOR em BIODIVERSIDADE VEGETAL
E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração
de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MARÍLIA GASPAR

CO-ORIENTADORA: DRA. MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALH

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Camacho, Leila Milena Díaz

C172d Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da diversidade genética de populações de *Chrysolaena obovata* (Asteraceae) / Leila Milena Díaz Camacho -- São Paulo, 2016.

128p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2016.

Bibliografia.

1. Asteraceae. 2. *Vernonia herbacea*. 3. Cerrado. I. Título.

CDU: 582.998.0

A meu pequeno tesouro Isabella
e meu amor Elkin Suárez.

À minha família, que na distância
esteve fielmente em todos os passos que me
levaram a esta conquista.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de doutorado concedida (Processos nº 141317/2012-4 e 142410/2015-2) por meio do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, que viabilizou minha vinda e estadia em São Paulo e o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES/PNADB (Processo nº 454/2010) pelo financiamento nas viagens de coleta.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo e ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica pela infra-estrutura oferecida para realização deste trabalho

À Dra. Marília Gaspar por toda a confiança, orientação, paciência, pelas oportunidades oferecidas, mas principalmente pela sua amizade, por não medir esforços para meu bem-estar e equilíbrio, você é um exemplo a seguir como profissional e como pessoa. Jamais esquecerei seu apoio e compreensão para completar este sonho com todos os obstáculos e desafios de ser mamãe durante o caminho. De coração, meu muito obrigada!

À Dra. Maria Angela Machado de Carvalho, pela co-orientação, carinho e por toda sua ajuda nesse novo mundo dos frutanos. Também pela ajuda nas coletas. E jamais esquecerei todo seu apoio e amizade para fazer de nossa vida em São Paulo mais amena e feliz.

Às Dras. Anete Pereira de Souza (Laboratório de Análise Genética e Molecular, CBMEG, UNICAMP) e Maria Imaculada Zucchi (Laboratório de Biologia Molecular, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios) pelos ensinamentos e ajuda no desenvolvimento da biblioteca genômica e genotipagem.

Ao Dr. Alessandro Alves Pereira (Departamento de Genética, ESALq) por sua ajuda e dedicação no processo de genotipagem.

À Dra. Moemy Gomes de Moraes (Universidade Federal de Goiás, UFG), ao Dr. Geraldo Aclécio Melo (Universidade Estadual de Montes Claros, UNIMONTES), à Dra. Cristiane da Silva Ferreira (Universidade Federal de Brasília, UnB), ao Dr. Jimi Nakajima (Universidade Federal de Uberlândia, UFU) e à Dra. Giselda Durigan (Instituto Florestal de São Paulo, IF) por sua ajuda e apoio logístico durante as expedições de coleta de material biológico.

Ao Dr. Jimi Nakajima (Universidade Federal de Uberlândia, UFU) e à Dra. Rosângela Simão-Bianchini (Instituto de Botânica de São Paulo) pelo auxílio na identificação das espécies de Asteraceae coletadas.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Elizabeth Ann Veasey (ESALQ), Dra. Sônia Cristina da Silva Andrade (USP), Dr. Alessandro Alves Pereira (APTA), Dra. Rita de Cássia

Leone Figueiredo-Ribeiro (IBt) e Dr. Fabio de Matos Alves (Unicamp) pelas valiosas sugestões que permitiram aperfeiçoar a tese.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa – Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, pelo apoio prestado durante as coletas de material biológico.

À Dra. Maria Tereza Grombone Guaratini do Núcleo de Pesquisa em Ecologia do Instituto de Botânica, pela amizade, conselhos e conhecimento no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, Maria Aparecida, Mary, Pedro e Ana Alice e a todos os pesquisadores por toda sua ajuda, carinho, conselhos e conhecimento, especialmente à Dra. Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro e à Dra. Luce Brandão Torres, pelo carinho, atenção e companhia que fizeram crescer minha admiração e carinho.

À Deus, por dar-me força, coragem e os melhores presentes da minha vida... Isabella e Elkin, que enchem meus dias de felicidade e me incentivam a continuar com meus sonhos. Obrigada, meus amores, pelos sonhos divididos.

Agradeço imensamente à minha mãe, irmãos, sobrinhos e família, porque sempre estiveram comigo, dividiram e compartilharam comigo esta jornada, por acreditarem em mim e por tanto amor. Saudades de vocês e da vida em família.

Aos novos amigos com os que Deus me presenteou durante este caminho: Ludmila Raggi, Pryscila Denise, Evandro Vieira, Kassinha, Fernanda Zaninete, Athos Poli, Emanuela Oliveira, Roseli Bertoni, Glaucia Rodrigues, Cynthia Murakami, Michelle, Ana Cristina Bolaños, Daiane Mignoni, Juliana Zerlin, Caio, Vanessa Oliveira, Rodrigo Cabral, sempre estarão em meu coração e agradeço grandemente pela sua amizade, pelo carinho, ensinamentos, conselhos e por fazer minha vida mais feliz durante minha estadia em São Paulo. Meu muito obrigada!

Sou grata ao Brasil e à Cidade de São Paulo, onde dois grandes sonhos tornaram-se realidade.

E a todos os demais que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

RESUMO

Chrysolaena obovata (Less.) M. Dematteis (Asteraceae) é uma espécie herbácea, perene, nativa do Cerrado brasileiro, de crescimento sazonal e que possui órgãos subterrâneos de reserva, denominados rizóforos, que acumulam altas concentrações de frutanos do tipo inulina. Plantas dessa espécie apresentam tolerância à seca, ao fogo e ao frio, relacionada ao acúmulo de frutanos, o que pode explicar sua ampla distribuição nas diferentes fitofisionomias do Cerrado. O estudo da estrutura genética e da dinâmica das populações de espécies do Cerrado é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de conservação deste bioma. O objetivo deste trabalho foi desenvolver marcadores microssatélites para estudar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *C. obovata*, assim como analisar o teor e composição dos frutanos em plantas provenientes de campos rupestres e cerrado *sensu stricto*. Foi construída uma biblioteca genômica enriquecida com microssatélites e foram testados 42 pares de iniciadores, dos quais nove mostraram-se polimórficos. Estes *loci* polimórficos foram utilizados para a determinação da diversidade e estrutura genética de 192 indivíduos de sete populações naturais de *C. obovata*. O potencial de transferibilidade desses marcadores variou de 29,4% a 94,1% em 17 espécies pertencentes a sete tribos distintas da família Asteraceae, indicando seu potencial para uso em estudos futuros de diversidade genética de espécies dessa família. Foram detectados 52 alelos, sendo que o número de alelos por *locus* variou de três a nove, com uma média de 5,78 alelos. O Conteúdo de Informação Polimórfica (*PIC*) variou de 0,091 a 0,691. A espécie apresentou moderada diversidade genética ($H = 0,46$). A heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,43 a 0,61. Foram encontrados 25 alelos raros e 13 alelos privados. O coeficiente de endogamia apresentou valores negativos em todos os *loci* estudados ($F_{IS} = -0,220$), assim como o Índice de Fixação global ($F_{IT} = -0,113$), indicando um excesso de heterozigotos e, conseqüentemente, desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram observados em alguns *loci*. As sete populações analisadas apresentaram moderada diferenciação ($F_{ST} = 0,087$; $P < 0,001$), com maior diversidade dentro das populações (96,25%; $P < 0,001$). Análise de AMOVA hierárquica, que subdivide as populações de acordo com a fitofisionomia, confirmou a maior diversidade dentro das populações (96,21%; $P < 0,01$) sendo que a variabilidade entre os grupos foi baixa e não significativa (0,09%; $P = 0,41$). A análise de SAMOVA dividiu as populações em cinco grupos, porém a porcentagem de variação foi maior dentro das populações (95,78%; $P < 0,05$) e foi negativa (-0,80%) entre as populações dentro de cada grupo. Não foi detectado efeito gargalo nas populações estudadas. O fluxo

gênico indireto estimado foi de 2,62 migrantes por geração. A análise de coalescência mostrou um padrão complexo migratório entre as populações, porém identificou que a população de Uberlândia é a única que doa migrantes a todas as populações. A árvore de *Neighbor-joining* (NJ) agrupou as populações em dois *clusters*, mas sem diferenciação significativa entre eles. O teste de Mantel mostrou uma baixa, porém significativa, correlação entre as distâncias genéticas e geográficas das populações ($R^2 = 0,2312$; $P < 0,05$), indicando que existe fluxo gênico e baixo isolamento por distância. Análises Bayesianas identificaram três agrupamentos ($K = 3$), confirmando a moderada diferenciação das populações. Esta baixa variabilidade entre populações se reflete também no metabolismo de frutanos nas fases vegetativa e de floração, que se mostrou bastante conservado entre as quatro populações avaliadas. O conjunto dos resultados obtidos indica a baixa diferenciação genética das populações de *C. obovata*, a qual pode ser explicada por sua biologia reprodutiva (sementes dispersas pelo vento) e sua história de vida (planta perene com ampla distribuição no Bioma Cerrado).

Palavras-chave: *Vernonia herbacea*, Microssátelites, Asteraceae, Cerrado, campos rupestres, Transferabilidade.

ABSTRACT

Chrysolaena obovata (Less.) M. Dematteis (Asteraceae) is an herbaceous, perennial species, native to the Brazilian Cerrado, which presents seasonal growth and underground organs, named rhizophores that accumulate high concentrations of inulin-type fructans. The tolerance of this species to drought, heat and cold, due to fructan accumulation, may explain its wide distribution in the different Cerrado physiognomies. The study of the genetic structure and population dynamics of Cerrado species is crucial to the development of conservation programs for biome. The aim of this study was to develop microsatellite markers to access the genetic diversity and structure of natural populations of *C. obovata* and to analyze fructan content and composition in plants from campos rupestres and cerrado *sensu stricto*. A genomic library enriched with microsatellites was built and forty-two primer pairs were tested, nine of which were shown to be polymorphic. These polymorphic loci were used to determine the genetic diversity and structure of 192 individuals from seven natural populations of *C. obovata*. The cross-amplification rate of these markers ranged from 29.4% to 94.1% in 17 species belonging to seven different tribes of Asteraceae, indicating their potential to be used in future studies of structure and genetic diversity of species from this family. Fifty-two alleles were detected, and the number of alleles per locus ranged from three to nine, with an average of 5.78. The Polymorphic Information Content (*PIC*) ranged from 0.091 to 0.691. The species exhibited moderate genetic diversity ($H = 0.46$). The observed heterozygosity ranged from 0.43 to 0.61. Twenty five rare alleles and 13 private alleles were found. The inbreeding coefficient was negative in all loci ($F_{IS} = -0.220$), as well as the overall fixation index ($F_{IT} = -0.113$), indicating an excess of heterozygotes, and deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed for some loci. The seven analyzed populations showed a moderate differentiation ($F_{ST} = 0.087$; $P < 0.001$), with higher level of diversity within populations (96.25%, $P < 0.001$). The hierarchical AMOVA analysis that subdivides the populations according to physiognomy confirmed the greater diversity within populations (96.21%, $P < 0.01$) and the low and non-significant variability among groups (0.09%; $P = 0.41$). The SAMOVA analysis divided the populations into five groups, but the percentage of variation was greatest within populations (95.78%; $P < 0.05$) and negative (-0.80%) among populations within each group. A bottleneck effect was not detected in the populations studied. The gene flow was estimated to be 2.62 migrants per generation. The coalescence analysis showed a complex migratory pattern among populations, showing that the population of Uberlândia is the only that gives migrants to all populations. The Neighbor-joining tree

(NJ) grouped the populations into two clusters, but with no significant differences. The Mantel test showed a low but significant correlation among populations genetic and geographic distances ($R^2 = 0.2312$, $P < 0.05$), indicating the occurrence of gene flow and weak isolation by distance. Moreover, the results of the Bayesian analysis identified three clustres ($K = 3$), confirming a moderate differentiation of populations. The low population variability is also present in fructan metabolism at the vegetative and flowering stages, which proved to be quite conserved among the four populations studied. The overall results obtained indicate the low genetic differentiation of *C. obovata* populations which can be explained by the reproductive biology (anemocoric dispersion of seeds) and life history of this species (perennial plant widely distributed in the Cerrado).

Keywords: *Vernonia herbacea*, microsatellites, Asteraceae, Cerrado, *campos rupestres*, Cross-amplification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da vegetação do Brasil e uso da terra no Bioma do Cerrado	5
Figura 2. <i>Chrysolaena obovata</i> (Less.) Dematt.	7
Figura 3. Distribuição de quatro espécies de Asteraceae no Bioma Cerrado	8
Figura 4. Marcador molecular Microssatélite ou SSR	16
Figura 5. Mapa das áreas de coleta de sete populações de <i>Chrysolaena obovata</i>	27
Figura 6. Principais etapas envolvidas na construção da biblioteca enriquecida em microssatélites	35
Figura 7. Metodologia para a inclusão da fluorescência dos iniciadores	38
Figura 8. Frequências dos diferentes motivos de repetições nas regiões microssatélites	46
Figura 9. Número de <i>loci</i> amplificados em cada uma das sete tribos analisadas	50
Figura 10. Representação gráfica dos índices de Fixação (F_{ST}) entre pares de populações de <i>Chrysolaena obovata</i> de ocorrência em áreas de cerrado <i>sensu stricto</i> e campos rupestres	56
Figura 11. Representação gráfica do número efetivo de migrantes (N_{em}) por geração entre sete populações de <i>Chrysolaena obovata</i>	59
Figura 12. Correlação entre distância genética de Nei (1972) e distância geográfica (em quilômetros) das sete populações de <i>Chrysolaena obovata</i>	60
Figura 13. Árvore <i>Neighbor-joining</i> (NJ) construída com base nas distâncias genéticas de Nei (1972) das sete populações de <i>Chrysolaena obovata</i>	61
Figura 14. Análises de coordenadas principais (PCoA) para os indivíduos de <i>Chrysolaena obovata</i> de sete populações, obtida a partir da matriz de distancia genética	62
Figura 15. Representação gráfica de ΔK obtidos a partir de 10 simulações independentes para cada número de agrupamentos possíveis (K)	65
Figura 16. Representação gráfica da estrutura genética dos 192 indivíduos de <i>Chrysolaena obovata</i> determinada por análise Bayesiana	66
Figura 17. Teor de frutose total dos segmentos proximais e distais dos rizóforos de plantas de <i>Chrysolaena obovata</i> de quatro populações do Cerrado	68
Figura 18. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD dos segmentos distais de rizóforos de <i>Chrysolaena obovata</i> em área de campos rupestres na Reserva Biológica e Estação Experimental Serra Dourada, SD/GO	70
Figura 19. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD dos segmentos proximais de rizóforos de <i>Chrysolaena obovata</i> em área de campos rupestres na Reserva Biológica e Estação Experimental Serra Dourada, SD/GO	70

Figura 20. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD dos segmentos distais de rizóforos de <i>Chrysolaena obovata</i> em área de campos rupestres na Reserva Biológica e Estação Experimental Serra dos Pireneus, SP/GO	71
Figura 21. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD dos segmentos proximais de rizóforos de <i>Chrysolaena obovata</i> em área de campos rupestres na Reserva Biológica e Estação Experimental Serra dos Pireneus, SP/GO	71
Figura 22. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD dos segmentos distais de rizóforos de <i>Chrysolaena obovata</i> em área de campos rupestres na Campo Experimental Fazenda Sucupira, BRA/DF	72
Figura 23. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD dos segmentos proximais de rizóforos de <i>Chrysolaena obovata</i> em área de campos rupestres na Campo Experimental Fazenda Sucupira, BRA/DF	72
Figura 24. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD dos segmentos distais de rizóforos de <i>Chrysolaena obovata</i> em área de cerrado <i>sensu stricto</i> , na Reserva Ecológica do Panga, UB/MG	73
Figura 25. Perfil cromatográfico por HPAEC/PAD dos segmentos proximais de rizóforos de <i>Chrysolaena obovata</i> em área de <i>sensu stricto</i> , na Reserva Ecológica do Panga, UB/MG	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização geográfica das populações estudadas	26
Tabela 2. Localização geográfica dos indivíduos das 17 espécies da família Asteraceae amostrados para o estudo de transferabilidade	29
Tabela 3. Frequência e tipo de motivos repetitivos encontrados nas regiões microsatélites	45
Tabela 4. Caracterização das sequências microsatélites de <i>Chrysolaena obovata</i>	47
Tabela 5. Caracterização de nove marcadores microsatélites polimórficos de <i>Chrysolaena obovata</i> , analisados em 24 indivíduos de cinco populações	49
Tabela 6. Transferabilidade de iniciadores microsatélites em outras espécies de Asteraceae	51
Tabela 7. Índices de Diversidade genética para sete populações de <i>Chrysolaena obovata</i>	53
Tabela 8. Estatística F calculada para cada <i>locus</i> individualmente e para todos os <i>loci</i> em conjunto (Total)	54
Tabela 9. Cálculo do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg em sete populações de <i>Chrysolaena obovata</i>	55
Tabela 10. Frequências esperadas de alelos nulos em sete populações de <i>Chrysolaena obovata</i>	55
Tabela 11. Matriz de distâncias genéticas de Nei (1972) e índices de Fixação (F_{ST}) baseadas nos nove <i>loci</i> microsatélites entre as sete populações de <i>Chrysolaena obovata</i>	57
Tabela 12. Matriz de fluxo gênico aparente (N_m) baseada nos nove <i>loci</i> microsatélites e distância geográfica em quilômetros entre as sete populações de <i>Chrysolaena obovata</i>	57
Tabela 13. Número efetivo de migrantes N_{em} por geração entre as sete populações de <i>C. obovata</i> resultados obtidos com o programa <i>Migrate-n</i>	58

Tabela 14. Análise molecular de variância (AMOVA) para sete populações de <i>Chrysolaena obovata</i>	62
Tabela 15. Análise molecular de variância (AMOVA). De acordo com a fitofisionomia cerrado <i>sensu stricto</i> e campos rupestres	63
Tabela 16. Análises espacial de variância molecular (SAMOVA) para sete populações de <i>Chrysolaena obovata</i>	64
Tabela 17. Testes do equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de <i>Chrysolaena obovata</i> , utilizando os modelos de Passos de Mutação (S.M.M) e de Duas Fases (T.P.M)	64

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O CERRADO.....	1
1.2. <i>Chrysolaena obovata</i> (LESS.) DEMATT., UMA ASTERACEAE DE AMPLA OCORRÊNCIA NO CERRADO	6
1.3. GENÉTICA DE POPULAÇÕES.....	10
1.3.1. Diversidade Genética	10
1.3.2. Estrutura genética	12
1.4. MARCADORES MOLECULARES	15
1.4.1. Marcadores Microsatélites	16
1.5. JUSTIFICATIVA.....	20
2. OBJETIVOS	22
2.1. GERAL.....	22
2.2. ESPECÍFICOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. ÁREA DE ESTUDO.....	23
3.1.1. Cerrado sensu stricto	23
3.1.2. Campos rupestres	24
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO	27
3.2.1. Análises moleculares.....	27
3.2.2. Análises bioquímicas de frutanos.....	28
3.3. ANÁLISES MOLECULARES.....	30
3.3.1. Extração do DNA	30
3.3.2. Construção da biblioteca genômica enriquecida com microsatélites	31
3.3.3. Sequenciamento de clones da biblioteca genômica	34
3.3.4. Edição de sequências, identificação de microsatélites e desenho dos iniciadores	35
3.3.5. Amplificação do DNA	36
3.3.6. Genotipagem	37
3.3.7. Análises de dados	38
3.3.7.1. Caracterização da diversidade genética das populações	38
3.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	43
3.4.1. Análise de carboidratos solúveis	43
3.4.2. Análises de dados	44

4. RESULTADOS.....	45
4.1. CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DOS MARCADORES	45
4.2. TRANSFERABILIDADE DOS INICIADORES MICROSSATÉLITES DE <i>Chrysolaena obovata</i>	49
4.3. DIVERSIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES	52
4.4. DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES	53
4.5. ESTIMATIVA BAYESIANA DA ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA POPULACIONAL	65
4.6. ANÁLISE DO TEOR DE FRUTANOS EM RIZÓFOROS DE <i>Chrysolaena</i> <i>obovata</i>	66
5. DISCUSSÃO.....	74
5.1. DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES para <i>Chrysolaena obovata</i>	74
5.2. TRANSFERABILIDADE DE INICIADORES MICROSSATÉLITES DE <i>Chrysolaena obovata</i> EM OUTRAS ESPÉCIES DE ASTERACEAE.....	75
5.3. DIVERSIDADE GENÉTICA.....	77
5.4. ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL	80
5.5. TEOR DE FRUTANOS NOS RIZÓFOROS.....	84
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXO A.....	cix
ANEXO B.....	cxii

1. INTRODUÇÃO

1.1. O CERRADO

O Cerrado é o domínio aberto mais representativo da América do Sul, abrangendo uma área nuclear de aproximadamente 1,5 milhões de km² (Coutinho 2000), considerada a última fronteira agrícola do planeta (Borlaug 2002). Esse domínio ocorre desde o Amapá e Roraima, até o Paraná, em sentido latitudinal, e em sentido longitudinal, ocorre desde Pernambuco, Alagoas, Sergipe, até o Pará e o Amazonas, aqui como encaves dentro da floresta Amazônica (Figura 1A). Embora presente em grande parte dos estados do país, sua área nuclear está concentrada, principalmente, na região do Planalto Central (Coutinho 2000).

O clima predominante no Domínio do Cerrado é o tropical sazonal, de inverno seco e verão úmido, com temperaturas médias anuais em torno de 22-23°C. A ocorrência de geadas não é incomum. A precipitação média anual varia entre 1.200 e 1.800 mm, concentrando-se de outubro a março. Na estação seca, entre maio a setembro, os níveis pluviométricos são reduzidos, podendo chegar a zero, o que demonstra uma sazonalidade marcante. A radiação solar no Domínio do Cerrado é geralmente bastante intensa, podendo reduzir-se devido à alta nebulosidade nas primeiras horas da manhã, no início da estação seca, formando grande quantidade de orvalho sobre as plantas e solo (Coutinho 2000). O relevo é em geral bastante plano ou suavemente ondulado. Cerca de 50% de sua área situa-se em altitudes entre 300 e 600 m; apenas 5,5% vão além de 900 m, e acima de 1100 m, particularmente em terrenos quartzíticos, se encontram os campos rupestres (Coutinho 2000).

O Domínio do Cerrado compõe-se de um complexo de biomas, distribuídos em mosaico, apresentando um gradiente de formações ecologicamente relacionadas (Coutinho 2006). Embora o Bioma Cerrado seja o mais frequente no Domínio do Cerrado, não é o único que o compõe (Coutinho 2000), sendo encontrados também Veredas, Matas Galeria, Matas Mesófilas de Interflúvio, representantes de outros tipos de Bioma, distintos do Cerrado, que ocorrem em meio àquele mesmo espaço. Não se deve, pois, confundir o Domínio com o Bioma. No Domínio do Cerrado predomina o Bioma Cerrado. A ambiguidade no uso dos conceitos de Domínio e Bioma deve ser evitada. Assim, usaremos Domínio do Cerrado quando for o caso, e Bioma Cerrado ou simplesmente Cerrado quando quisermos nos referir especificamente a este tipo de ecossistema terrestre, de grande dimensão, com características ecológicas bem mais uniformes e marcantes (Coutinho 2000).

O Cerrado se distribui como área contínua pelos estados de Goiás, Tocantins e o Distrito Federal, parte da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo. Caracteriza-se como uma formação do tipo savana tropical, com sazonalidade e presença em diferentes proporções de formações herbáceas, arbustivas e arbóreas

(Ribeiro & Walter 1998). Essa variedade de ambientes permitiu a diversificação das espécies de animais e plantas (Machado *et al.* 2004), abrigando parte significativa da diversidade biológica do Brasil, sendo considerado um dos *Hotspots* de biodiversidade do planeta (Myers *et al.* 2000).

O Cerrado é composto por formações florestais, com formação de dossel contínuo ou descontínuo e predomínio de árvores; savânicas, com áreas formadas por árvores e arbustos espalhados sobre um estrato de gramíneas; e campestres, área com predomínio de espécies herbáceas e algumas arbustivas, mas sem árvores na paisagem (Ribeiro & Walter 1998).

O clima do Bioma Cerrado é estacional, caracterizado por um período chuvoso de outubro a março, e um período seco, de abril a setembro. A precipitação média anual é de 1.500 mm e a temperatura média varia de 22 a 27°C (Klink & Machado 2005). A vegetação do Cerrado apresenta crescimento sazonal, sendo que na época chuvosa os estratos subarbustivo e herbáceo são exuberantes e caracterizados pelo rápido crescimento (Ribeiro & Walter 1998). O número de espécies arbóreas e arbustivas é superior a 800, sendo que quase 40% destas são endêmicas (Klink & Machado 2005). O solo é o principal fator abiótico que condiciona e influencia a densidade arbórea, sendo que variações nas características edáficas, como o alto teor de alumínio, escassez de íons, baixa profundidade e encharcamento estacional, são determinantes para as diferenças fisionômicas, florísticas e fitossociológicas (Ribeiro & Walter 1998, Haridasan 2007).

Segundo Coutinho (2000), a vegetação diversificada do Cerrado apresenta desde formas campestres bem abertas, como os campos limpos de cerrado, campos sujos, cerrado s.s., até formas mais densas como os cerradões com um número maior de espécies arbóreas do que o cerrado s.s. Dentre as fitofisionomias savânicas existentes no Cerrado, o cerrado *sensu stricto* (s.s.) é a mais comum e extensa, ocupando cerca do 70% do Domínio (Felfili & da Silva 1993, Coutinho 2000). Possui uma comunidade vegetal rica que ocorre geralmente em faixas extensas e contínuas, onde poucas espécies constituem as maiores populações e a distribuição de indivíduos por espécies é desigual ao longo do bioma (Felfili *et al.* 2005). Caracteriza-se principalmente por um componente herbáceo que representa cerca de 77% de sua vegetação (Mantovani & Martins 1988) com predominância de gramíneas, e presença de árvores de pequeno porte, com troncos e ramos tortuosos com características típicas de proteção contra o fogo e a herbivoria, como troncos cobertos por súber espesso, folhas rígidas e coriáceas (Felfili & Silva Júnior 2005).

Uma das formações fisionômicas do Bioma Cerrado são os campos rupestres, também chamados de cerrados rupestres ou campos de altitude. Estas constituem um tipo fitofisionômico predominantemente herbáceo-arbustivo, com a presença eventual de arvoretas pouco desenvolvidas de até dois metros de altura, associadas a afloramentos rochosos ou solos litólicos predominantemente quartzíticos (Ribeiro & Walter 1998). Esse tipo de formação é encontrado nos

estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Bahia e Goiás, em altitudes superiores a 900 metros nas matrizes de savana (Neves & Conceição 2010), em áreas de ventos constantes e predomínio de dias quentes e noites frias. Podem ainda ocorrer em trechos contínuos, mas geralmente aparecem em mosaicos, incluído em outros tipos de vegetação (Ribeiro & Walter 1998).

A vegetação típica dos campos rupestres está relacionada às características como isolamento entre as serras, habitats diversificados, grande quantidade de rochas expostas, longos períodos de déficit hídrico, curtos períodos de excesso de água, solos ralos com baixa capacidade de armazenamento de água, alto acúmulo de matéria orgânica em locais pontuais e grande amplitude térmica diária com elevada exposição solar (Neves & Conceição 2010), podendo sua composição florística variar em poucos metros de distância (Ribeiro & Walter 1998).

A vegetação é constituída basicamente por um estrato herbáceo mais ou menos contínuo, entremeado por pequenos arbustos perenifólios e esclerofilos (Giulietti *et al.* 2000). Este tipo de vegetação ocorre geralmente em solos ácidos, pobres em nutrientes ou nas frestas dos afloramentos rochosos (Ribeiro & Walter 1998), com um alto número de espécies endêmicas e em perigo de extinção (Neves & Conceição 2010).

As famílias mais frequentes nos campos rupestres são Asteraceae, Bromeliaceae, Cactaceae, Cyperaceae, Eriocaulaceae, Gentianaceae, Iridaceae, Labiatae, Leguminosae, Myrtaceae, Orchidaceae, Poaceae e Velloziaceae (Ribeiro & Walter 1998).

Muitas espécies do Cerrado apresentam sistemas subterrâneos espessados, que permitem o armazenamento de fotoassimilados (Coutinho 2000), importante adaptação para a sobrevivência de espécies herbáceas e subarbustivas em períodos desfavoráveis, como queimadas ou secas prolongadas (Munhoz & Felfili 2007, Medeiros & Miranda 2008). Dentre estas espécies com sistemas subterrâneos espessados há um grande número de espécies herbáceas, especialmente da família Asteraceae, que acumulam frutanos como composto de reserva, um dos carboidratos de maior ocorrência em plantas, superado apenas pelo amido e pela sacarose (Carvalho *et al.* 2007).

Várias espécies do Cerrado não florescem todos os anos, sendo que outras o fazem mais de uma vez por ano. Segundo Mantovani & Martins (1988), se a espécie se reproduz por propagação vegetativa frequente, a ausência de floração por um ou mais anos poderia representar uma estratégia adaptativa, visando o acúmulo das reservas e a defesa contra herbívoros e parasitas que dependem de sincronia na floração. O florescimento de algumas espécies herbáceas após as queimadas mostra-se uma resposta adaptativa ao fogo, que permite maior sincronia na floração (Coutinho 1980) e maior eficiência na dispersão dos diásporos (Coutinho 1977).

O desmatamento do Cerrado é um dos principais fatores da perda de diversidade deste ecossistema, fazendo com que cerca da metade dos 2 milhões de km² originais do Cerrado tenham

sido transformados em pastagens plantadas (26%), agricultura (10%) e outros tipos de uso (Machado *et al.* 2004, Klink & Machado 2005, Sano *et al.* 2007), com uma taxa de desmatamento de 3 milhões de hectares/ano (Machado *et al.* 2004) (Figura 1). A transformação do Cerrado trouxe danos ambientais como fragmentação e perda de habitats, extinção de espécies, invasão por espécies exóticas, erosão, poluição das fontes hídricas e aquíferos, alterações nos regimes de fogo, desequilíbrios no ciclo do carbono e mudanças climáticas locais ou regionais (Machado *et al.* 2004, Klink & Machado 2005).

A fragmentação do Cerrado pode levar à diminuição no tamanho das populações e aumentar seu isolamento, podendo comprometer a sobrevivência a longo prazo de muitas espécies (Ellstrand & Elam 1993) em função da redução da variabilidade genética pelo efeito fundador ou efeito gargalo. Além disso, o isolamento pode aumentar a endogamia (levando à fixação de alelos deletérios) pelas alterações do comportamento de polinizadores e dispersores de sementes, reduzindo o fluxo gênico e a conectividade populacional das espécies (Young *et al.* 1996). Isto pode causar o rompimento do equilíbrio migração-deriva que promove e aumenta a divergência genética entre as populações, colocando em risco de extinção populações presentes neste habitat pela redução na capacidade de suportar as mudanças ambientais (Young *et al.* 1996). No entanto, alguns estudos com espécies subtropicais e temperadas sugerem que nem todos os eventos de alteração e fragmentação do habitat levam à perda detectável de diversidade genética, sendo essa relacionada à intensidade da fragmentação. Em alguns casos, a fragmentação pode aumentar o fluxo gênico entre populações remanescentes e alterar a estrutura genética local (Young *et al.* 1996; e suas referências).

Levando-se em conta a grande perda de biodiversidade gerada pela degradação desse bioma e o escasso conhecimento de sua flora, há necessidade de se ampliar os estudos com espécies nativas, de forma a gerar estratégias de conservação dos remanescentes de Cerrado.

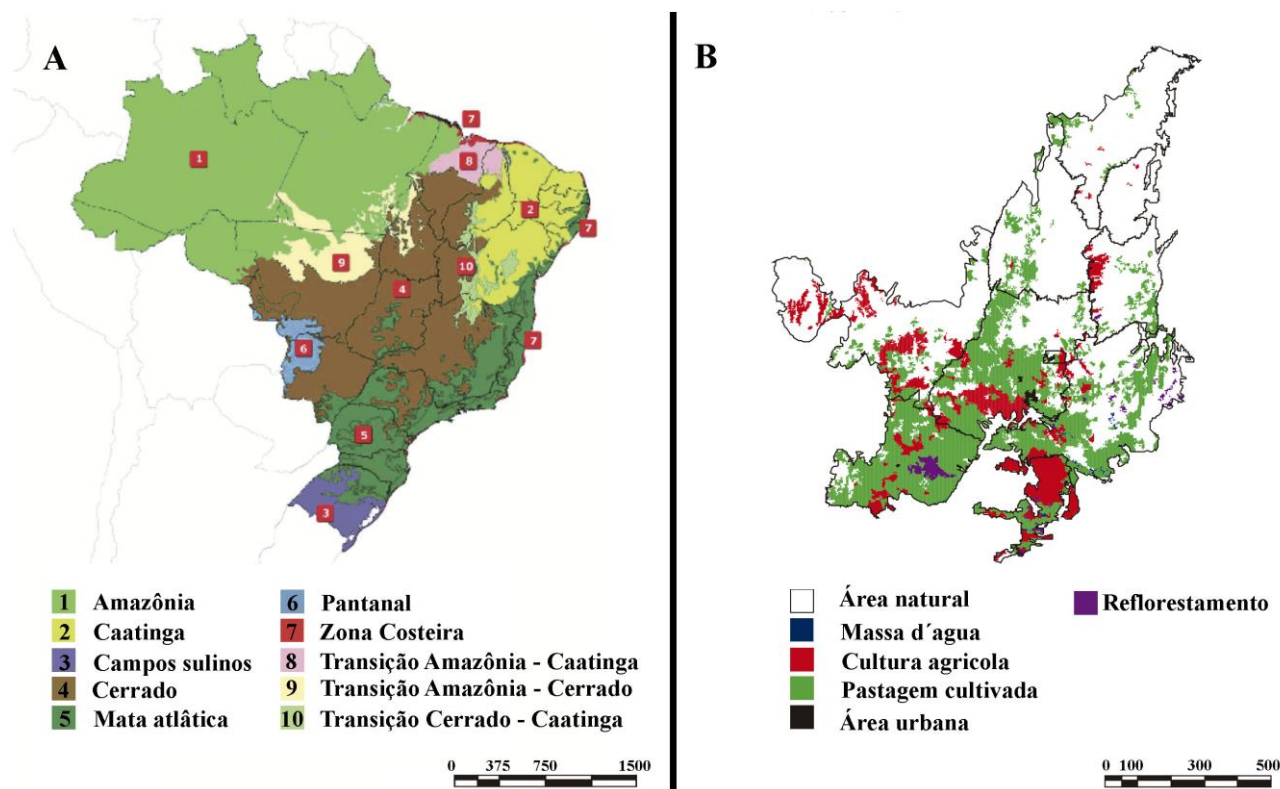


Figura 1. Mapa da vegetação do Brasil e uso da terra no Bioma do Cerrado. **(A)** Localização dos domínios brasileiros incluindo o Bioma do Cerrado (adaptado de Moraes *et al.* 2016), mostrando a área central do Domínio do Cerrado e seus encraves em outros domínios e as áreas de transição; **(B)** Distribuição espacial das classes de uso da terra no Bioma do Cerrado (ano base 2002, adaptado de Sano *et al.* 2008).

Embora nas últimas décadas tenha havido um interesse crescente no estudo do Cerrado brasileiro, devido à sua biodiversidade única e altamente ameaçada pelo desenvolvimento agrícola, o conhecimento da flora deste bioma é ainda bastante limitado, sendo que a grande maioria dos trabalhos tem dado enfoque às espécies arbóreas (Ratter *et al.* 1996, Almeida *et al.* 2005). Especula-se que a riqueza de espécies no cerrado estaria relacionada, principalmente, à grande especiação ocorrida durante os períodos glaciais e interglaciais do Quaternário, somado à ampla variedade de ambientes (Mendonça *et al.* 1998, Oliveira-Filho & Ratter 2002).

O número total de espécies do Cerrado ainda é muito impreciso, mas um levantamento feito por Mendonça *et al.* (2008) listou 12.356 espécies na flora vascular nativa. Appezzato-da-Glória *et al.* (2008) ressaltaram a importância do estrato herbáceo-subarbustivo desse bioma e sua maior sensibilidade aos distúrbios antrópicos, podendo ser utilizado como parâmetro para avaliar o nível de distúrbios nesse ecossistema. A família Asteraceae possui um importante papel na riqueza de espécies do estrato herbáceo-subarbustivo do cerrado, com muitas espécies endêmicas já descritas

(Almeida *et al.* 2005, Martins & Oliveira 2007). No Brasil foram descritos 278 gêneros e 2064 espécies (Nakajima *et al.* 2016), sendo que essa família destaca-se por sua importância econômica.

A família Asteraceae tem uma grande diversidade de estratégias reprodutivas, sendo a auto-incompatibilidade a mais comum (Richards 1997). Também é comum a ocorrência de apomixia na família (Werpachowski *et al.* 2004), sendo que 75% das espécies apomíticas estão nas famílias Poaceae, Asteraceae e Rosaceae, e esta é principalmente descrita em espécies herbáceas perenes, pioneiras, de clima temperado e com ampla distribuição (Richards 1997). Esta característica é frequentemente associada à poliploidia e origem de espécies híbridas (Noyes 2007), porém não foi descrita a ocorrência de apomixia nas tribos Cardueae, Senecioneae e Vernonieae (Werpachowski *et al.* 2004, Noyes 2007). A reprodução vegetativa também é bastante comum em Asteraceae do Cerrado, devido à presença de sistemas subterrâneos espessados com capacidade gemífera (Hayashi & Appezzato-da-Glória 2005, Vilhalva & Appezzato-da-Glória 2006, Appezzato-da-Glória *et al.* 2008, Joaquim *et al.* 2014).

1.2. CHRYSOLAENA OBOVATA (LESS.) DEMATT., UMA ASTERACEAE DE AMPLA OCORRÊNCIA NO CERRADO

Chrysolaena obovata (Less.) Dematt., sinônimo *Vernonia herbacea*, é uma Asteraceae amplamente distribuída em áreas de cerrado *sensu stricto* e em campos rupestres, medindo de 30-80 cm de altura, perene, com órgãos subterrâneos de reserva espessados, conhecidos como rizóforos, dos quais nascem 2 ou 3 ramos eretos. Apresenta talo simples com pubescência amarela, folhas ovaladas ou ovado-lanceoladas alternas e sésseis (Figura 2) (Dematteis 2009).

Chrysolaena obovata é uma espécie comum e amplamente distribuída no sul do Peru, no norte e leste da Bolívia e toda a região central do Brasil, tendo sua ocorrência sido descrita nos estados do Amazonas, Rondônia, Tocantins, Bahia, Piauí, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Rivera 2006). Ocorre em áreas do Domínio do Cerrado, em diversos tipos de vegetação como campos de altitude, campo limpo, campos rupestres e cerrado *lato sensu* (Figura 3) (Dematteis 2015).

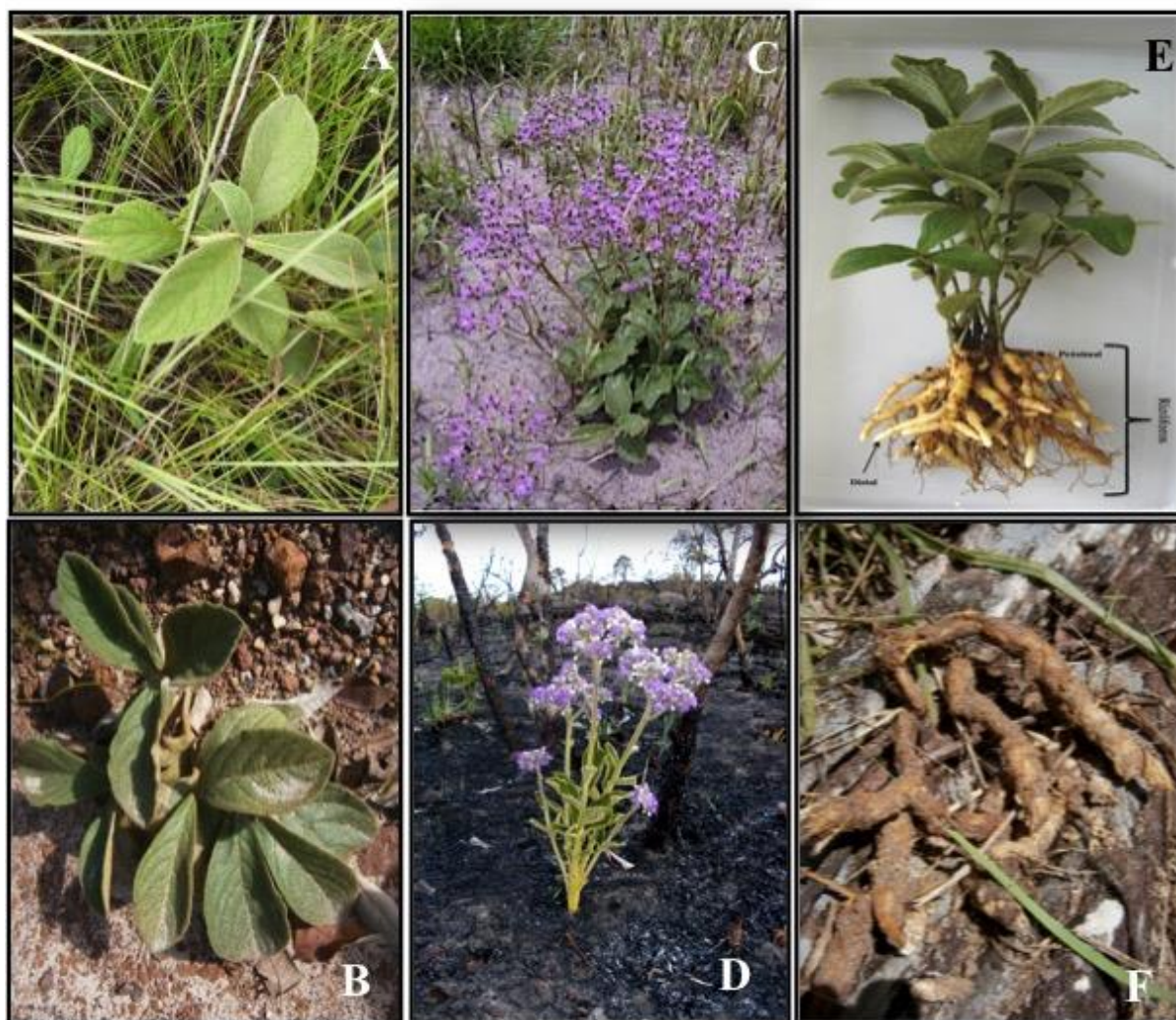


Figura 2. *Chrysolaena obovata* (Less.) Dematt. Indivíduos em fase vegetativa: cerrado *sensu stricto* – Montes Claros **(A)** e campos rupestres na Serra dos Pirineus **(B)**; Indivíduos em fase de floração: cerrado *sensu stricto* – Mogi-Guaçu **(C)** e campos rupestres – Serra dos Pirineus **(D)**; Planta inteira com detalhe dos rizóforos **(E)** e rizóforos coletados em campos rupestres – Serra dos Pirineus **(F)**. Fotos: Maria Angela Machado de Carvalho.

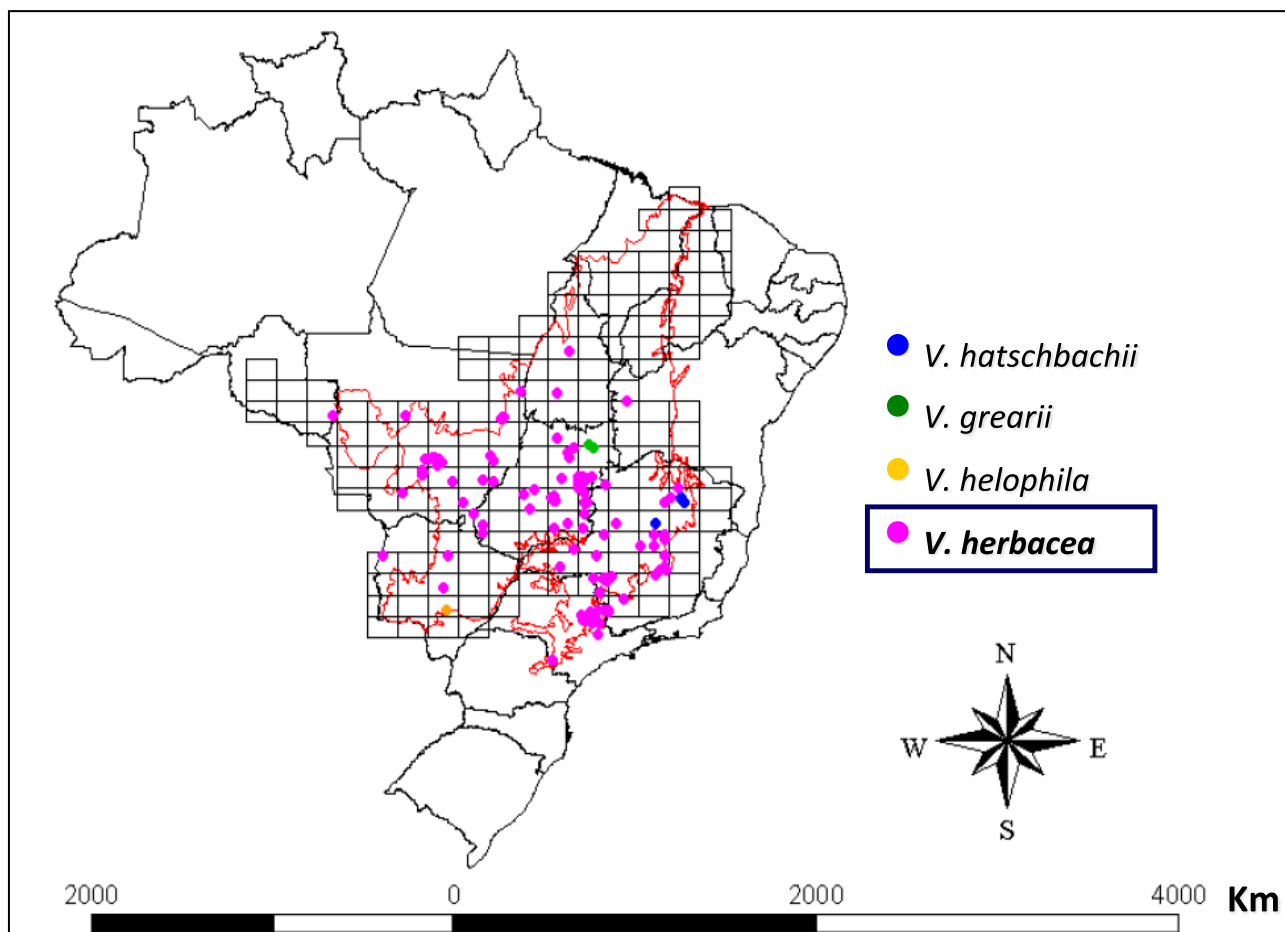


Figura 3. Distribuição de quatro espécies de Asteraceae no Bioma Cerrado: *Lessingianthus hatschbachii* H.Rob. (ex. *Vernonia hatschbachii* (H.Rob.) D.J.N.Hind), *Lessingianthus grearii* (H.Rob.) H.Rob. (ex. *Vernonia grearii* H.Rob), *Lepidaploa helophila* (Mart. ex DC.) H.Rob. (ex. *Vernonia helophila* Mart) e *Chrysolaena obovata* (Less.) Dematt. (ex. *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby) (Rivera 2006).

Com relação à reprodução, *C. obovata* apresenta inflorescências de 3 a 7 cm de comprimento em capítulos solitários, sésseis, contendo de 10 a 20 flores violetas (Dematteis 2009) com grãos de pólen triporados com alta fertilidade (97,46%; Via do Pico & Dematteis 2012). Seus frutos são do tipo cipsela com pápus branco, dispersos pelo vento (Martins & Oliveira 2007), dos quais 24% apresentam sementes completamente desenvolvidas e só 15% apresentam embrião ativo, com uma baixa taxa de germinação (11%; Sassaki *et al.* 1999), a qual pode diminuir para 2,3% pelas condições de coleta, armazenamento, presença de fungos e processamento das sementes durante o estabelecimento de cultura *in vitro* (Trevisan *et al.* 2014). Além disso, apresenta reprodução vegetativa por meio da brotação de gemas existentes nos rizóforos (Carvalho & Dietrich 1993). *C. obovata* possui número cromossômico $2n = 40$, sendo que a presença de multivalentes na meiose sugere que esta é uma espécie autopoliploide, com um número base $x = 10$, podendo-se encontrar populações diplóides e tetraplóides (Via do Pico & Dematteis 2012).

Os órgãos subterrâneos de *C. obovata* armazenam até 80% da sua massa seca em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich 1993). Os frutanos são polímeros de frutose derivados da sacarose e consistem em séries homólogas de oligo e polissacarídeos não redutores, cada um contendo um resíduo a mais de frutose que o membro anterior da série (Figueiredo-Ribeiro 1993). Além de atuarem como compostos de reserva, que são em geral acumulados quando a capacidade fotossintética das folhas excede a demanda para o crescimento dos órgãos aéreos e manutenção da planta (Carvalho *et al.* 2007), os frutanos conferem à planta maior resistência em condições ambientais adversas, como seca e frio. Isso se deve à sua solubilidade elevada e localização vacuolar, que permitem sua rápida mobilização, atuando no ajuste osmótico da célula (Pollock *et al.* 1988). Além de sua importância ecológica, os frutanos do tipo inulina são de grande interesse econômico, devido às suas propriedades benéficas à saúde humana como fibra solúvel utilizada na indústria alimentar (Ritsema & Smeekens 2003).

Chrysolaena obovata apresenta crescimento sazonal, com ciclo fenológico caracterizado por um período de dormência das gemas subterrâneas durante o inverno, logo após a senescência e abscisão da parte aérea; nesta fase, o conteúdo de frutanos nos rizóforos aumenta, possivelmente, devido à translocação de carboidratos da parte aérea (Carvalho & Dietrich 1993). Na primavera ocorre brotação, seguida da floração, período em que há diminuição no conteúdo de frutanos, devido a sua mobilização para suprir a demanda de carbono para o crescimento dos novos ramos aéreos. Após a floração, o crescimento continuado das plantas durante o verão permite o total restabelecimento da sua parte aérea; nesta fase, verifica-se uma elevação nos teores de frutanos, indicando que este período é caracterizado predominantemente pela síntese de frutanos (Carvalho & Dietrich 1993). Essas alterações são acompanhadas por variações nas atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo de frutanos, conforme demonstrado por Portes & Carvalho (2006). As condições ambientais e os níveis endógenos de hormônios, como auxina e ácido abscísico, regulam o metabolismo de frutanos nas diferentes fases fenológicas, sinalizando para o acúmulo de energia, mobilização de reservas e acúmulo de oligossacarídeos para ajuste osmótico, conforme recentemente demonstrado por Rigui *et al.* (2015).

Chrysolaena obovata tem sido utilizada como espécie modelo para o estudo do metabolismo de frutanos, sobre os efeitos do estresse hídrico (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004, Garcia *et al.* 2011, Garcia *et al.* 2015), do frio (Dias-Tagliacozzo *et al.* 1999, Asega *et al.* 2008, Portes *et al.* 2008, Asega *et al.* 2011), da desfolhação e rebrota (Asega & Carvalho 2004, Portes & Carvalho 2006), da adubação nitrogenada (Cuzzuol *et al.* 2003, Cuzzuol *et al.* 2008) e de elevadas concentrações de CO₂ atmosférico (Oliveira *et al.* 2010).

1.3. GENÉTICA DE POPULAÇÕES

De acordo com Hartl & Clark (1997), a genética de populações define “população” como o grupo de organismos de uma espécie que ocupam uma área geográfica restrita o suficiente para permitir que cada indivíduo tenha a mesma oportunidade potencial de acasalar-se com outro indivíduo. No entanto, a definição exata de uma população é complexa e varia de espécie para espécie, pela presença quase universal de algum grau de estruturação geográfica (Hartl & Clark 1997).

O estudo da diversidade genética de uma espécie envolve basicamente duas ações: (i) quantificar os níveis de variabilidade dentro das populações e (ii) caracterizar o nível de estruturação genética entre populações (Hamrick 1983).

1.3.1. Diversidade Genética

Frankham *et al.* (2002) definem a diversidade genética como a variedade de genótipos e alelos presentes em uma população que se reflete em diferentes características morfológicas, fisiológicas e de comportamento entre os indivíduos e as populações. Essa diversidade genética ocorre em três níveis: i) diversidade dentro das populações ii) entre as populações e iii) entre as espécies. A diversidade genética é requisito para a evolução adaptativa das espécies, tendo em vista que a seleção natural não ocorre se não houver variáveis a serem selecionadas (Jiménez & Collada 2000). Esta variabilidade pode ser produzida por mutação espontânea ou induzida, recombinação genética e migração. Isto sugere que espécies que não têm reprodução sexuada podem ter uma menor variabilidade genética (Sosa *et al.* 2002).

O estudo da diversidade genética compreende a descrição da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de uma espécie, onde a distribuição das frequências alélicas e genótipos no espaço e tempo é o resultado da ação de forças evolutivas que atuam sobre eles (Hamrick 1983). Diversos fatores podem modificar a distribuição da variabilidade genética de cada espécie, como por exemplo, o tamanho da população, o sistema de reprodução (autofecundação, misto ou cruzamento), o tipo de reprodução (sexuada e assexuada), o fluxo gênico e a distribuição espacial na área de ocorrência da espécie (Hamrick 1983, Nybom & Bartish 2000).

As populações naturais possuem alta variabilidade genética intra-populacional, que é introduzida por eventos evolutivos como mutação e migração e que, por sua vez, pode ser perdida por eventos de deriva genética, endocruzamento e, no caso de genes não neutros, por seleção natural (Morand *et al.* 2002). Espécies com sistema de reprodução preferencialmente por cruzamentos endogâmicos tem a variabilidade genética consideravelmente diminuída.

Hamrick & Godt (1989, 1996) indicaram que espécies de plantas com uma ampla distribuição geográfica tendem a ter maior variabilidade genética do que espécies com distribuição restrita. Isto se deve ao fato de indivíduos que ocupam nichos ecológicos diferentes serem forçados a adaptar-se a diferentes condições ambientais. Com o tempo, esta adaptação pode se refletir em diferenças genéticas entre as populações. Portanto, em espécies de ampla distribuição geográfica é esperada uma alta variabilidade genética, pois as mesmas sofrem em menor grau os efeitos da deriva genética, que tende a diminuir a variação genética em populações com distribuição restrita pela fixação de alelos ao acaso.

Devemos ter em conta que para algumas espécies essa premissa não se aplica (tamanho populacional *versus* nível de variabilidade genética), pois existem populações pequenas e isoladas com uma grande diversidade genética (Godt *et al.* 1995). Além disso, nem sempre espécies com pouca diversidade genética e distribuição restrita são mais propensas à extinção. Algumas espécies podem sobreviver com baixa diversidade genética ou com populações reduzidas, sendo que em muitos casos, pela falta de registros da história de vida da espécie, não é possível afirmar que essa baixa diversidade genética seja devido à diminuição do tamanho das populações ou ao padrão histórico da espécie, sendo necessário realizar estudos incluindo amostras antigas para distinguir os efeitos da baixa diversidade genética histórica dos processos que levaram à perda de diversidade genética da espécie estudada (Matocq & Villablanca 2001).

A caracterização da variabilidade genética dentro de populações se dá por medidas de diversidade intrapopulacional, sendo as mais utilizadas: riqueza alélica (A_R), porcentagem de *loci* polimórficos (P), heterozigosidade observada (H_O) e heterozigosidade esperada (H_E).

A riqueza alélica (A_R) quantifica o número total de alelos diferentes em cada *loci* de uma população. As reduções na variabilidade genética nas populações resultantes do efeito fundador ou efeito gargalo afetam principalmente alelos com baixa frequência, razão pela qual o cálculo da riqueza alélica é útil para medir a perda de variação genética e detectar o efeito da deriva genética (Sosa *et al.* 2002).

O polimorfismo ou porcentagem de *loci* polimórficos (P) é uma medida do número de *loci* variáveis em uma população, calculada pela divisão do número de *loci* polimórficos na população entre o número total de *loci* analisados (Sosa *et al.* 2002). As maiores desvantagens desta medida são: i) a subjetividade no momento de definir o critério de polimorfismo; ii) o fato desta medida não considerar as frequências alélicas, sendo que o cálculo é o mesmo para *locus* pouco ou muito polimórficos.

A heterozigosidade observada (H_O) é o número de heterozigotos em um determinado *locus* dividido pelo número total de indivíduos amostrados (Frankham *et al.* 2002). A heterozigosidade

esperada (H_E) ou diversidade gênica (Nei 1987) é a frequência média de indivíduos heterozigotos, estimada pelo cálculo da frequência de heterozigotos para cada *locus* dividido pelo número total de *loci*. Quando as populações estão sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, a heterozigosidade pode ser calculada a partir da frequência alélica. Portanto, a heterozigosidade esperada quantifica a igualdade ou uniformidade das frequências alélicas nos *loci* (Frankham *et al.* 2002, Sosa *et al.* 2002).

É importante ressaltar que os três índices descritos analisam e quantificam a diversidade genética considerando diferentes aspectos da mesma. Assim, a riqueza alélica (A_R) centra-se na diversidade de alelos, o polimorfismo (P) na diversidade de genes ou *loci* e a heterozigosidade esperada (H_E) na igualdade das frequências alélicas em uma população (Sosa *et al.* 2002). A comparação entre a heterozigosidade observada (H_O) e heterozigosidade esperada (H_E) permite avaliar a estrutura genética das populações (Nei 1987).

1.3.2. Estrutura genética

A estrutura genética é o estudo da distribuição não casual dos alelos e genótipos no espaço e tempo, resultante da ação conjunta de forças evolutivas como mutação, seleção, migração e deriva genética (Hamrick 1983). A interação de fatores ecológicos e evolutivos determinam a estrutura populacional de uma espécie (Sosa *et al.* 2002).

O conhecimento da estrutura genética das populações é valioso no entendimento dos processos evolutivos, pois, permite estimar o papel do fluxo gênico (White *et al.* 1999), da seleção natural e da evolução não adaptativa e a forma como estes afetam as frequências alélicas das populações (Sosa *et al.* 2002).

Processos ecológicos, evolutivos e reprodutivos afetam de forma diferente a distribuição da variabilidade genética, sendo que esses processos operam simultaneamente, gerando dinâmicas evolutivas complexas, nas quais pode existir contraposição de seus efeitos. Por exemplo, baixos níveis de fluxo gênico são suficientes para neutralizar a diferenciação populacional resultante da seleção natural e da deriva genética (Slatkin 1994, Ellstrand 2014). A mutação e a seleção natural poderiam atuar de forma oposta em casos nos quais a mutação gera alelos que são eliminados pela seleção nas populações (Hedrick 2011). Além disso, a deriva genética (pela fixação arbitrária de alelos) tende a reduzir a diversidade genética dentro das populações, enquanto a seleção balanceadora ou fluxo gênico pode promover o aumento do polimorfismo (Hedrick 2011). Adicionalmente, a endogamia, como processo reprodutivo, pode contribuir para a diminuição da diversidade genética das populações pela segregação de genótipos homozigotos (Hedrick 2011).

A estrutura genética das espécies está correlacionada a características de sua história de vida. Assim, verificou-se que plantas de vida longa, preferencialmente com fecundação cruzada e

polinizadas pelo vento, mantém a maior parte da variabilidade genética dentro das populações, enquanto espécies com auto-fecundação mantém a maior parte da variabilidade entre as populações (Hamrick & Godt 1996, Nybom & Bartish 2000, De Lacerda *et al.* 2008). Além disso, espécies anuais apresentam uma maior diferenciação entre suas populações do que espécies perenes, e espécies de reprodução sexuada tem maior diferenciação quando comparadas com espécies que se reproduzem tanto sexuada como assexuadamente (Hamrick & Godt 1989, Holsinger 2000).

Com relação ao sistema reprodutivo, em espécies alogámas é esperado encontrar uma maior diversidade dentro do que entre populações, mostrando menor divergência quanto maior o fluxo gênico entre as mesmas. No entanto, em espécies autógamas a diversidade dentro das populações é baixa e observa-se uma alta divergência entre as mesmas (Loveless & Hamrick 1984, Holsinger 2000).

Devido à natureza séssil das plantas, o fluxo de genes é limitado e ocorre por meio da polinização e dispersão de sementes (Hardy *et al.* 2006). No entanto, estudos sobre a distribuição da diversidade genética dentro e entre populações mostram, direta e indiretamente, a existência de grande fluxo de genes a longa distância, com maior distribuição da variação genética dentro das populações do que entre elas, nos casos em que o pólen apresenta maior distância de dispersão do que as sementes (Hamrick & Loveless 1989, Hamrick & Murawski 1991, Chase *et al.* 1996, White *et al.* 1999, 2002, Latouche-Hallé *et al.* 2004, Bittencourt & Sebbenn 2007, Isagi *et al.* 2007, Lander *et al.* 2010).

Uma forma de analisar como os processos evolutivos e ecológicos afetam a diversidade genética de uma espécie é separar seus dois componentes, intra e inter-populacional, o que permite estimar como está distribuída e estruturada a variabilidade genética em populações naturais. Uma população apresenta uma estruturação genética quando suas frequências alélicas não se distribuem de forma aleatória, mas seguem um padrão que pode ser espacial ou temporal (Sosa *et al.* 2002).

Estas estimativas permitem determinar a existência de diferenças significativas na composição genética de diferentes populações de uma espécie e descrever o nível de diferenciação através de índices de distância ou de fixação. A determinação de estrutura com o uso de marcadores moleculares permite que se exclua a hipótese de panmixia indicando, portanto, um certo grau de isolamento genético das populações (Godoy 2009).

A análise dos dados genéticos deve basear-se em alguma teoria ou modelo (Weir 1996). O modelo clássico utilizado é o princípio de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) o qual afirma que em uma população infinita, onde o acasalamento é aleatório e não há mutações, migração e seleção natural, a composição genética deve-se manter em equilíbrio (Frankham *et al.* 2002). Sendo que, quando ocorrem desvios das proporções esperadas pelo EHW, significa que alguma das premissas

anteriores foi violada. Assim, as principais alterações nas frequências alélicas nas populações naturais se devem a mutação, migração, seleção natural e deriva genética (Frankham *et al.* 2002).

O princípio do EHW pressupõe uma população completamente isolada, em que todos os indivíduos que contribuem para a geração seguinte são da mesma população, sem migração de indivíduos de outras populações. No entanto, a maioria das espécies estão distribuídas em diversas populações locais ou subpopulações. A troca genética entre as populações ou entre indivíduos de uma população corresponde ao fluxo gênico, o qual diminui a variabilidade genética entre as populações (Hedrick 2011).

Há quatro modelos que podem descrever o fluxo gênico em uma metapopulação (rede de subpopulações conectadas pela migração ou fluxo gênico): i) continente-ilha, é o modelo no qual ocorre um movimento unidirecional de uma população grande (continental) para uma menor (ilha); ii) ilhas, a migração ocorre ao acaso entre pequenas populações, onde todas têm a mesma probabilidade de receber indivíduos provenientes de migração; iii) *stepping-stone*, cada população recebe somente migrantes de populações vizinhas e iv) isolamento por distância, a migração ocorre localmente entre vizinhos, numa população com distribuição contínua (Futuyma 1992).

A caracterização da estrutura genética entre populações, a partir de dados gerados com marcadores moleculares codominantes, tem sido realizada por três metodologias: i) estatística F de Wright (Wright 1965, Nei 1977); ii) análise da variância de frequências gênicas ou coeficiente de coancestralidade (Cockerham 1969, Weir 1996) e iii) análise da diversidade genética em populações subdivididas (Nei 1973, 1977, 1987). As três abordagens apresentam bases genéticas similares, procurando verificar a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações e complementando-se em relação ao significado biológico das estimativas obtidas (Reis 1996).

A estatística F com base em medidas de probabilidade de identidade por descendência fornece os índices de fixação dos alelos para o total das populações (F_{IT}) e médias dentro e entre populações (F_{IS} e F_{ST}) (Wright 1965, Nei 1977). A análise da variância das frequências gênicas fornece a distribuição da variabilidade genética considerando o processo amostral nas estimativas (Cockerham 1969). E, por fim, a diversidade genética de Nei fornece a proporção da variabilidade genética dentro e entre as populações e os níveis de heterozigosidade esperados para o total e média das populações (Nei 1973).

Quando existe autofecundação ou quando há cruzamento entre indivíduos aparentados, ocorre endogamia, conduzindo a um desvio do EHW. Para medir este desvio é utilizado o coeficiente de consanguinidade ou endogamia (F_{IS}), que é uma medida do desvio das frequências genotípicas com

relação às frequências panmíticas, em termos de excesso ou deficiência de heterozigotos. É definida como a probabilidade de que dois alelos em um indivíduo sejam idênticos por descendência em relação à sub-população. O valor deste índice varia entre -1 e 1, sendo que os valores negativos indicam excesso de heterozigotos e os positivos, déficit de heterozigotos em relação ao EHW (Hartl & Clark 1997, Sosa *et al.* 2002).

O índice de fixação global (F_{IT}) é um indicador que estima se dois *locus* em um indivíduo são idênticos por descendência em relação ao total da população, e reflete o efeito de consanguinidade e deriva genética. Os valores variam entre -1 (excesso de heterozigotos) e 1 (déficit de heterozigotos), com relação ao EHW (Hartl & Clark 1997).

O grau de diferenciação genética entre populações naturais pode ser quantificado pelo índice de diferenciação genética (F_{ST}), que explica as mudanças na heterozigosidade por subdivisão populacional e deriva genética. Os valores de F_{ST} variam de 0 a 1, sendo 0 indicativo de frequências alélicas idênticas entre populações, não representando qualquer diferenciação genética entre elas, e 1 resultante de uma diferenciação máxima das frequências gênicas entre populações, indicando fixação de alelos alternativos nas populações (Hartl & Clark 1997).

É bem conhecido que a presença de variabilidade genética em uma espécie permite que esta responda às pressões do ambiente, evolua e sobreviva ao longo do tempo. Por conseguinte, a determinação da diversidade genética e estrutura das populações de plantas naturais têm sido reconhecida como fundamental não só para delinear estratégias de conservação *in situ* ou *ex situ* (Holsinger & Gottlieb 1991, Rossetto *et al.* 1995, Morden & Loeffler 1999), mas também para estabelecer formas de exploração sustentável (Holsinger & Gottlieb 1991, Chalmers *et al.* 1992, Reis 1996).

1.4. MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares são definidos como qualquer fenótipo molecular originado da expressão de um gene ou de um segmento específico de DNA (Ferreira & Grattapaglia 1998). Têm sido utilizados em análises genéticas com diversas finalidades, tais como identificação de clones, cultivares e genes de interesse para o melhoramento genético; estimativas da diversidade genética, fluxo gênico e taxas de cruzamento; na construção de mapas genéticos (Karp 1997, Buso *et al.* 2003), assim como em estudos taxonômicos, filogenéticos e evolutivos (Davies *et al.* 1999).

Os marcadores de DNA são utilizadas para analisar variações genotípicas (polimorfismos) dentro da sequência nucleotídica, incluindo inserções, deleções, translocações, duplicações e mutações pontuais, oferecendo várias vantagens em relação aos marcadores fenotípicos: i) podem ser encontrados em muitas partes do genoma (*introns*, *exons* e regiões reguladoras); ii) são estáveis

e detectáveis em todos os tecidos e em qualquer estágio do desenvolvimento; iii) são geralmente neutros, não sendo afetados pelo ambiente e iv) alguns são codominantes, permitindo distinguir indivíduos homo e heterozigotos (Mondini *et al.* 2009).

Diversas características devem ser levadas em conta na seleção do marcador, como grau de polimorfismo, grau de estabilidade ambiental, número de *loci*, reprodutibilidade, praticidade e custo (Mondini *et al.* 2009). De acordo com o exposto anteriormente, para estudos de diversidade genética são indicados marcadores que analisam um maior número de *loci*, permitindo assim uma maior cobertura do genoma (Pérez de la Vega & García 2000, Schulman 2007), sendo que os microssatélites estão entre os marcadores mais utilizados para estudos de polimorfismo entre indivíduos ou sequências de DNA.

1.4.1. Marcadores Microssatélites

O genoma dos eucariontes e procariontes contém sequências simples repetidas (SSR; *Sequence Simple Repeats*) que podem ser usadas como marcadores de DNA. Esses marcadores são sequências de um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem* (um ao lado do outro). Essas sequências repetitivas são flanqueadas por sequências únicas, geralmente conservadas entre indivíduos da mesma espécie, podendo ser encontradas em genomas nucleares, mitocondriais e cloroplastidiais, em exons e íntrons, caracterizando-se por serem altamente polimórficas com relação ao seu tamanho, fazendo com que sejam marcadores ideais para estudos em nível populacional (Zane *et al.* 2002, Ellegren 2004).

O polimorfismo dos microssatélites é revelado pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com o uso de dois iniciadores únicos, compostos por aproximadamente 20 nucleotídeos específicos e complementares à sequência flanqueadora de cada marcador (*locus*) (Figura 4). Os produtos amplificados podem ser separados em géis de poliacrilamida corados com prata, marcados com radioatividade ou fluorescência (Saiki *et al.* 1988).



Figura 4. Marcador molecular Microssatélite ou SSR. No exemplo, um dinucleotídeo (AC)_n

Os SSR podem ser classificados de acordo com o tipo de repetição que os compõe podendo ser: mononucleotídeo (p. ex. GGGGGG), dinucleotídeo (p. ex. (CA)_n), trinucleotídeo (p. ex. (GAT)_n), pentanucleotídeo (p. ex. (GTCAA)_n) e hexanucleotídeo (p. ex. (GATCTA)_n). Além disso, são classificados de acordo com o tipo de motivo da sequência repetitiva em perfeito, quando a sequência de repetição não é interrompida (p. ex. (CA)₆); imperfeito, quando há duas bases entre o motivo repetido (p. ex. (TA)₃ GT(TA)₃); interrompido, quando há uma pequena sequência dentro do motivo repetido (p. ex. (TA)₃CGTGC(TA)₅) e compostos, quando possuem duas sequências com motivos repetitivos distintos (p. ex. (TA)₅(GT)₅) (Schlötterer 2000, Oliveira *et al.* 2006). As repetições de dinucleotídeos são as mais abundantes, seguidas por mono, tetra e trinucleotídeos sendo estes últimos os menos abundantes (Ellegren, 2004). No genoma das plantas, o dinucleotídeo mais abundante é o AT_n (Ellegren 2004).

O alto polimorfismo dos microsatélites é consequência da alta taxa de mutação (10^{-2} a 10^{-6} por *locus* por geração) (Schlötterer 2000, Gao *et al.* 2013). As alterações de tamanho dos microsatélites são atribuídas principalmente a dois mecanismos de mutação: i) derrapagem na replicação, ou seja, a dissociação transitória das cadeias de DNA na replicação seguida de reassociação errônea (*slippage mispairing*); ii) pareamento desigual durante a recombinação (*unequal crossing over*), que resulta na deleção de repetições em uma cromátide e inserção na outra (Ellegren 2004, Oliveira *et al.* 2006). Foi proposto que a taxa de substituição das regiões microsatélites é influenciada pelo número de repetições, composição do SSR, tamanho da unidade repetitiva, natureza das regiões flangeadoras, interrupção dos SSR, taxa de recombinação, taxa de transcrição e taxa de mutação (Schlötterer 2000, Vazquez-Lobo & Morales 2014). As taxas de mutação dos microsatélites tendem a aumentar com o número de repetições do motivo, sendo que SSR mais longos tem níveis mais elevados de polimorfismo (Petit *et al.* 2005a, Gao *et al.* 2009).

Na literatura existem modelos com simulações computacionais de mutação de microsatélites, que tem por intuito determinar o número de alelos esperados em população com uma determinada heterozigiosidade observada. Dentre os mais usados, pode-se destacar o Modelo de Alelos Infinitos (IAM, *Infinite Alleles Model*), no qual cada mutação cria aleatoriamente um novo alelo; o Modelo de Passos de Mutação (SMM, *Stepwise Mutation Model*), o qual assume que quando existe uma mutação em um *locus* microsatélite, ele ganha ou perde uma repetição, ou seja, o processo de mutação depende do estado ancestral, pois o novo alelo depende do alelo original; o Modelo de Duas Fases (TPM, *Two Phase Model*) Di Rienzo *et al.* (1994, *apud* Oliveira *et al.* 2006) introduziu esse modelo como extensão do modelo SMM, no qual se assume que as mutações podem ocorrer gradualmente ou por passos e também por mutações de maior ou menor magnitude; e o Modelo K-alelos (KAM, *K-alleles Model*) que presume a existência de k alelos possíveis em um loco, de

modo que a probabilidade de mutação de um determinado loco segue a equação $\mu^*(k-1)-1$, em que μ é a taxa de mutação (Ellegren 2004, Oliveira *et al.* 2006, Vazquez-Lobo & Morales 2014). Simulações computacionais tem demonstrado que o modelo SMM é o que melhor se ajusta às taxas de mutação dos *loci* microssatélites, sugerindo que as taxas de mutação nestes *loci* são independentes do tamanho do alelo (Valdes *et al.* 1993, Vazquez-Lobo & Morales 2014).

1.4.1.1. Vantagens do uso de microssatélites

Os microssatélites apresentam algumas vantagens em relação a outros marcadores moleculares por serem codominantes, multi-alélicos, altamente reprodutíveis, apresentarem elevada resolução, alto grau de polimorfismo, por apresentarem herança mendeliana simples e serem baseados na reação de PCR (Jiménez & Collada 2000). Os microssatélites são considerados marcadores neutros, ou seja, não sofrem influência de pressões de seleção (Jiménez & Collada 2000). Os microssatélites são baseados em sequência de DNA, o que confere uma vantagem adicional, pois permite analisar materiais como fósseis e plantas herborizadas. Por essas razões, os microssatélites têm sido os marcadores moleculares mais amplamente utilizados em estudos de genética de populações, melhoramento genético, testes de paternidade e genética da conservação (Zane *et al.* 2002, Buso *et al.* 2003, Ellegren 2004, Oliveira *et al.* 2006, Vazquez-Lobo & Morales 2014).

Uma das principais desvantagens da utilização de microssatélites é a complexidade de seu desenvolvimento, que exige o isolamento, clonagem, sequenciamento e caracterização destes *loci* na espécie a ser estudada, além do alto custo do processo. Vários métodos estão disponíveis para o desenvolvimento de bibliotecas genômicas enriquecidas em microssatélites, sendo que o protocolo desenvolvido por Billotte *et al.* (1999) tem maior eficiência e menor demanda de recursos.

As regiões flangeadoras dos microssatélites são bastante conservadas, o que possibilita a utilização dos iniciadores desenvolvidos para uma espécie em outras espécies pertencentes ao mesmo gênero ou até mesmo gêneros distantes da mesma família (Ferreira & Grattapaglia 1998, Barbará *et al.* 2007). O êxito na transferência dos iniciadores está relacionado ao grupo taxonômico estudado e é afetado por vários fatores, como o tamanho e complexidade do genoma e região do genoma na qual os microssatélites estão localizados (codificante ou não codificante) (Oliveira *et al.* 2006). O sucesso de transferência entre espécies é maior para as alógamas ou com sistema de reprodução misto e quando o tamanho do genoma da espécie alvo é menor do que o da espécie da qual foram originados os microssatélites (Barbará *et al.* 2007).

A porcentagem de transferabilidade é maior quanto maior o grau de parentesco entre as espécies estudadas (Barbará *et al.* 2007). Maior sucesso de transferabilidade foi observado em aves, mamíferos e répteis. Em plantas, o sucesso na transferência de marcadores é maior para

dicotiledôneas do que monocotiledôneas, sendo o percentual médio de transferência de 40% para monocotiledôneas e de 60% para dicotiledôneas (Barbará *et al.* 2007). Esse percentual diminui para aproximadamente 10% em dicotiledôneas quando a transferabilidade é feita entre espécies de gêneros distintos da mesma família, sendo que para monocotiledôneas o percentual é quase nulo (Barbará *et al.* 2007). Além disso, o potencial de transferabilidade é maior quando os marcadores estão localizados em regiões expressas do genoma, que possuem maior grau de conservação evolutiva e, portanto, menor polimorfismo do que os marcadores localizados em regiões não expressas (Barbará *et al.* 2007).

A transferabilidade facilita o desenvolvimento de estudos com marcadores microssatélites, pois diminui seu custo quando comparado com o desenvolvimento de novas bibliotecas genômicas para gerar marcadores espécie-específicos, disponibilizando ferramentas para estudos genéticos populacionais de espécies nativas que pertençam ao mesmo gênero ou família da espécie estudada (Barbará *et al.* 2007, Chapman *et al.* 2007, Chapman *et al.* 2009).

O uso de marcadores microssatélites permite entender como é gerada e mantida a diversidade genética dentro e entre populações, assim como quantificar as distâncias de fluxo gênico via pólen e sementes e quantificar o fluxo gênico histórico e atual (Moreno *et al.* 2009). Além disso, esses marcadores permitem detectar a existência de reprodução assexuada em populações naturais e como esta pode alterar as estimativas dos índices de diversidade genética e estrutura, visando melhorar as estratégias de conservação (Zucchi *et al.* 2005, Martins *et al.* 2006).

1.4.1.2. Uso de microssatélites em estudos genéticos no Cerrado brasileiro

O desmatamento tem levado à perda de variabilidade genética de muitas espécies do Cerrado (Martins *et al.* 2006). A necessidade de estudos genéticos de espécies vegetais para sua conservação e exploração econômica racional tornou-se clara nos últimos anos, com particular atenção para os níveis de variabilidade genética (Newton *et al.* 1999). Embora a maioria dos estudos de genética de populações de espécies tropicais se refira a espécies arbóreas de florestas úmidas, alguns trabalhos com espécies de Cerrado foram publicados, empregando diferentes marcadores moleculares (Collevatti *et al.* 2001, Lacerda *et al.* 2001, Zucchi *et al.* 2003, Trindade & Chaves 2005, Bertoni *et al.* 2010, Moura *et al.* 2011). Nas últimas décadas, marcadores SSR têm sido desenvolvidos para espécies típicas do Cerrado brasileiro como por exemplo *Caryocar brasiliense* (Collevatti *et al.* 1999, Collevatti *et al.* 2001, 2003), *Tabebuia aurea* (Braga *et al.* 2007), *Lychnophora pinaster* (Haber *et al.* 2009), *Tibouchina papyrus* (Telles *et al.* 2011), *Eugenia dysenterica* (Zucchi *et al.* 2003, Telles *et al.* 2013), *Qualea grandiflora* Mart (Ritter *et al.* 2012), dentre outras.

Além disso, existem inúmeros relatos de transferabilidade de marcadores microsatélites desenvolvidos para espécies de regiões temperadas ou espécies nativas de outros biomas para espécies do Cerrado, como os que avaliaram a transferabilidade de marcadores de *Eucalyptus spp.* em *Eugenia dysenterica* (cagaita) (Zucchi *et al.* 2002), de *Hymenaea courbaril* (jatobá) em *Hymenaea stigonocarpa* (jatobá-do-cerrado) (Ciampi *et al.* 2008) e de *Anacardium occidentale* (caju) em *Anacardium humile* (cajuzinho-do-cerrado) (Cota *et al.* 2012, Soares *et al.* 2013). No entanto, apesar das ferramentas disponíveis, o conhecimento sobre os níveis de diversidade genética e estrutura de populações de espécies do Cerrado ainda é insuficiente para gerar estratégias de conservação.

Apesar da família Asteraceae ser a maior entre as angiospermas (Bremer, 1994) e ter grande importância ecológica e econômica, pouco se conhece sobre a estrutura e diversidade genética de suas populações naturais. Nos últimos anos, os esforços para desenvolver marcadores moleculares para Asteraceae tem sido direcionados, principalmente, para espécies economicamente importantes como o girassol (*Helianthus annuus* L.) (Paniego *et al.* 2002, Chapman *et al.* 2007, Chapman *et al.* 2009), alface (*Lactuca sativa* L.) (Van de Wiel *et al.* 1999) e o cardamomo (*Carthamus tinctorius* L.) (Chapman *et al.* 2009). Dentre os marcadores desenvolvidos para Asteraceae nativas podemos destacar *Lychnophora ericoides* (Rabelo *et al.* 2011), *Lychnophora pinaster* (Haber *et al.* 2009), *Hypochaeris salzmänniana* (Ruas *et al.* 2009), *Baccharis dracunculifolia* (Belini *et al.* 2016), entre outras.

1.5. JUSTIFICATIVA

O Cerrado abriga parte significativa da diversidade biológica do Brasil (Myers *et al.* 2000) e associada a esta encontra-se uma ampla variedade de ambientes. Em ecossistemas sujeitos a variações nas condições ambientais, uma alta diversidade genética é fundamental, pois permite que as espécies se adaptem e, portanto, sobrevivam.

Com a alta taxa de desmatamento pela expansão das fronteiras agrícolas, grande parte do Bioma Cerrado vem sendo ameaçada e sua vegetação nativa está sendo substituída por monoculturas, o que resulta em fragmentos de vegetação natural. Esse processo de destruição coloca em risco a estabilidade e sobrevivência de populações nativas, pois pode levar à diminuição no tamanho efetivo populacional e mudanças no padrão de distribuição espacial da diversidade genética, tendo como consequência a perda de alelos raros, a redução da heterozigosidade e o aumento da endogamia, diminuindo assim a capacidade de resposta das espécies às alterações ambientais e, consequentemente, sua adaptabilidade.

A caracterização da diversidade genética em populações naturais é essencial para a compreensão dos processos evolutivos que causam heterogeneidade nas espécies e consiste em ferramenta útil para o desenvolvimento de práticas eficientes de conservação e manejo do patrimônio genético.

O Cerrado possui inúmeras espécies com grande potencial de utilização econômica. Dentre elas, encontramos *Chrysolaena obovata*, Asteraceae nativa com ampla distribuição, e que possui um alto potencial econômico para a produção de frutanos do tipo inulina, os quais são utilizados em escala mundial pelas indústrias farmacêutica e alimentícia, por seus reconhecidos benefícios para a saúde humana como fibras solúveis e adoçantes.

O metabolismo de frutanos em *C. obovata* e seu potencial de resposta a diversos estresses abióticos, como seca, frio e altas concentrações de CO₂ tem sido amplamente estudado, porém se desconhece se nas populações naturais esse metabolismo é conservado ou apresenta variações para garantir a sobrevivência da espécie nas diferentes fitofisionomias do Cerrado. Apesar desse amplo conhecimento da fisiologia da espécie, não existem informações sobre a diversidade genética e sua distribuição nas populações desta espécie em diferentes áreas de Cerrado. Dessa forma, este trabalho se insere entre os pioneiros para a espécie, tendo disponibilizado os primeiros marcadores moleculares do tipo microsatélite para *C. obovata*, e com potencial de transferência para outras espécies de Asteraceae. O desenvolvimento de tais marcadores teve por fim estimar a diversidade e a estrutura genética de populações naturais de *C. obovata* em duas fitofisionomias do Cerrado, visando gerar informações úteis que facilitem a inclusão da espécie em programas de melhoramento genético e conservação, caso sua diversidade esteja ameaçada.

Considerando que *Chrysolaena obovata* apresenta uma alta variabilidade fenotípica, com grande variedade na forma das touceiras e das folhas e na estrutura do rizóforo (Anexo B), associada à grande diversidade de ambientes em que ocorre, e que suas populações estão separadas geograficamente pela fragmentação de seu habitat, esse trabalho se baseou na hipótese de que as populações dessa espécie mostrariam uma alta variabilidade genética e um alto grau de diferenciação, em função de fluxo gênico limitado. Por outro lado, acreditamos que a variabilidade dentro das populações seria pequena, levando-se em conta a reprodução preferencialmente vegetativa descrita para a espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Caracterizar, por meio de marcadores microssatélites, a diversidade e a estrutura genética de populações de *Chrysolaena obovata* de cerrado *sensu stricto* e campos rupestres, e sua possível relação com o metabolismo de frutanos.

2.2. ESPECÍFICOS

- Desenvolver marcadores microssatélites para *Chrysolaena obovata* a partir de biblioteca genômica.
- Avaliar o potencial de transferabilidade dos iniciadores microssatélites desenvolvidos para *Chrysolaena obovata* em outras espécies de Asteraceae.
- Determinar a diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Chrysolaena obovata*.
- Analisar o conteúdo e a composição de frutanos em populações de *Chrysolaena obovata* em diferentes áreas de ocorrência no Cerrado e em duas fases de seu desenvolvimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDO

O presente trabalho foi desenvolvido em três localidades de cerrado *sensu stricto* e quatro localidades de campos rupestres (Tabela 1, Figura 5).

3.1.1. Cerrado *sensu stricto*

- **Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (SP):** localiza-se no município de Mogi-Guaçu, SP, (22°10'00,00" - 22°18'00,00"S e 47°08'00,00" - 48°11'00,00"O), apresentando uma área total de 4.501 ha, com remanescentes de vegetação nativa de Cerrado e Mata Atlântica, entremeada com áreas de plantio de espécies exóticas, onde o Cerrado ocupa a maior parte da área, distribuído em várias fisionomias (Giudice Neto *et al.* 2015). Ocorrem também matas ciliares ao longo dos córregos que delimitam e percorrem as glebas e áreas de brejo ou campos úmidos, com uma altitude variando de 566 a 724 m (Pinto *et al.* 2009). Os climas encontrados na região estão classificados como tipo Aw e Cwa, de Köppen (Giudice Neto *et al.* 2015). Os meses mais quentes apresentam temperaturas superiores a 22°C e os meses mais frios temperaturas inferiores a 18°C. O inverno é seco, apresentando meses com precipitações inferiores a 30 mm (Gomes 2003). Na Reserva ocorrem seis tipos de solo sendo o Latossolo Vermelho-Amarelo o mais dominante na região (Oliveira *et al.* 1982, *apud* Pinto *et al.* 2009, Giudice Neto *et al.* 2015).
- **Estação Ecológica de Santa Bárbara - EECSB (SP):** localiza-se no município de Águas de Santa Bárbara (Médio Paranapanema), estado de São Paulo, sua posição geográfica compreende as coordenadas (22°46'30,00" - 22°50'30,00"S, 49°10'30,00" - 49°15'30,00"O), com uma altitude variando de 600 a 680 m e uma área total de 2.712 ha (Meira Neto *et al.* 2007, Melo & Durigan 2011). O clima da região é classificado como Cwa de Köppen, com duas estações bem definidas, (uma seca e outra chuvosa; Peel *et al.* 2007). A temperatura média nos meses mais quentes é 24°C (janeiro e fevereiro) e nos meses mais frios 17 °C (junho e julho; Melo & Durigan 2011). A precipitação média anual é de aproximadamente 1400 mm, com a maior média de precipitação mensal ocorrendo no mês de dezembro (206 mm) e a menor em agosto (44 mm; Melo & Durigan 2011). De forma geral, prevalecem na região os Latossolos Vermelhos (Oliveira *et al.* 1999). A cobertura vegetal predominante é de cerrado, sendo composta sobretudo por formações campestres e savânicas, como cerrado típico (34,4%), cerrado denso (10,2%), cerrado ralo (7%) e campo limpo úmido (6,5%; Melo & Durigan 2011). As fisionomias florestais naturais são o cerradão (11,9%), mata de galeria (4%) e mata seca (0,7%; Melo & Durigan 2011).

- **Reserva Ecológica do Panga – EEP (MG):** compreende uma área de 403,85 hectares e se localiza a cerca de 30 km ao sul do centro do município de Uberlândia. É uma das reservas presentes nos cerrados do estado de Minas Gerais, sendo uma das poucas áreas de vegetação nativa, em boas condições de preservação (Moreno *et al.* 2008). Sua posição geográfica compreende as coordenadas 19°09'20,00" - 19°11'10,00"S e 48°23'20,00" - 48°24'35,00"O, com uma altitude variando de 750 a 830 m (Schiavini & Araújo 1989). Os solos da região são classificados como Latossolo Vermelho e Latossolo Vermelho-amarelo profundo, distrófico, hidromórficos de textura arenosa (Lima & Bernadino 1992, *apud* Moreno *et al.* 2008). O clima, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Aw, tropical úmido, com duas estações: verão chuvoso (outubro a março) e inverno seco (abril a setembro), com uma temperatura média anual de 22 °C e uma pluviosidade anual de aproximadamente 1500 mm (Rosa *et al.* 1991). A Reserva Ecológica do Panga apresenta as seguintes fitofisionomias, de acordo com a classificação proposta por Ribeiro & Walter (2008): floresta de galeria, floresta seca semidecídua, cerradão, cerrado *sensu stricto*, cerrado ralo, campo sujo seco, campo sujo úmido e vereda.

3.1.2. Campos rupestres

- **Parque Estadual Serra dos Pireneus (GO):** está situado entre os municípios de Pirenópolis, Cocalzinho e Corumbá de Goiás. A área do parque possui uma extensão de 2837,47 hectares e está localizada nas coordenadas 15°46'00,00" - 15°50'00,00"S e 48°47'60,00" - 48°52'60,00"O (Santos 2003). A altitude varia de 1.100 m a 1.395 m, tendo como ponto culminante o Pico dos Pireneus (Agência Ambiental de Goiás & Nativa 2002). O clima, segundo a classificação de Köppen, é do tipo Aw, tropical úmido, caracterizado por duas estações bem definidas: seca (abril a setembro) e chuvosa (outubro a março), com uma precipitação anual média de 1500 mm e a temperatura média anual de 22°C. O solo predominante é do tipo Cambissolo, pobre em matéria orgânica e pouco profundo, em grande parte considerada como Litólico, com ocorrência de lajedos, blocos de rocha de tamanhos variados e afloramentos rochosos em toda sua extensão (Agência Ambiental de Goiás & Nativa 2002). O parque possui basicamente cinco fitofisionomias: cerrado rupestre, cerrado de aluvião, campos, mata seca e mata de galeria (Agência Ambiental de Goiás & Nativa 2002).
- **Reserva Biológica e Estação Experimental Serra Dourada (GO):** Dentro da área de Proteção Ambiental (APA) situada a 37 km de Goiás, no município de Mossâmedes, se encontra imersa a Reserva Biológica da Universidade Federal de Goiás “Prof. José Ângelo Rizzo”, situada no Parque Estadual da Serra Dourada (PESD), localizada nos Municípios de Mossâmedes, Goiás e Buritis de Goiás. A altitude da Serra Dourada varia de 726 a 1080 m, ocupando uma área de

30.000 hectares, entre as coordenadas geográficas 16°06'02,00" - 16°03'52,00"S e 50°10'59,00" - 50°10'12,00"O (Barbosa 2008). O solo é litólico, formado basicamente por micaxistos, quartzitos e filitos, sendo bastante pobre, pouco profundo e arenoso (Manoel 1999). Segundo Köppen, o clima da região é do tipo Aw, com a estação chuvosa entre outubro e março, e a estação seca entre abril e setembro. A temperatura média anual é de 23,6°C, com dias quentes e noites frias. A precipitação média anual é 1.786 mm (Manoel 1999).

- **Montes Claros (MG):** O estudo foi feito numa área de campos rupestres que faz parte da Área de Preservação Ambiental (APA) “Conjunto Paisagístico da Serra Resplandecente” do município de Itacambira, norte de Minas Gerais (16°57'23,00" - 16°59'47,00"S e 43°20'01,00" - 43°24'01,00"O) (Cangussu 2012, Silva *et al.* 2013). Nessa região, a paisagem predominante de relevo é montanhosa, entrecortada por chapadas e várzeas e nos vales desenvolvem-se árvores de porte maior, com altitude que varia de 705 a 1485 m. A região apresenta duas estações bem definidas: seca (maio a setembro) e chuvosa (outubro a abril), com uma temperatura média anual de 22°C e uma precipitação média de 1000 mm (Viana & Alkimim 2004, Cangussu 2012). O solo da região de coleta é composto em maior proporção por areia e argila, com médio teor de matéria orgânica e alta saturação por alumínio, o que é refletido nas baixas concentrações de Ca, Mg e K. Em função disso, o solo é considerado ácido, com alta toxidez por alumínio (Cangussu 2012).
- **Campo experimental Fazenda Sucupira – FAZ (DF):** é propriedade da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA/CENARGEN). Sua área total é de 1.763 hectares e localiza-se ao sudoeste da cidade de Brasília (15°52'00,00" - 15°56'00,00"S e 48°00'00,00" - 48°02'00"O) (Walter & Sampaio 1998, *apud* Vale *et al.* 2007). O clima predominante na região é do tipo Aw de Köppen (tropical chuvoso), com invernos secos e verões chuvosos. A altitude média é de 1100 m e a precipitação anual média de aproximadamente 1493 mm (Walter & Sampaio 1998, *apud* Vale *et al.* 2007). Ainda são encontrados trechos preservados de mata nativa, com Mata de Galeria, cerrado *sensu stricto* (com os subtipos típico, ralo), campo sujo e campo limpo, ambos com os subtipos seco e úmido, campos rupestres, além de pequeninos trechos com Vereda e Mata Seca (Ribeiro & Walter 1998).

Tabela 1. Localização geográfica das populações estudadas

População	ID	N*	Municípios	Estado	Fitofisionomia	Coordenadas de coleta		Altitudes dos locais de coleta (m)
						Latitudes (S)	Longitudes (O)	
Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu	MG	20	Mogi-Guaçu	SP	cerrado <i>sensu stricto</i>	22°15'48,30" 22°15'47,94"	47°11'31,92" 47°11'31,98"	581
Estação Ecológica de Santa Bárbara	SB	21	Águas de Santa Barbara	SP	cerrado <i>sensu stricto</i>	22°47'5,44" 22°47'13,60"	49°14'29,28" 49°14'18,90"	634 - 638
Reserva Ecológica do Panga	UB	30	Uberlândia	MG	cerrado <i>sensu stricto</i>	19°10'13,00" 19°10'55,30"	48°23'27,20" 48°23'37,60"	762 - 815
Reserva Biológica e Estação Experimental Serra Dourada	SD	30	Mossamedes e Buritis de Goiás	GO	campos rupestres	16°04'08,00" 16°04'11,00"	50°10'48,00" 50°10'56,00"	1000 - 1009
Campo Experimental Fazenda Sucupira	BRA	34	Brasília	DF	campos rupestres	15°54'05,90" 15°55'48,20"	48°00'35,50" 48°00'36,20"	1102 - 1147
Montes Claros	MC	30	Itacambira	MG	campos rupestres	16°57'25,40" 16°57'27,20"	43°24'03,10" 43°23'59,50"	1209 - 1211
Parque Estadual Serra dos Pireneus	SP	27	Pirenópolis, Cocalzinho e Corumbá de Goiás	GO	campos rupestres	15°47'25,00" 15°47'29,70"	48°50'09,00" 48°50'12,54"	1296 - 1318

* Número de indivíduos coletados (N)

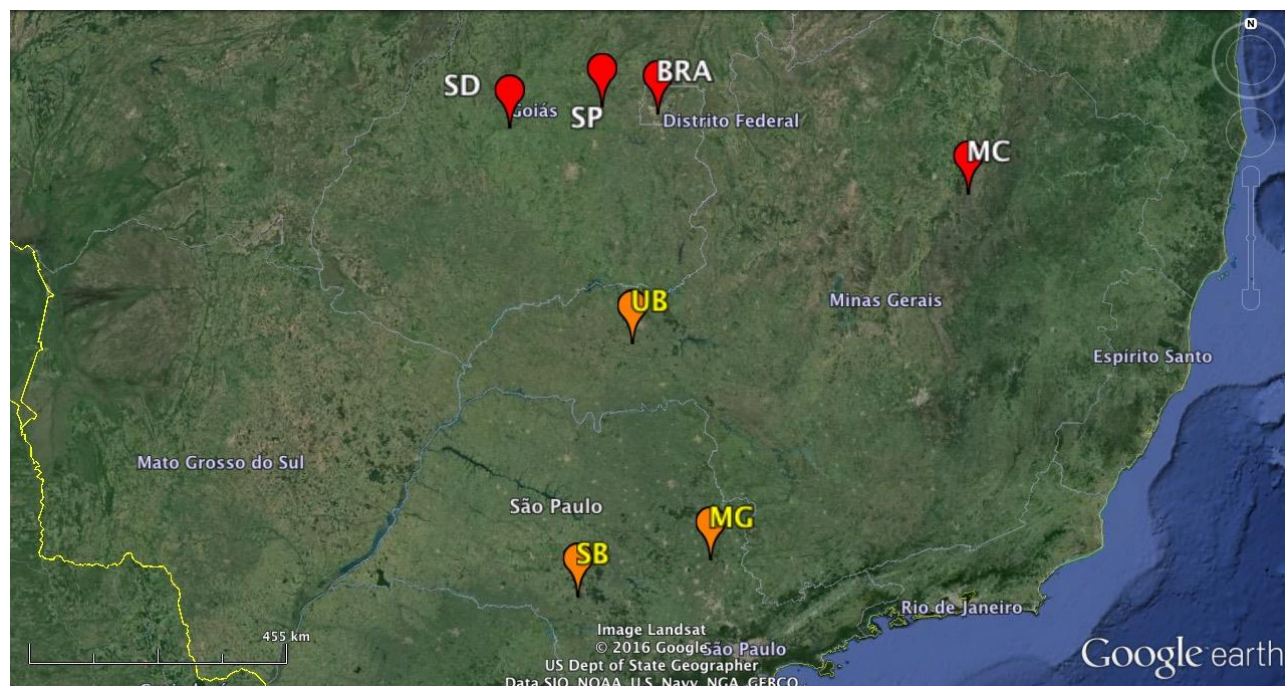


Figura 5. Mapa das áreas de coleta de sete populações de *Chrysolaena obovata*. Reserva Biológica e Estação Experimental Serra Dourada (SD/GO), Parque Estadual Serra dos Pireneus (SP/GO), Campo Experimental Fazenda Sucupira (BRA/DF), Montes Claros (MC/MG), Reserva Ecológica do Panga (UB/MG), Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (MG/SP), Estação Ecológica de Santa Bárbara (SB/SP). Populações em vermelho foram coletadas em campos rupestres e populações em laranja foram coletadas em cerrado *sensu stricto*. **Fonte:** <http://earth.google.com>.

Embora todas as coletas tenham sido realizadas em áreas de preservação ambiental, as populações foram amostradas em áreas com diferentes graus de perturbação sendo que três áreas apresentaram maiores indícios de degradação - Mogi-Guaçu (Giudice Neto *et al.* 2015), Santa Bárbara (Melo & Durigan 2011) e Brasília (observações em campo); Montes Claros apresentou moderado estado de degradação (observações em campo); e Uberlândia (Cardoso *et al.* 2010), Serra Dourada (Miranda *et al.* 2015) e Serra dos Pireneus (Salmona *et al.* 2014) apresentaram melhor estado de conservação.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

3.2.1. Análises moleculares

Para os estudos de polimorfismo e diversidade genética nuclear foram coletadas folhas jovens de 192 indivíduos de sete populações de *Chrysolaena obovata* distribuídas em 4 estados do Brasil (Figura 5), sendo 20 indivíduos da população da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (MG/SP), 21 da Estação Ecológica de Santa Bárbara (SB/SP), 30 da Reserva Ecológica do Panga (UB/MG), 30 da Área de Proteção Ambiental Serra Dourada (SD/GO), 34 no

Campo Experimental Fazenda Sucupira (BRA/DF), 30 da população de Montes Claros (MC/MG) e 27 da Serra dos Pireneus (SP/GO) (Tabela 1), obedecendo uma distância mínima entre os indivíduos de 5 metros, visando evitar duas coletas correspondentes a um mesmo indivíduo. Esta distância foi estimada pelas observações em campo do crescimento do rizóforo, órgão responsável pela alta taxa de reprodução vegetativa da espécie, que é capaz de se alastrar horizontalmente sob o solo.

Um indivíduo de *C. obovata* foi escolhido ao acaso (indivíduo MG7 da população Mogi-Guaçu) entre os coletados, para obtenção do DNA a ser usado na construção de uma biblioteca enriquecida em *locus* microssatélites.

Para o ensaio de transferência dos microssatélites polimórficos de *C. obovata* para outras espécies de Asteraceae, durante as expedições de coleta foram coletadas folhas jovens de 45 indivíduos de 17 espécies de Asteraceae pertencentes a sete diferentes tribos, sendo 12 no Parque Estadual da Serra dos Pireneus – SP (GO), 9 no Parque Estadual da Serra Dourada – SD (GO), 15 na Estação Ecológica do Panga – UB (MG) e 9 na Estação Ecológica de Santa Bárbara - SB (SP). Além disso foram coletados 3 indivíduos da espécie *Smallanthus sonchifolius* (yacon), no canteiro do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica (Tabela 2).

Todos os indivíduos foram georeferenciados por meio de aparelho GPS (modelo GPSmap 62st, Garmin). O material vegetal coletado no campo foi transportado em sílica gel até o laboratório do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, onde foram pulverizados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento da extração do DNA.

3.2.2. Análises bioquímicas de frutanos

Para as análises bioquímicas de frutanos, desenvolvidas no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, foram coletados órgãos subterrâneos de reserva, rizóforos, de quatro indivíduos provenientes de quatro populações, totalizando 16 indivíduos, sendo que as plantas de duas populações se encontravam na fase vegetativa (Serra dos Pireneus e Serra Dourada) e duas na floração (Reserva Ecológica do Panga e Campo Experimental Fazenda Sucupira). Os rizóforos foram transportados até o laboratório onde foram lavados, e separados em amostras de regiões proximais e distais destes órgãos (Portes & Carvalho 2006), as quais foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até seu processamento.

Tabela 2. Localização geográfica dos indivíduos das 17 espécies da família Asteraceae amostrados para o estudo de transferabilidade.

Subfamília/Tribo <i>Espécies</i>	Localidade	N*	Coordenadas geográficas
Asteroidae/Coreopsidae			
<i>Bidens gardneri</i> Baker	SB/SP	3	22°47'13,90"S/49°14'19,00"O
Asteroidae/Eupatorieae			
<i>Chromolaena latisquamulosa</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob	SB/SP	3	22°47'13,90"S/49°14'19,00"O
Asteroidae/Gnaphalieae			
<i>Achyrocline</i> sp.	SB/SP	3	22°47'13,90"S/49°14'19,00"O
<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) D.C.	SP/GO	3	15°47'26,90"S/48°50'11,50"O
Asteroidae/Heliantheae			
<i>Aspilia foliacea</i> (Spreng.) Baker	UB/MG	3	19°10'55,70"S/48°23'34,60"O
<i>Dimerostemma vestitum</i> (Baker) S.F.Blake	SD/GO	3	16°04'10,10"S/50°10'51,60"O
<i>Helianthus tuberosus</i> L.	PEFI/SP	3	23°38'08,00"S/46°38'00,00"O
<i>Viguiera discolor</i> Baker	UB/MG	3	19°10'55,30"S/48°23'35,90"O
<i>Ichthyothere mollis</i> Baker	SP/GO	3	15°47'26,90"S/48°50'11,50"O
<i>Ichthyothere terminalis</i> (Spreng.) S.F.Blake	SP/GO	3	15°47'26,90"S/48°50'11,40"O
Asteroidae/Neurolaeneae			
<i>Calea platylepis</i> Sch.Bip. ex Baker	UB/MG	3	19°10'12,40"S/48°23'25,80"O
<i>Calea quadrifolia</i> Pruski & Urbatsch	SD/GO	3	16°04'09,40"S/50°10'51,80"O
Asteroidae/Polymnieae			
<i>Smallanthus sonchifolius</i> (Poepp) H. Robinson	PEFI/SP	3	23°38'08,00"S/46°38'00,00"O
Cichorioideae/Vernonieae			
<i>Chrysolaena simplex</i> (Less.) Dematt.	SP/GO	3	15°47'26,60"S/48°50'11,20"O
<i>Lessingianthus buddleiifolius</i> (Mart. ex DC.) H.Rob.	SD/GO	3	16°04'10,60"S/50°10'49,40"O
<i>Vernonia fagifolia</i> Gardner	UB/MG	2	19°10'13,00"S/48°23'27,20"O
<i>Vernonia ferruginea</i> (Less.)	UB/MG	1	19°10'54,10"S/48°23'39,70"O

*Número de indivíduos coletados (N); Estação Ecológica de Santa Bárbara – São Paulo (SB/SP); Parque Estadual da Serra dos Pireneus – Goiás (SP/GO); Estação Ecológica do Panga – Minas Gerais (UB/MG); Reserva Biológica e Estação Experimental Serra Dourada – Goiás (SD/GO); Parque Estadual das Fontes do Ipiranga - São Paulo (PEFI/SP).

3.3. ANÁLISES MOLECULARES

3.3.1. Extração do DNA

Foram testados diferentes protocolos e *kits* de extração visando escolher a metodologia adequada, que permitisse obter DNA em maior quantidade e de melhor qualidade para *C. obovata*. A extração do DNA foi realizada de acordo com método descrito por Allen *et al.* (2006), com algumas modificações, conforme descrito a seguir.

Foram utilizados 200 mg de material vegetal previamente macerado em nitrogênio líquido. Ao tecido macerado foram adicionados 1200 µL de tampão de extração (Anexo A) previamente aquecido a 65°C. Após a completa ressuspensão das amostras na solução, foi feita incubação em banho-maria a 65°C por 30 min, agitando os tubos manualmente a cada 10 min.

Após incubação, os tubos foram centrifugados a 13500 *g* por 10 min a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para novo tubo, ao qual foram adicionados 800 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), misturando por inversão e incubando por 20 min a temperatura ambiente. Após centrifugação a 13500 *g* por 10 min, os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos e foi adicionado igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), sendo os tubos centrifugados novamente a 13500 *g* por 10 min. Após centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos e o DNA foi precipitado com adição de 800 µL (2/3 do volume total) de isopropanol (-20°C), misturando os tubos por inversão e incubando por 1 hora a temperatura ambiente. Após incubação os tubos foram centrifugados a 13500 *g* por 10 min a temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuscitado em 250 µL de TE e tratado com 2,5 µL de RNase livre de DNase e incubado a 37°C por 30 min. Após incubação, foram acrescentados 25 µL de acetato de sódio 3M e 600 µL de etanol (-20°C), misturando-se por inversão e incubando a -20°C por 2 horas para precipitar o DNA. Os tubos foram centrifugados a 13500 *g* por 10 min a temperatura ambiente e os sobrenadantes foram descartados. O precipitado foi lavado duas vezes com 750 µL de etanol 70% (-20°C) por 5 min, centrifugando-se a 13500 *g* por 10 min. A seguir, o precipitado foi seco em câmara de fluxo laminar em temperatura ambiente durante a noite e ressuscitado em 50 µL de água ultrapura.

As amostras, juntamente com o padrão de peso molecular 1 Kb (Promega), foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1X (Anexo A), corado com GelRed® (Biotium), para avaliação da qualidade do DNA extraído. O DNA foi quantificado em nanofotômetro (Implen).

3.3.2. Construção da biblioteca genômica enriquecida com microsatélites

A construção da biblioteca foi realizada no Laboratório de Análise Genética e Molecular, CBMEG, UNICAMP, de acordo com o protocolo modificado de Billotte *et al.* (1999), conforme descrito a seguir. As principais etapas envolvidas na construção da biblioteca estão representadas na Figura 6.

3.3.2.1. Digestão do DNA

Aproximadamente 20 µg de DNA genômico foram digeridos pela enzima *AfaI* (antiga *RsaI*-Invitrogen) na concentração de 10U/µL, em uma reação contendo 10 µL de tampão de reação, 5 µL da *AfaI* e água ultrapura para completar o volume de 100 µL. A reação foi incubada a 37°C durante a noite. A digestão foi visualizada em gel de agarose 1% (p/v), usando 10 µL do DNA digerido e padrão de peso molecular 1Kb (Promega).

3.3.2.2. Ligação dos Adaptadores

Os adaptadores ligados aos fragmentos digeridos tiveram como finalidade garantir que todos tivessem uma terminação comum e conhecida. A ligação foi feita em reação contendo 2 µL do adaptador **Afa21** (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3') (IDT, Integrated DNA Technologies) e 2 µL do adaptador **Afa25** (5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'), 6 µL do DNA digerido, 4 µL de T4 DNA ligase (Invitrogen), 10 µL do tampão de reação (5X) e água ultrapura para completar volume de 50 µL. A reação foi incubada por 2 horas a 20°C.

3.3.2.3. Pré-Amplificação via PCR

Para aumentar a quantidade de fragmentos que foram ligados aos adaptadores e garantir que a ligação tenha ocorrido, foi feita uma pré-amplificação por PCR em termociclador (Eppendorf) utilizando 5 µL do produto da ligação, 5 µL de *Taq* DNA polimerase (3U), 2 µL de **Afa21** (10 µM) usada como iniciador, 4 µL dNTPs (2,5 mM), 1,5 µL MgCl₂ (50mM), 5 µL do tampão de reação 10X e água ultrapura para completar volume de 50 µL. A reação foi submetida a um ciclo inicial de 95°C por 4 min, seguido de 20 ciclos de 94°C por 30 segundos; 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e um ciclo final de 72°C por 8 min. Após a pré-amplificação, foi feita uma purificação do produto da amplificação em coluna, usando o *kit* Quiaquick PCR purification (Quiagen), a fim de preparar o DNA para a etapa de seleção dos fragmentos de interesse.

3.3.2.4. Seleção de fragmentos contendo microssatélites

A seleção dos fragmentos foi obtida por esferas magnéticas conjugadas com estreptavidina (Promega) e sondas biotiniladas, biotina-III(CT)₈ e biotina-III(GT)₈ (Promega), complementares às sequências repetitivas GA e CA. A solução de 600 µL de esferas magnéticas foi previamente lavada em tampão SSC 0,5X. Foram adicionados 400 µL de água ultrapura a 100 µL de DNA purificado e incubado a 95°C durante 15 min, para desnaturação das fitas. Após esse período, foram adicionados 13 µL de SSC 20X (Anexo A) e 3 µL de cada iniciador biotinilado (50 µM), mantendo a temperatura ambiente por 20 min, agitando lentamente a cada 2 min.

A mistura de DNA e adaptador foi adicionada a 100 µL de esferas pré-lavadas em tampão, incubando-se por 10 min à temperatura ambiente, agitando de forma suave e magnetizando por 30 segundos, para aspirar o sobrenadante e descartá-lo. Nessa etapa, os fragmentos selecionados foram recuperados pela estreptavidina conjugada às esferas, que em seguida foram ressuspensas em 300 µL de SSC 0,1X e magnetizadas para aspirar o sobrenadante. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes. Por fim, as esferas ligadas ao DNA foram ressuspensas em 100 µL de água ultrapura, magnetizada por 30 segundos, e o sobrenadante separado das esferas foi armazenado em um novo microtubo.

3.3.2.5. Amplificação dos fragmentos selecionados

Os fragmentos selecionados foram submetidos a uma reação de PCR em termociclador (Eppendorf), utilizando 20 µL dos fragmentos, 4 µL da **Afa21** (10 µM) usada como iniciador, 8 µL de dNTPs (2,5 mM), 6 µL de MgCl₂ (25 mM), 10 µL de tampão da reação 10X, 0,5 µL de Taq DNA polimerase e água ultrapura para completar um volume de 100 µL. A reação foi submetida a um ciclo inicial de 95°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 94°C por 40 segundos; 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 min, e uma etapa final de 72°C por 5 min.

3.3.2.6. Clonagem em vetor pGEM-T

Os fragmentos amplificados por PCR foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T (Promega), através de reação contendo 3 µL do produto da amplificação, 1 µL do plasmídeo, 1 µL da enzima ligase, 50 µL tampão de reação 2X e água ultrapura para completar volume de 10 µL. A reação foi incubada a 4°C durante a noite.

3.3.2.7. Transformação em células competentes e manutenção dos clones

Os fragmentos ligados ao vetor foram transformados por eletroporação em células competentes XL1-Blue, utilizando 2 µL da ligação e 40 µL das células competentes na cubeta de eletroporação.

Rapidamente foram adicionados 950 μL de meio SOC (Anexo A) e a seguir incubou-se a 37°C por 1 h. Após a incubação, 50, 100 e 150 μL de meio contendo as células ressuspendidas foram plaqueados em placa de Petri contendo meio LB sólido (Anexo A) contendo ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A cada uma das placas, foram adicionados 30 μL de IPTG (isopropil-tio- β -D-galactosídeo) (20% p/v) e 30 μL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo) (2% p/v). As placas foram incubadas por 16 a 20 horas a 37°C para o crescimento das colônias. Após incubação foram colocados em geladeira por 1-2 h para indução da coloração azul nas colônias não transformadas.

As colônias transformadas, de coloração branca, foram repicadas em microplacas de ELISA, contendo 150 μL de meio 2YT – HMFM (Anexo A) com ampicilina (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em cada poço. As placas foram seladas e mantidas a temperatura de 37°C durante a noite, em seguida em freezer -20°C por 30 min e armazenadas em freezer -80°C até o início da etapa seguinte.

3.3.2.8. Inoculação e extração do DNA plasmidial

Nessa etapa, o DNA plasmidial foi isolado das colônias recombinantes. Foram utilizadas placas de Elisa de 96 poços, contendo 2 μL de cada cultura bacteriana, 1 mL de meio Circle Grow (Anexo A) com 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina em cada poço. As placas foram seladas com adesivo, o qual foi furado com agulha sobre cada poço para permitir aeração, e incubadas a 37°C em agitador com rotação de 300 g durante 22 horas. Após esse período, a placa foi submetida à centrifugação a 3000 g por 6 min (20 °C) para sedimentação das células.

O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel absorvente por 1 minuto. Foram adicionados a cada poço 240 μL de meio GTE (Anexo A), as placas novamente seladas e as células ressuspendidas em agitador orbital por 2 min. Foi feita uma nova centrifugação à 4000 g por 6 min, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 60 μL de meio GTE + 5 μL de RNase (10 mg mL^{-1}), em cada poço, sendo a placa novamente selada e agitada por 5 min.

Em cada poço de uma nova placa do tipo ELISA, foram adicionados 60 μL de suspensão de células e 60 μL de NaOH 0,2M, contendo 1% de SDS. A placa foi selada e o conteúdo misturado por inversão. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 10 min, seguida de centrifugação a 1000 g. O adesivo foi retirado e a cada poço foram adicionados 60 μL de KOAc 3M a 4°C. A placa foi novamente selada com adesivo, agitada por inversão 10X e submetida a uma centrifugação de 1000 g. A placa foi incubada em estufa a 90°C por 30 min. Após esse período, a placa foi resfriada em gelo por 10 min e centrifugada a 4000 g por 4 min.

Uma placa filtro foi fixada sobre a placa ELISA, seguindo o alinhamento dos poços, com auxílio de fita adesiva. Todo o volume da placa ELISA usada anteriormente, foi transferido para a placa

filtro e centrifugada a 4000 *g* por 4 min a 20°C. A placa filtro foi removida e descartada e, ao filtrado, foram adicionados 90 µL de isopropanol. A placa foi selada com adesivo e agitada por inversão 20X, sendo centrifugada a 4000 *g* por 45 min, a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e foram adicionados a cada poço 160 µL de etanol 70% (v/v) gelado. A placa foi centrifugada por 10 min a 4000 *g* a 4°C, descartando novamente o sobrenadante e invertendo a placa sobre papel absorvente. Foi feita uma centrifugação a 300 *g* com a placa invertida, seguida de secagem a temperatura ambiente por 60 min ao abrigo da luz. Decorrido esse tempo, foram adicionados 30 µL de água ultrapura a cada poço, deixando a placa à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante a noite, seguido de armazenamento a -20°C.

3.3.3. Sequenciamento de clones da biblioteca genômica

3.3.3.1. Preparo da reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foram utilizados 3 µL do DNA plasmidial, 0,4 µL do *kit* Big Dye (v. 3.1, Applied Biosystems), 0,5 µL do iniciador universal SP6 (5 pmol) ou do iniciador universal T7 (5 pmol), 2 µL de tampão de reação e água ultrapura para um volume final de 10 µL. A reação foi inicialmente submetida a um ciclo inicial de 95°C por 2 min, seguida de 26 ciclos de 95°C por 45 segundos; 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 min, sendo armazenada a -20°C.

3.3.3.2. Purificação e preparo das amostras para o sequenciamento

Foram adicionados 80 µL de isopropanol 65% (v/v) em cada poço da placa para precipitação das amostras da reação de sequenciamento, deixando a placa em repouso durante 15 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, a placa foi centrifugada a 4000 *g* por 45 min a 20°C e o sobrenadante descartado cuidadosamente. Foram adicionados 200 µL de etanol 70% (v/v) gelado em cada poço. A placa foi centrifugada a 4000 *g* por 5 min a 20°C e o sobrenadante descartado. Posteriormente, foi feita uma centrifugação a 250 *g*, com a placa invertida em papel toalha. A placa foi deixada em temperatura ambiente, protegida da luz por 1 hora para secar.

3.3.3.3. Sequenciamento

O DNA foi ressuspendido em 4 µL de formamida deionizada (Hi-Di, Applied Biosystems). Antes do sequenciamento, as amostras foram desnaturadas em termociclador, a 90°C por 3 min, e colocadas sobre gelo por 5 minutos. Foram sequenciados 60 clones da biblioteca genômica em sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA) no Laboratório de Análise Genética e Molecular, CBMEG, UNICAMP, Campinas, São Paulo.

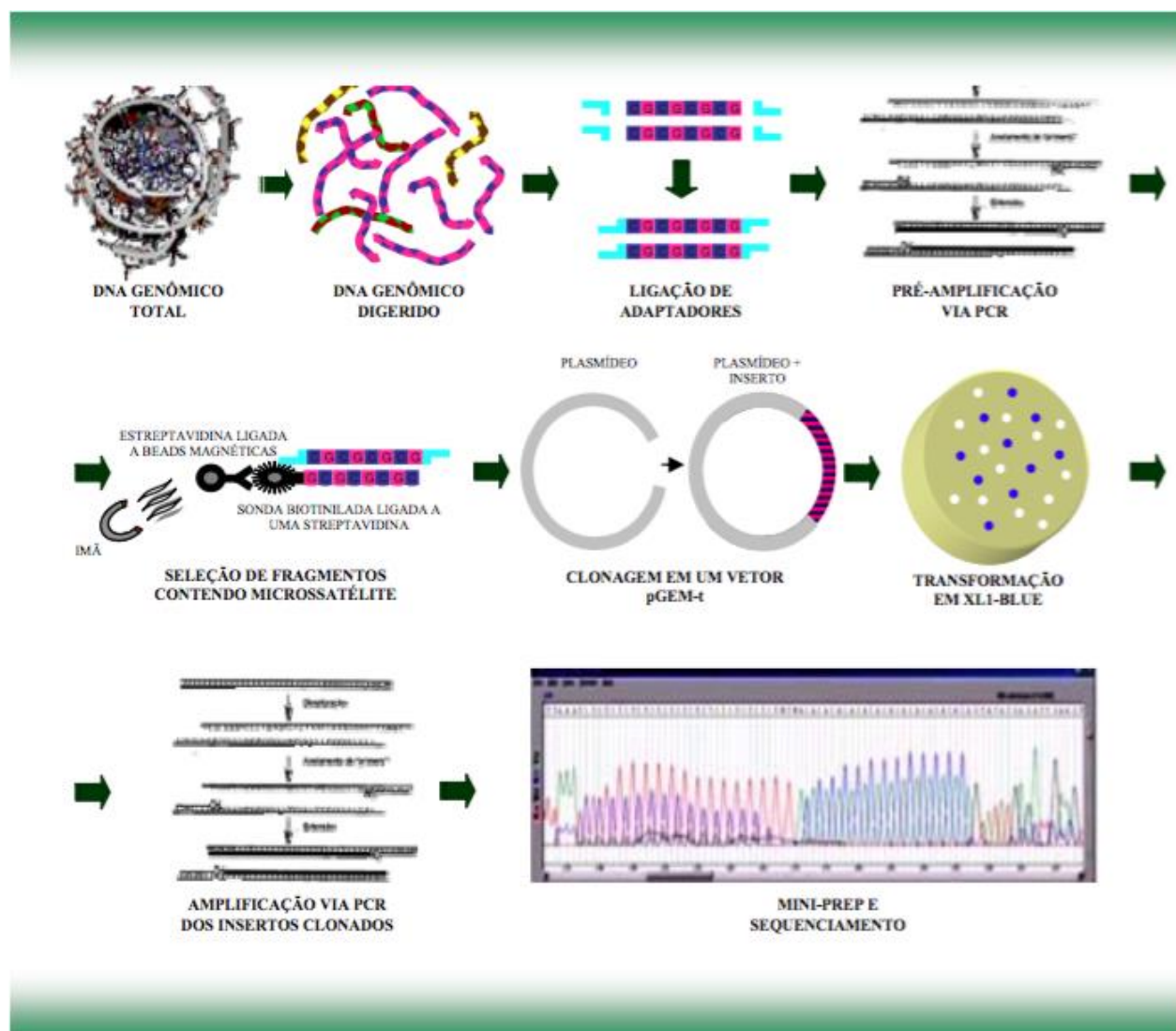


Figura 6. Principais etapas envolvidas na construção da biblioteca enriquecida em microssatélites. Fonte: NUCCI, 2007 – adaptado por Gonçalves (2011).

3.3.4. Edição de sequências, identificação de microssatélites e desenho dos iniciadores

3.3.4.1. Edição das sequências

As sequências obtidas foram inicialmente editadas usando *BLAST VecScreen tool* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), onde foram eliminadas as sequências dos vetores SP6 e T7 utilizados durante o processo de sequenciamento. A seguir foram editadas as sequências de baixa qualidade e transformadas em formato “FASTA” no programa “*Chromatogram_explorer*” e em seguida foram submetidas ao programa CAP3 (Huang & Madan 1999), para obtenção de uma sequência consenso a partir das sequências “direta” e “reversa”. Para confirmar que as sequências

obtidas são da espécie em estudo sem contaminação com DNA de outros organismos, as sequências foram comparadas com sequências disponíveis na base de dados do NCBI com o auxílio da ferramenta Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.3.4.2. Identificação de microssatélites

As sequências obtidas foram submetidas à ferramenta “Simple Sequence Repeat Identification Tool (SSRTIL)” do Projeto Gramene (www.gramene.org/db/markers/ssrtool), para a identificação de regiões contendo microssatélites. Os parâmetros utilizados foram número máximo de cinco e número mínimo de três repetições.

3.3.4.3. Desenho dos iniciadores de microssatélites

Após a identificação dos microssatélites foi utilizado o programa Primer3 na Web (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para desenhar os iniciadores que flanqueiam a região contendo microssatélites. Os parâmetros utilizados para desenho dos iniciadores foram: produto de amplificação entre 150-300 pb, tamanho dos iniciadores entre 18-22 pb, conteúdo de GC entre 40-60% e a diferença máxima de temperatura entre cada par de iniciador de 3°C.

O programa Gene Runner v.3.05 (<http://www.generunner.net/>) foi utilizado para confirmar os valores dos parâmetros citados anteriormente e avaliar a qualidade dos iniciadores desenhados, identificando a formação de estruturas secundárias indesejadas entre os pares de iniciadores.

3.3.5. Amplificação do DNA

Os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR em termociclador (Eppendorf). Para a otimização das temperaturas de anelamento (T_a) dos 42 pares de iniciadores desenhados foram feitas amplificações com gradientes de temperatura, utilizando o seguinte programa básico: desnaturação inicial 95°C por 3 min, seguida de 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, variação de T_a de 50°C a 65°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, seguido de alongamento final a 72°C por 5 min. As reações foram padronizadas para todos os iniciadores, variando a temperatura de anelamento e, quando necessário, as concentrações de DNA e $MgCl_2$.

Para as reações de PCR, foram utilizados os DNAs de 4 indivíduos escolhidos ao acaso de duas populações (MG e MC) na seguinte reação: 4 µL de tampão de reação 5X, 1 µL de $MgCl_2$ 25 mM, 0,75 µL do mix de dNTPs 0,12 mM cada, 0,5 µL de cada um dos primer SSRs (0,24 pmol), 0,5 µL de DNA (50 ng μL^{-1}), 0,15 µL de GoTaq® Flexi DNA Polymerase 5U μL^{-1} (Promega) e 12,6 µL de água ultrapura. Após a reação de PCR, os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com Gelred®, utilizando marcador ladder 1kb Plus (Promega) como

referência para o tamanho dos fragmentos gerados. O gel foi visualizado e fotografado em fotodocumentador (Loccus).

Após a seleção dos iniciadores polimórficos, estes foram amplificados nos 48 indivíduos pertencentes às 17 espécies de Asteraceae nas mesmas condições de PCR utilizadas para *C. obovata*. Um locus foi considerado como tendo sucesso na amplificação quando pelo menos uma banda do tamanho esperado foi claramente visualizada em gel de agarose 1,5% (p/v) corado com Gelred®, em pelo menos um indivíduo de uma espécie.

3.3.6. Genotipagem

A determinação da variabilidade alélica intra e interpopulacional foi realizada por genotipagem, na qual um dos iniciadores foi marcado com fluoróforo (IR700 ou IR800) visando a posterior detecção por sistema de sequenciamento automático (Li-Cor 4300).

Para cada um dos 33 iniciadores com produto específico, um iniciador M13 (20pb) (**CACGACGTTGTAAAACGACA**) foi ancorado à extremidade 5' do iniciador direto, segundo metodologia de Schuelke (2000) (Figura 7A). Para a incorporação da fluorescência foi feita uma pré-amplificação por PCR em termociclador (Eppendorf) utilizando 1 µL de DNA (25ng/µL), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (1U), 1 µL de cada iniciador direto e reverso (10 µM), 1 µL dNTP (2,5 mM), 1 µL MgCl₂ (50mM), 4 µL do tampão de reação 5X e água ultrapura para completar volume de 20 µL. A reação foi submetida a um ciclo inicial de 94°C por 4 min, seguido de 26 ciclos de 94°C por 1 min; Ta específica do iniciador (Tabela 4) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e um ciclo final de 72°C por 5 min. As amostras, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1X (Anexo A), corado com GelRed® (Biotum), para confirmar a amplificação.

Em seguida, foi feita uma segunda PCR, na qual foi colocado o iniciador reverso específico (Fig. 7B), e o iniciador universal-fluorescente etiquetado M13 marcado com fluoróforo (IR800 ou IR700) (Fig. 7C). Utilizando 1,5 µL de produto da pré-amplificação, 0,2 µL de *Taq* DNA polimerase (1U), 0,05 µL do iniciador direto modificado com a M13(-20) (10 µM), 0,2 µL do iniciador reverso (10 µM), 0,2 µL do iniciador com fluorescência (10 µM), 1 µL dNTP (2,5 mM), 1 µL MgCl₂ (50mM), 4 µL do tampão de reação 5X e água ultrapura para completar volume de 20 µL. As condições de amplificação foram delineadas de forma que durante os primeiros 35 ciclos, o iniciador direto com seu M13(-20) avance e se incorpore na sequência dos produtos PCR amplificados (Fig. 7D). Um ciclo inicial de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos; Ta do iniciador por 45 segundos (Tabela 4) e 72°C por 45 segundos. Posteriormente, quando todo o iniciador direto com M13(-20) já estava anelado à sequência alvo, a temperatura foi diminuída para 53°C para facilitar a incorporação do iniciador universal M13 (-20) com fluorescência (Fig. 7E), sendo oito

ciclos de 94°C por 30 segundos; 53°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, e um ciclo final de 72°C por 10 min. obtendo os produtos para genotipagem (Fig. 7F). Estes produtos foram verificados em gel de agarose 1% (p/v) antes das análises de sequenciamento no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Os dados de saída foram analisados usando-se o programa SAGA®.

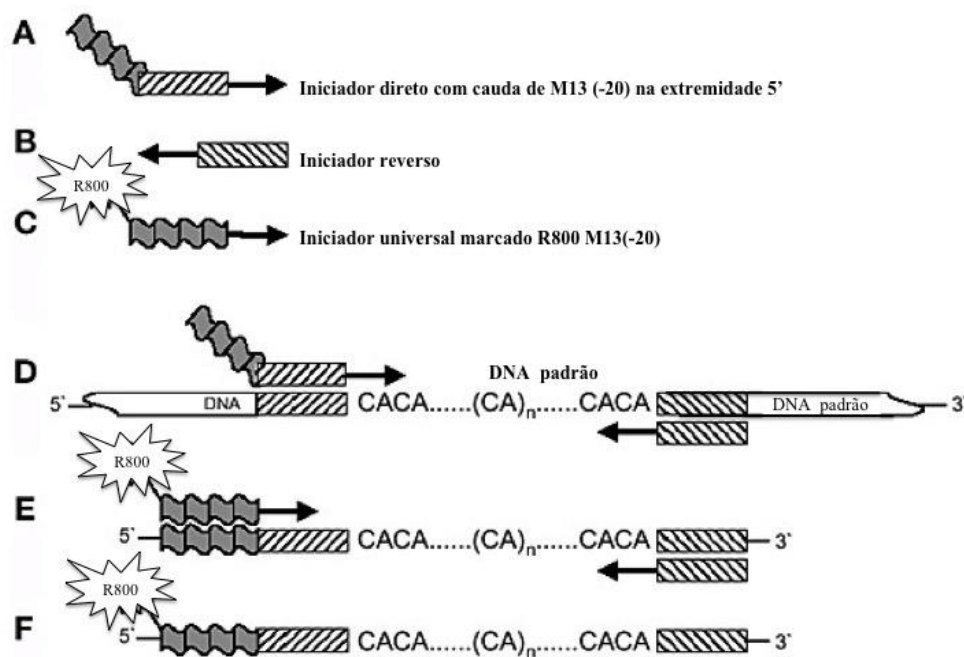


Figura 7. Metodologia para a inclusão da fluorescência dos iniciadores (adaptado de Schuelke 2000).

Os 33 pares de iniciadores que amplificaram produtos do tamanho desejado foram inicialmente avaliados em 24 indivíduos de 5 populações para determinação do polimorfismo. Destes, foram selecionados 9 *loci* polimórficos que foram utilizados para o estudo populacional completo de *Chrysolaena obovata* (192 indivíduos de 7 populações) e para o ensaio de transferência nas 17 espécies de Asteraceae.

3.3.7. Análises de dados

3.3.7.1. Caracterização da diversidade genética das populações

As estimativas da diversidade genética: heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_E), porcentagem de *loci* polimórfico (P), foram calculados pelo programa POPGENE versão 1.3.2 (Yeh & Boyle 1997).

A riqueza alélica corrigida para o tamanho amostral (Ar) foi calculada mediante a técnica estatística de rarefação para minimizar o efeito do tamanho amostral no cálculo do número de alelos

de cada população utilizando-se o programa HP-RARE 1.0 (Kalinowski 2005). Além disso, foram considerados alelos raros os alelos com frequência menor que 0,05. Foram considerados alelo privados ou exclusivos os que ocorreram em apenas uma população, independentemente de sua frequência.

O número de alelos por *locus* (N_A) por população foi calculado pela soma de alelos para todos os *loci* polimórficos e dividido pelo número total de *loci*, no programa POPGENE versão 1.3.2 (Yeh & Boyle 1997). O número efetivo de alelos por *locus* (N_E) por população foi calculado utilizando-se o programa POPGENE versão 1.3.2 (Yeh & Boyle 1997) pela equação:

$$N_E = 1/\sum p_i^2,$$

onde p_i é a frequência média do alelo i .

A diversidade genética de cada população (H) foi calculada no programa POPGENE versão 1.3.2 (Yeh & Boyle 1997) como a média aritmética dos valores da diversidade genética para cada *locus* empregando a seguinte equação:

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

A presença e frequência de alelos nulos foram calculadas no programa MicroChecker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). A frequência nas populações foi calculada utilizando o estimador de Brookfield (1996, *apud* Van Oosterhout *et al.* 2004) e suas significâncias estatísticas foram calculadas utilizando o método de Fisher (Van Oosterhout *et al.* 2004).

O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) (Botstein *et al.* 1980), refere-se ao potencial de um marcador em detectar polimorfismo dentro de uma população ou grupo de indivíduos. Este índice depende do número de alelos detectáveis e da distribuição das frequências alélicas. Tem sido muito utilizado para inferir quão informativo é um marcador. Foi calculado no programa Excel Microsatellite Toolkit (MSTOOLS) (Park 2008) empregando a seguinte equação:

$$PIC = 1 - \sum_{j=1}^n (P_{ij})^2$$

onde P_{ij} é a frequência do alelo j no marcador i .

3.3.7.2. Estrutura genética das populações

Equilíbrio de Hardy-Weinberg e estatística básica

Os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HEW) dentro e entre populações, estatística-F (Wright 1965); distância genética de Nei (1972) foi calculada utilizando o programa POPGENE versão 1.3.2 (Yeh & Boyle 1997). A significância das estatísticas F (Wright 1965) foi testada com 1000 reamostragens *bootstrap* no programa Genetix 4.03 (Belkhir *et al.* 2000).

Usando o programa PRIMER v5 (Clarke & Gorley 2001) foi realizada uma análise de escalonamento multidimensional (MDS), a fim de obter representação gráfica dos F_{ST} entre pares de populações. O valor de *stress* obtido permite avaliar se as distâncias originais estão mal ou bem representadas. Segundo Clarke & Warwick (1994), valores de *stress* até 0,1 indicam uma ótima representação, entre 0,1 e 0,2 evidenciam uma certa distorção das distâncias porém em níveis aceitáveis, e acima de 0,3 indicam que não estão sendo úteis para explicar os dados (Clarke & Warwick 1994).

O fluxo gênico indireto (N_m) foi calculado utilizando o programa POPGENE versão 1.3.2 (Yeh & Boyle 1997). Além disso, as estimativas de fluxo gênico aparente entre as populações e o valor do número de migrantes por geração foram estimados indiretamente a partir de sua relação inversa com F_{ST} , utilizando a equação proposta por Crow & Aoki (1984):

$$N_m = 1/4\alpha \ ((1/F_{ST})-1).$$

onde, $\alpha = (n/(n-1))^2$ sendo n o número de populações e N_m o número de migrantes.

A conectividade histórica entre as populações foi medida por estimativa das taxas de migração por geração entre elas, usando o software *Migrate-n* versão 3.2.1 (Beerli & Felsenstein 2001). O software usa uma estrutura de probabilidade máxima com base na teoria de coalescência e investiga possíveis genealogias com eventos de migração usando abordagem com cadeia de Markov Monte Carlo (Beerli & Felsenstein 2001). Para calcular o número de migrantes por geração (N_{em}) entre as sete populações de *C. obovata*, os parâmetros Θ ($\Theta = N_e\mu$) e M ($M = m/\mu$, onde μ é a taxa de mutação e m a taxa de migração) foram obtidos utilizando o modelo de movimento browniano contínuo (Beerli & Felsenstein 2001) com as opções padrão, empregando-se o modelo completo (*full model*) e assumindo taxas de mutação iguais entre loci. Os valores iniciais do tamanho populacional efetivo e fluxo gênico foram estimados a partir do valor de Θ_{st} . Cada corrida foi composta de 20 cadeias curtas, quatro cadeias longas com um milhão de passos e *burn-in* de 50000 (Beerli & Palczewski 2010). Para obter o valor de N_{em} (número de migrantes por geração), Θ ($\Theta = N_e\mu$) foi multiplicado por M ($M = m/\mu$) (Beerli 2009).

Análise de gargalo genético

O programa BOTTLENECK (Piry *et al.* 1999) foi utilizado para detectar reduções recentes no tamanho efetivo populacional, tendo sido testado se as populações se encontram em equilíbrio entre mutação e deriva genética. As análises foram processadas utilizando dois modelos de mutação independentes: i) Modelo de Passos de Mutação (SMM) (Ohta & Kimura 1973) e ii) Modelo de Duas Fases (TPM) (Di Rienzo *et al.* 1994), por serem os mais apropriados para *locus* microssatélites (SSR). Para o modelo TPM considerou-se 10% da variância e 85% das mutações dos alelos inseridos no modelo SMM, segundo metodologia de Cornuet & Luikart (1996).

O programa prova a hipótese de $H_e > H_{eq}$ sob os modelos SMM e TPM, sendo H_e = heterozigosidade esperada calculada a partir das frequências alélicas e H_{eq} = heterozigosidade esperada no equilíbrio entre mutação e deriva calculada a partir do número de alelos. A significância do excesso de diversidade gênica ($H_e > H_{eq}$) foi avaliada através do teste de significância de Wilcoxon, por ser o mais robusto quando são utilizados menos de 20 *loci* nas análises (Piry *et al.* 1999), baseando-se em 5000 reamostragens para os dois modelos testados.

Análises de IBD (Isolation By Distance) ou correlação entre a distância genética e distância geográfica.

As análises do IBD foram realizadas com o teste de Mantel e sua significância foi testada com 9999 reamostragens usando o programa Arlequin 3.0. (Excoffier *et al.* 2005). Neste teste se correlacionam a distância genética de Nei (1972) e as distâncias geográficas das populações calculadas em quilômetros, o que foi feito utilizando as coordenadas geográficas no site do Centro Nacional de Furacões dos EUA (<http://www.nhc.noaa.gov/gccalc.shtml>).

Análises das relações genéticas entre as populações

As análises das relações genéticas entre as populações foram realizadas utilizando o método de *Neighbor joining* (NJ) com 10000 reamostragens. Este método baseou-se nas distâncias genéticas de para a construção de uma árvore filogenética que representa a similaridade genética entre as diferentes populações, usando o programa PHYLIP versão 3.5 (Felsenstein 1993). Para visualizar a árvore consenso foi utilizado o programa FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk>).

A análise das relações genéticas entre os indivíduos foi realizada através de uma análise de coordenadas principais (PCoA) para todas as populações, usando o programa GenAlEx 6 (Peakall & Smouse 2006).

Distribuição da diversidade genética nas populações

A distribuição da diversidade genética nas populações foi analisada pelo método de Análises da Variância Molecular (AMOVA) pelo programa ARLEQUIN versão 3.0. (Excoffier *et al.* 2005), sendo que a significância dos componentes de variação foi testada com 9999 reamostragens. Inicialmente a variância foi subdividida em intra-populacional e inter-populacional. Adicionalmente, realizou-se a análise subdividindo as populações de acordo com a fitofisionomia (cerrado *sensu stricto* e campos rupestres). O método utilizado nessas análises consiste na transformação dos dados binários em uma matriz de distâncias quadradas entre os diferentes pares de genótipos, para posterior avaliação por análise de variância.

Para explorar a estrutura genética populacional foi realizada a análise espacial de variância molecular (SAMOVA), visando definir os grupos populacionais que estão geograficamente homogêneos e determinar o máximo de diferenças existentes entre umas e outras. Esta análise foi realizada no programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.* 2002).

A atribuição de cada indivíduo a uma população, com base no seu genótipo, foi feita no programa *Structure* v.2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000). Este programa identifica os grupos de indivíduos geneticamente similares de acordo com seus genótipos *multilocus*, sem conhecimento prévio de suas afinidades na população. O modelo supõe *K clusters* genéticos, e cada um tem um conjunto característico de frequências dos alelos de cada *locus*. Para a determinação do número de *cluster* (*K*) baseada somente nos dados genotípicos *multilocus*, foram realizadas dez simulações independentes para cada *K* número de agrupamentos (*K* variando de 1 a 12), considerando o modelo de frequências alélicas correlacionadas e o modelo *no admixture* de ancestralidade, com 500.000 interações da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) com um descarte inicial (*burn-in*) de 250.000 interações. As análises foram inicialmente feitas sem *a priori* em relação à população. A partir destes dados iniciais, foi determinado o valor mais provável de *K* (a probabilidade mais alta *a posteriori*) mediante o cálculo de ΔK (Evanno *et al.* 2005), com auxílio do aplicativo *on-line Structure Harvester* (Earl & Vonholdt 2012). O programa CLUMPP v. 1.1.2b (Jakobsson & Rosenberg 2007) foi usado para analisar a estabilidade entre as dez simulações para o valor mais provável de *K* determinado.

3.4. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.4.1. *Análise de carboidratos solúveis*

3.4.1.1. *Extração e quantificação*

Após a coleta, o material foi separado, lavado em água corrente, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até o momento das análises. Amostras congeladas dos segmentos proximais e distais de rizóforos foram liofilizadas e pesadas para a determinação da massa seca. As amostras foram pulverizadas em almofariz, e 500 mg foram submetidos à extração de carboidratos conforme descrito por (Carvalho *et al.* 1998), com modificações. As amostras foram extraídas em etanol 80% (v/v) (15 mL) e incubadas em banho-maria a 80°C por 15 min, sendo a seguir centrifugadas a 700 g por 15 min. Os precipitados foram submetidos a duas extrações adicionais em etanol 80% (v/v), nas condições descritas acima. Os sobrenadantes etanólicos foram reunidos e reservados. Os resíduos finais foram extraídos duas vezes em água (10 mL) a 60°C por 30 min e filtrados a vácuo. Os sobrenadantes etanólicos e os filtrados aquosos foram reunidos, filtrados em tecido de algodão e concentrados em evaporador rotatório até o volume de 20 mL, constituindo o extrato bruto. A seguir, 10 mL do extrato bruto foram submetidos à precipitação a frio em três volumes de etanol, e as frações de fruto-oligossacarídeos (sobrenadante) e fruto-polissacarídeos (precipitado) foram separadas por centrifugação a 2900 g por 15 min a 4°C . O sobrenadante foi concentrado em evaporador rotatório até eliminação completa do etanol, e o precipitado foi ressuspendido e solubilizado em água. Os conteúdos de frutose livre e combinada foram determinados no extrato bruto e nas frações de fruto-oligossacarídeos e fruto-polissacarídeos, separadamente, pelo método de antrona modificado para cetoses (Jermyn 1956), sendo as leituras em espectrofotômetro realizadas em comprimento de onda de 620 nm, utilizando frutose livre ($200\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) como padrão. O conteúdo de açúcar redutor nas frações de fruto-oligossacarídeos foi determinado de acordo com o método de Somogyi (1945), sendo as leituras em espectrofotômetro realizadas em comprimento de onda de 595 nm, usando frutose como padrão.

3.4.1.2. *Identificação de açúcares solúveis*

Para as análises qualitativas, amostras provenientes de três réplicas dos diferentes extratos (fração bruta, fruto-polissacarídeos e fruto-oligossacarídeos) de cada população foram unidas para obter uma amostra composta, e submetidas à deionização em colunas de troca iônica, contendo resinas nas formas catiônica (Dowex 50 WX8 - 100) e aniônica (Dowex 1 X 8 -100) (Carvalho & Dietrich 1993). Posteriormente, as amostras neutralizadas foram analisadas por cromatografia de

troca aniônica de alta resolução com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em cromatógrafo Dionex modelo ICS-3000, em coluna CarboPac PA1 (2 x 250 mM), na concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em equivalente de frutose e o fluxo aplicado foi de 1mL min^{-1} . A eluição dos carboidratos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio) com a seguinte programação: 0-2 min, 25 mM; 2,1-8 min, 50 mM; 8,1-8,5 min, 75 mM; 8,6-10 min, 100 mM; 10,1-28 min, 450 mM; 28,1-30, 500 mM; 30,1-40, 25mM. Foram utilizados padrões externos de frutose, glucose, sacarose, 1-cestose e nistose.

3.4.2. *Análises de dados*

Para a comparação dos dados quantitativos de carboidratos solúveis foi realizada uma análise de variância de um fator utilizando o programa ASSISTAT (www.assistat.com), e aplicando o teste de Tukey a 5% de significância, comparando entre as populações cada segmento dos rizóforos (proximal e distal). Dados de ambos segmentos também foram comparados entre si em cada população.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DOS MARCADORES

Dos 60 clones da biblioteca genômica de *Chrysolaena obovata* submetidos ao sequenciamento, foram obtidas 48 sequências consenso, sendo que em 45 delas (93,8%) foi detectada a presença de regiões repetitivas. A frequência do tipo de motivo repetitivo e sua distribuição foi de 64 dinucleotídeos (85,3%), 6 trinucleotídeos (8,0%) e 5 compostos (6,7%). Por sua vez, 63 (84%) foram sequências repetitivas perfeitas e 12 (16%) imperfeitas (Tabela 3). Os microssatélites de *C. obovata* foram compostos, em sua maioria, pelas repetições CA/AC (23%), TG/GT (23%) TC/CT (17%), AT/TA (12%), coincidente com os motivos da sonda utilizada na seleção, enquanto os motivos AT/TA (12%) GC/CG (9%), AG/GA (1%), foram menos frequentes nas regiões dos microssatélites (Figura 8).

Tabela 3. Frequência e tipo de motivos repetitivos encontrados nas regiões microssatélites.

Tipo de Motivo	Número de microssatélites	Frequência (%)
Perfeitas		
Dinucleotídeo	57	76,00%
Trinucleotídeo	6	8,00%
Total	63	84,00%
Imperfeitas		
Dinucleotídeo	11	14,67%
Trinucleotídeo	1	1,33%
Total	12	16,00%

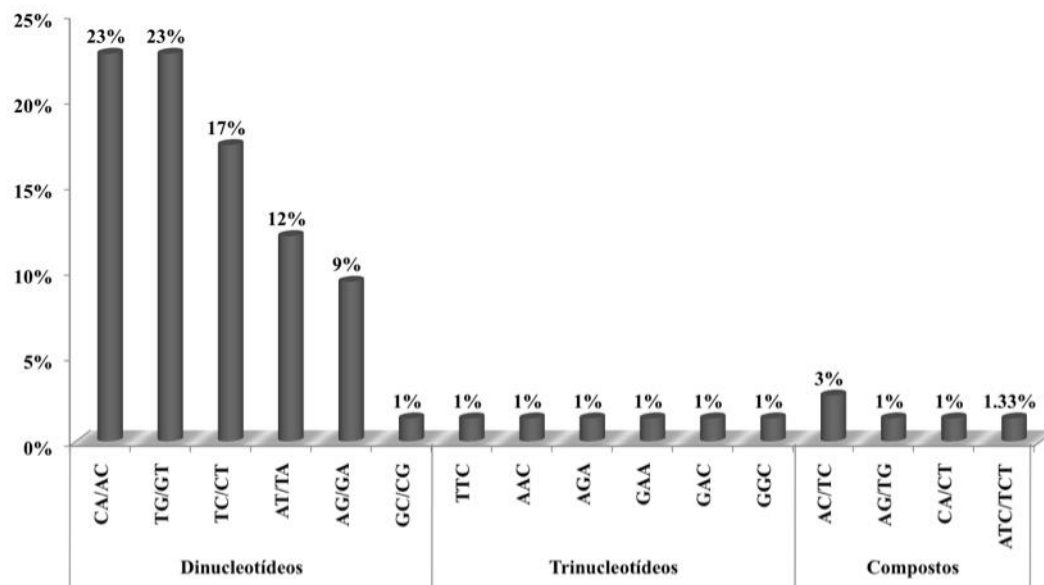


Figura 8. Frequências dos diferentes motivos de repetições nas regiões microssatélites

Foram desenhados e sintetizados 42 pares de iniciadores específicos e complementares às sequências que flanqueiam as regiões repetitivas, sendo que 33 deles (78,6%) apresentaram boa amplificação em uma faixa de temperatura de anelamento entre 55 e 60°C. Oito iniciadores amplificaram somente fragmentos inespecíficos e um não amplificou nenhum fragmento (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização das sequências microssatélites de *Chrysolaena obovata*.

Clone-Locus	Sequência microssatélite	Iniciadores 5' - 3'	Ta (°C)	Tamanho fragmento (pb)	Range de alelos (pb)	Amplificação	No. de Acesso no Genbank
C4	(CA)3	F: GGGCTTTGATCTTCCTTCCT R: GCGGGATTAGAGAGAGGTGA	50	114		Monomórfico	KR920053
C5	(AC)3(TC)17	F: GATCGTGTGTGTGCCTTCTC R: CGATGGAAGTGGGGTGTGT	50	274		Fragmentos Inespecíficos	KR920054
C6	(GC)3	F: CGCCGTGCGTATTCTTT R: CCAACGAACACACACTCA	55	115		Monomórfico	KR920055
C7	(AC)9 (TC)3	Não foi possível desenhar os iniciadores, os microssatélites estão nos extremos da sequência					
C8	(TG)5 (CA)14	F: TCCGAAGTTCGTGATTTCTTG R: CATGAATTGCTTGAATTGG	55	299		Fragmentos Inespecíficos	KR920056
C9	(TG)3	Não foi possível desenhar os iniciadores, os microssatélites estão nos extremos da sequência					
C11	(TG)5	F: CGGGATGGCTACATTAGGG R: GCGTTGTCCCTAGTGGTGAT	55	287		Fragmentos Inespecíficos	KR920058
D1	(CA)5CGG(CA)5	F: ATGAAGTCCACCTGCCAAGA R: ACACAACGTGAGGTGAACCA	55	142		Fragmentos Inespecíficos	KR920060
D2	(AC)3 (TC)3	F: ATCGAAGAAGGGGAGTC R: CTGACTTCCGGATCCTTT	55	276		Monomórfico	KR920061
D3	(TG)4CGCCG(TG)5 (TG)5	F: CTCTGTAAAGAGAGGGTGAG R: GTGAGTTCCTGTGATCTTGG	55	243		Fragmentos Inespecíficos	KR920062
D4	(TTC)3	F: GATAGCCTGAACGAAGTTC R: ATTAGCACCAGCCGAGAT	55	266		Monomórfico	KR920063
D5	(TA)3	F: AGAATCGGGCCTAAATCA R: CTTGAGCCTTATTTGAAG	55	134		Monomórfico	KR920064
D6-SSR1	(TA)6	F: CACAGGGACGATTTGAAG R: GTGTGTGGGTGTGTGTGAT	55	210		Monomórfico	KR920065
D6-SSR2	(TA)6 (CA)4CC(CA)4	F: TGGAAGAAGTGTGGAAGC R: GGGAGGATTGTGAGATCC	55	299		Monomórfico	KR920065
D7	(GT)7	F: GAAGCATTAAAGCCAGAAGTC R: GCAATTAGATCTTCATGTATCC	55	166		Monomórfico	KR920066
D9	(CT)3	F: GAAAGACTCACAGCTTGCTC R: GGGCAAACCTGTTTCAGT	50	208		Monomórfico	KR920068
D10	(CA)2TA (CA)5(CT)4 (CT)4	F: GGGGAGAAATGTTGTTGTTA R: CGTGTATGAATCTGTGATAACTC	60	215		Monomórfico	KR920069
D11	(TC)3 (AAC)3	Não foi possível desenhar os iniciadores, os microssatélites estão nos extremos da sequência					
D12	(GT)8	F: GAAGAACAACGAACAAACAAAA R: CGGTTGTAATTGGGTTGACT	60	210		Monomórfico	KR920070
E2-SSR1	(AC)3 (CT)3	F: GGGCCAAGAAATAAGAGAAG R: CGAAAGTAAGCGAATTCAGG	55	303		Fragmentos Inespecíficos	KR920071
E2-SSR2	(CA)3	F: GGGCCAAGAAATAAGAGAAG R: CGGGATTAGAGAGAGGTGA	50	253		Monomórfico	KR920071
E4	(AGA)3 (GAA)3	F: TCTACTTCGCACAACCTGC R: AACACCAACTGTGCCATC	55	150		Fragmentos Inespecíficos	KR920072
E6	(TC)3 (TC)4	F: CCGAGGCTACTTTGTATGAG R: GAGAGAAGCCGTAGAAGTGT	55	266		Fragmentos Inespecíficos	KR920074
E7	(AC)3T(AC)3	F: GTAGATCTTGCCAGTCGT R: TATTGGTGGCCTGGTATG	55	282		Monomórfico	KR920075
E8	(AT)3	F: CGGACATGTCGACTACAA R: GGCTAGAGGGTCAAGAAAC	55	100		Monomórfico	KR920076
E11	(AC)12 (TC)21 (TG)4 (TA)4 (GA)3 (AT)3	F: CTTTGTTCCTCTGCTGTCA R: TATCCATTCGGTTCGTGACT	55	246		Monomórfico	KR920077

Clone-Locus	Sequência microsatélite	Iniciadores 5' - 3'	Ta (°C)	Tamanho fragmento (pb)	Range de alelos (pb)	Amplificação	No. de Acesso no Genbank
F3-SSR1	(GA)3	F: GAGACGAATCAATCAGAAGC R: ATACATGCATCCAAACTTCC	55	221		Monomórfico	KR920078
	(TC)3						
	(AC)3						
	(GA)3						
F7	(TA)5	F: GGCCGGCCTACTATGTTAT R: GAAGACTCTTGGCGGTTTAC	55	286		Monomórfico	KR920082
	(CA)3						
	(GT)5						
	(TG)5						
F8-SSR1	(CA)3	F: GCACCATATCCACCAAGAAG R: GGAGATGGGAGAGGGACTAT	55	277		Monomórfico	KR920083
	(GA)3						
	(AT)4						
	(TC)4						
F8-SSR2	(ATC)6 C (TCT)3	F: CAGCGCACTGTAAAATCC	55	260		Monomórfico	KR920084
	(GAC)3	R: CAATCGGTTCTTCACGTC					
F10	(TC)3	F: CAGACTTTTCACATGGAGAC	55	247		Monomórfico	KR920085
		R: TGTATGTGTGTGTGTGTGTG					
Vh6	(AC)4	F: TGTGTCGACGACCGATT	55	221		Monomórfico	KR920086
		R: GCTCGAAGACGTCACAAAAG					
Vh7	(AC)4TA(AC)4	F: ACAGAACCCCGGAGAAGATT	60	275		Monomórfico	KR920087
		R: CGGTTGGTGTATATGCTTCC					
VH9	(TG)14	F: CGAGGATCCAATTGTGCGAG	55	244		Não amplificou	KR920089
		R: ATCGGGATATATGGGGTCTC					
Vh11-A	(GGC)3	F: GCACCGGAAGAGAGAAGATG	55	165		Monomórfico	KR920091
		R: TCTCCAACCAAGAACCCAAC					
Vh11-B	(GA)3 GG(GA)19	F: GGAGTTGAACCACTGAGCAGA	55	276		Monomórfico	KR920091
		R: TCTCCAACCAAGAACCCAAC					

Temperatura de anelamento (**Ta**).

Dos 33 iniciadores que amplificaram fragmentos do tamanho esperado, foram selecionados nove que apresentaram polimorfismo ao serem avaliados em análise prévia com 24 indivíduos de cinco populações (Tabela 5).

Foram detectados 52 alelos em nove *loci* polimórficos, com o número de alelos variando entre três (D8 e F4) e nove (F3-2 e Vh10) e com uma média de alelo/*locus* de 5,78. Não houve correlação entre o motivo repetitivo e o tamanho dos alelos encontrados. O conteúdo de informação polimórfica (*PIC*) variou de 0,091 (F5) a 0,691 (C12) com uma média de 0,434 (Tabela 5).

Tabela 5. Caracterização de nove marcadores microsatélites polimórficos de *Chrysolaena obovata*, analisados em 24 indivíduos de cinco populações.

Clone-Locus	Sequência microsatélite	Iniciadores 5' - 3'	Ta (°C)	Tamanho fragmento (pb)	Range de alelos (pb)	A	PIC	H _E	H _O	No. de Acesso no Genbank
C3	(AT)3	F: TTCGACACACCCCTAAAACC	60	287	287 - 309	6	0,206	0,216	0,236	KR920052
		R: GCTAAATTCGCCTCCTTTTG								
C10	(AG)3T(TG)3G(TG)3	F: TCCACATACCGGATCTAGGC	55	245	243 - 275	7	0,269	0,281	0,303	KR920057
		R: CCTATGCATGCACTTGGTGT								
C12	(GA)3	F: CACGGTTTAATCACGGCTTG	50	228	229 - 241	7	0,691	0,729	0,753	KR920059
	(AG)3	R: CTATGCTGCCCATCCCTTT								
D8	(TG)5	F: CCACGTGTAGGGTTAAAATG	50	134	132 - 136	3	0,455	0,528	0,754	KR920067
	(CA)14	R: GAATTGGATCATGATGCTTG								
E5	(CA)2A(CA)8	F: GCACGAAGTAGTATCCGACA	55	208	205 - 225	4	0,572	0,646	0,687	KR920073
		R: GGCTAAGTCAAATATGTGTGC								
F3-SSR2	(TG)11	F: AGGTTTAAGAAGGGTTGAG	50	263	280 - 282	9	0,672	0,714	0,891	KR920079
	(GT)3									
	(TG)4	R: TCAATCTCCTTCACTCACTG								
	(TG)4									
F4	(TC)3	F: TAGGGGTGGGTGGATTAG	55	135	144 - 160	3	0,237	0,272	0,287	KR920080
		R: ATCGTGCAGGATATCTAGGG								
F5	(TG)3	F: CGACAGTTAGGCTCCAAAGA	55	300	302 - 348	4	0,091	0,094	0,093	KR920081
	(TC)3	R: CCTCCCATACACCAATAACG								
Vh10	(CA)7	F: TCTTGGTCTGAGAGAGGTGT	60	264	274 - 296	9	0,656	0,687	0,652	KR920090
		R: AACGAGTGTGATCAGCAGAG								

Temperatura de anelamento (**Ta**), número de alelos (**A**), conteúdo de informação polimórfica (**PIC**), heterozigosidade esperada (**H_E**), heterozigosidade observada (**H_O**)

4.2. TRANSFERABILIDADE DOS INICIADORES MICROSATÉLITES DE *CHRYSOLAENA OBOVATA*

Os resultados da transferabilidade dos iniciadores de *C. Obovata* para outras espécies de Asteraceae mostram que todos os *loci* amplificaram com sucesso em pelo menos cinco das espécies testadas (Tabela 6), sendo que a porcentagem de amplificação entre os *locus* variou entre 29,4% (C3) e 94,1% (C10). O número de iniciadores amplificados por espécie apresentou ampla variação (de um a nove) sendo que foram identificados nove marcadores com amplificação bem-sucedida em *Lessingianthus buddleiifolius*, oito em *Chrysolaena simplex*, *Calea quadrifolia* e *Ichthyothere terminalis*, e sete em *Achyrocline satureioides*, *Calea platylepis* e *Helianthus tuberosus*, sugerindo seu potencial para aplicação em estudos genéticos dessas espécies.

Com relação ao número de iniciadores amplificados por tribo, os nove iniciadores amplificaram em espécies da tribo Vernonieae à qual pertence *C. obovata*, oito em espécies das tribos Neurolaeneae e Heliantheae, sete em Gnaphalieae, seis em Coreopsidae, cinco em Eupatorieae e um em Polymnieae (Figura 9).

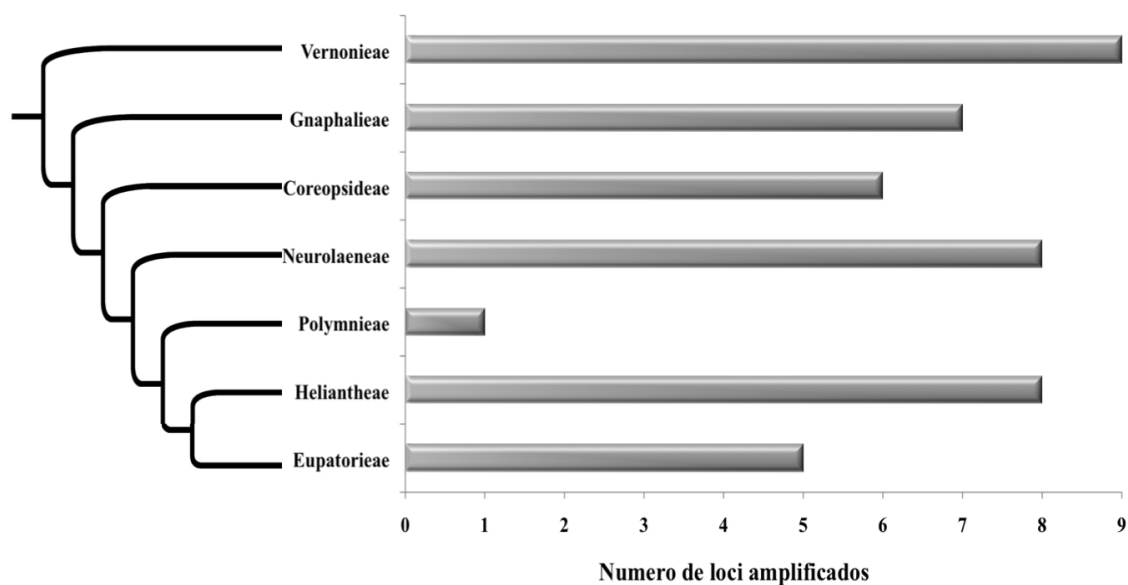


Figura 9. Número de *loci* amplificados em cada uma das sete tribos analisadas. Na esquerda pode-se observar a árvore filogenética que representa as relações de distância entre as sete tribos, adaptado de Funk *et al.* (2009).

Tabela 6. Transferabilidade de iniciadores microssatélites em outras espécies de Asteraceae.

Tribo/Espécies	N	C10	E5	D8	F4	C12	F5	F3-2	C3	Vh10	No. de loci
Vernonieae											
<i>Chrysolaena simplex</i>	3	+++	++	++	++	+++	++	++	++	-	8
<i>Lessingianthus buddleiifolius</i>	3	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	9
<i>Vernonia fagifolia</i>	2	++	++	++	++	++	-	-	-	-	5
<i>Vernonia ferruginea</i>	1	+	-	+	+	-	-	+	-	+	5
Gnaphalieae											
<i>Achyrocline sp.</i>	3	+	-	+++	+	+	-	++	-	-	5
<i>Achyrocline satureioides</i>	3	+++	+++	++	++	++	++	++	-	-	7
Coreopsideae											
<i>Bidens gardineri</i>	3	++	+	++	+	+++	+	-	-	-	6
Neurolaeneae											
<i>Calea platylepis</i>	3	+++	+++	+++	+++	+++	-	++	-	++	7
<i>Calea quadrifolia</i>	3	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	++	8
Polymnieae											
<i>Smallanthus sonchifolius</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Heliantheae											
<i>Aspilia foliacea</i>	3	++	++	+	++	++	-	-	-	+	6
<i>Dimerostemma vestitum</i>	3	+	-	-	-	+++	-	-	+++	-	3
<i>Helianthus tuberosus</i>	3	+++	+++	-	+++	+++	++	-	+++	+++	7
<i>Viguiera discolor</i>	3	++	+	+	+	+	-	-	-	+	6
<i>Ichthyothere mollis</i>	3	++	+++	++	+	+	+	-	-	-	6
<i>Ichthyothere terminalis</i>	3	+	+	++	+	++	+	+	+	-	8
Eupatorieae											
<i>Chromolaena latisquamulosa</i>	3	++	-	+	-	++	+	+	-	-	5
% de transferabilidade		94,1	70,6	82,3	82,3	88,2	52,9	52,9	29,4	47,1	

Os símbolos ‘+++’, ‘++’, ‘+’ indicam amplificações bem sucedidas em três, dois e um indivíduo respectivamente e ‘-’ indica amplificações que falharam. N=Número de indivíduos.

4.3. DIVERSIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES

O valor médio de heterozigosidade esperada (H_E) para as populações foi de 0,46, sendo a população de Mogi-Guaçu a que apresentou o menor valor (0,36) e as populações da Serra dos Pirineus e o maior valor (0,49). A heterozigosidade observada (H_O) para o total das populações foi de 0,52 e variou entre populações de 0,43 (Santa Bárbara) a 0,61 (Montes Claros) (Tabela 7).

O número médio de alelos por *locus* (A) para todas as populações analisadas foi de 5,78 e variou de 2,9 (Mogi-Guaçu) a 3,9 (Uberlândia). Além disso, o número de alelos efetivos por *locus* (A_E) para o total das populações foi de 2,26 com valores entre 1,89 (Santa Bárbara) e 2,28 (Serra dos Pirineus). O valor médio da riqueza alélica (A_R) para as sete populações foi de 2,48 com valores de 2,20 (Mogi-Guaçu) a 2,72 (Brasília) (Tabela 7).

Do total dos alelos encontrados (52), 25 alelos apresentaram frequência menor que 0,05 (cinco alelos no *locus* F3-2; quatro alelos nos *loci* C10, C3 e Vh10; três alelos no *locus* F5; dois alelos no *locus* C12; e um alelo nos *loci* E5 e F4), sendo estes denominados alelos raros. Ademais, foram observados 13 alelos privados (quatro na população de Uberlândia; três alelos nas populações de Montes Claros e Serra dos Pirineus e um alelo nas populações de Mogi-Guaçu, Brasília e Santa Bárbara). Do total de alelos privados, quatro foram alelos raros (Tabela 7).

Tabela 7. Índices de diversidade genética para sete populações de *Chrysolaena obovata*.

População/Abreviação	Estado/ Fitofisionomia	N	H_O	H_E	A_R	A	A_E	A_P	F_{IS}	P
Mogi-Guaçu/MG	SP/C	37	0,46	0,36	2,20	2,89	1,90	1	-0,301	88,89
Montes Claros/MC	MG/CR	57	0,61	0,45	2,46	3,56	1,98	3	-0,357	100
Serra Dourada/SD	GO/CR	52	0,44	0,39	2,38	3,33	2,11	0	-0,117	77,78
Serra dos Pirineus/SP	GO/CR	49	0,52	0,49	2,67	3,44	2,28	3	-0,057	100
Brasília/BRA	DF/CR	66	0,55	0,48	2,72	3,78	2,23	1	-0,131	100
Uberlândia/UB	MG/C	58	0,55	0,43	2,55	3,89	2,18	4	-0,296	88,89
Santa Bárbara/SB	SP/C	35	0,43	0,37	2,38	3,33	1,89	1	-0,166	77,78
Média 7 populações		50,6	0,51	0,42	2,48	3,46	2,08		-0,203	90,48
Global		192	0,52	0,46		5,78	2,26		-0,220	

Cerrado *sensu stricto* (C), campos rupestres (CR), Número de alelos (N), Heterozigosidade observada (H_O), Heterozigosidade esperada (H_E), Riqueza alélica (A_R), Número médio de alelos por locus (A), Número de alelos efetivos (A_E), Número de alelos privados (A_P), Coeficiente de endogamia (F_{IS}), Porcentagem de *locus* polimórficos (P) de cada população de *Chrysolaena obovata*. Em vermelho os menores valores e em verde, os maiores. **Nota** = Todos os valores de F_{IS} são significativos ($P < 0,01$).

4.4. DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE AS POPULAÇÕES

O coeficiente de endogamia (F_{IS}), calculado com 9 *loci* de microssatélites para o total das populações de *C. obovata* foi negativo (-0,220), com valores para cada população entre -0,057 (Serra dos Pirineus) e -0,357 (Montes Claros) (Tabela 7) e para cada *loci* entre -0,004 (Vh10) e -0,474 (D8) (Tabela 8).

Tabela 8. Estatística F calculada para cada *locus* individualmente e para todos os *loci* em conjunto (Total).

<i>Locus</i>	Tamanho amostra	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	Nm
C10	376	-0,145	-0,053	0,080	2,870
E5	332	-0,152	-0,037	0,099	2,271
D8	382	-0,474	-0,423	0,035	6,974
F4	362	-0,201	-0,052	0,124	1,774
C12	348	-0,152	-0,031	0,105	2,124
F3-2	330	-0,421	-0,287	0,094	2,409
C3	364	-0,184	-0,086	0,083	2,772
Vh10	328	-0,004	0,079	0,082	2,791
F5	370	-0,108	-0,037	0,064	3,665
Total	355	-0,220	-0,113	0,087	2,622

Coeficiente de endogamia (F_{IS}), Índice de Fixação global (F_{IT}), Índice de Fixação (F_{ST}), Fluxo gênico estimado (Nm) como $Nm = 0.25 (1 - F_{ST})/F_{ST}$.

Ao analisar a distribuição da diversidade genética entre as populações mediante o índice de diferenciação genética (F_{ST}), os resultados mostraram uma moderada e significativa diferenciação entre as populações de *C. obovata* ($F_{ST} = 0,087$; $P < 0,001$). A maior diferenciação genética entre as populações foi detectada no *locus* F4 com um $F_{ST} = 0,124$ e o *locus* que apresentou menor diferenciação foi D8 ($F_{ST} = 0,035$) (Tabela 8).

O índice de fixação global (F_{IT}) para o total das populações foi negativo (-0,113) com valores para cada *locus* entre 0,079 (Vh10) e -0,423 (D8), refletindo o excesso de heterozigotos nas populações (Tabela 7). O fluxo gênico (Nm) estimado para todos os *loci* foi de 2,622 com valores para cada *locus* de 1,774 (F4) a 6,974 (D8) (Tabela 8).

Em geral, a maioria dos *loci* utilizados apresentam um significativo excesso de heterozigotos, acima do esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 9). A população Serra dos Pirineus apresentou cinco *locus* em desequilíbrio, as populações Montes Claros, Brasília e Santa Bárbara apresentaram três, as Serra Dourada e Mogi-Guaçu dois e a Uberlândia, apenas um.

Tabela 9. Significância dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg em 7 populações de *Chrysolaena obovata*.

População/Locus	C10	E5	D8	F4	C12	F3-2	C3	VH10	F5
Mogi-Guaçu	ns	ns	ns	ns	***	**	m	ns	ns
Montes Claros	ns	**	*	ns	***	ns	ns	ns	ns
Serra Dourada	ns	ns	**	ns	ns	ns	m	***	m
Serra dos Pireneus	ns	**	**	ns	*	***	ns	*	ns
Brasília	ns	**	ns	ns	***	*	ns	ns	ns
Uberlândia	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	m
Santa Bárbara	***	*	ns	m	ns	ns	ns	*	m

Grau de significância teste de χ^2 : Não significativo (ns), $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***), monomórfico (m).

Além disso, as análises da estimativa de alelos nulos indicaram a presença de alelos nulos apenas no locus *Vh10* nas populações da Serra Dourada e da Serra dos Pireneus (Tabela 10).

Tabela 10. Frequências esperadas de alelos nulos em 7 populações de *Chrysolaena obovata*.

População/Locus	C10	E5	D8	F4	C12	F3-2	C3	VH10	F5
Mogi-Guaçu	-0,0256	-0,1238	-0,112	-0,0099	-0,1022	-0,2627	0	-0,0175	-0,0046
Montes Claros	-0,0035	-0,2158	-0,1333	-0,100	-0,1906	-0,1249	-0,0913	-0,0941	-0,0021
Serra Dourada	-0,0496	-0,1101	-0,1836	-0,019	-0,1169	-0,1214	0	0,2239*	0
Serra dos Pireneus	-0,0839	-0,0626	-0,1672	-0,0606	0,0822	-0,1826	-0,009	-0,1282*	-0,0221
Brasília	-0,0850	-0,0666	-0,1135	-0,0229	0,0752	-0,1587	-0,0386	0,0089	-0,0229
Uberlândia	-0,0108	-0,0255	-0,2908	-0,0181	-0,1372	-0,0984	-0,022	-0,1429	0
Santa Bárbara	0,0907	0,0841	-0,1212	0	-0,0402	-0,204	-0,012	-0,1542	0

Calculadas usando o primeiro estimador de Brookfield (1996) implementado no programa MICRO-CHECKER. $P < 0,05$ (*).

O diagrama MDS dos F_{ST} entre pares de populações apresentou valor de *stress* de 0,05, o que indica uma ótima representação dos dados, podendo observar menor diferenciação entre as populações Serra dos Pirineus – Brasília (0,03), Serra dos Pirineus – Uberlândia (qual o valor?) e Serra dos Pirineus – Serra Dourada (0,05) (Figura 10, Tabela 11). Adicionalmente, foi encontrada uma maior diferenciação entre as populações Mogi-Guaçu e Santa Bárbara (0,12) e Mogi-Guaçu – Serra Dourada (0,12) (Tabela 11). No entanto, se observa uma maior diferenciação da população de Montes Claros em relação às demais populações (Figura 10).

Ao analisar a distância genética de Nei (1972) entre pares de populações se observou a maior distância entre as populações de Montes Claros – Brasília (0,13) e a menor distancia genética entre as populações de Brasília – Serra dos Pirineus, Uberlândia - Mogi-Guaçu e Uberlândia - Serra Dourada (0,05) (Tabela 11).

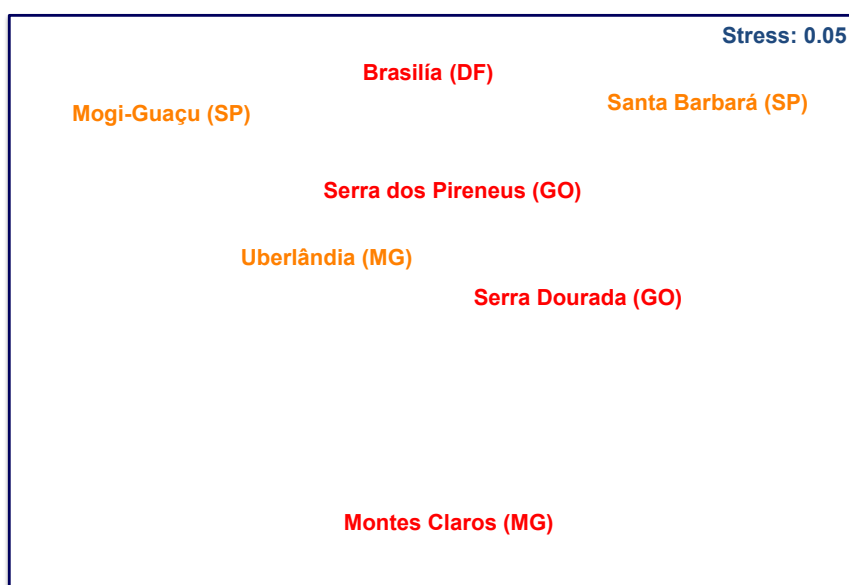


Figura 10. Representação gráfica dos índices de Fixação (F_{ST}) entre pares de populações de *Chrysolaena obovata* de ocorrência em áreas de cerrado *sensu stricto* (em laranja) e campos rupestres (em vermelho). **Nota** = todos os F_{ST} são significativos ($P < 0,001$).

Tabela 11. Matriz de distâncias genéticas de Nei (1972) (acima da diagonal) e índices de Fixação (F_{ST}) (abaixo da diagonal) baseadas nos nove *loci* microssatélites entre as sete populações de *Chrysolaena obovata*.

POP	MG	MC	SD	SP	BRA	UB	SB
MG		0,10	0,10	0,06	0,09	0,05	0,10
MC	0,11		0,08	0,09	0,13	0,09	0,10
SD	0,12	0,08		0,06	0,08	0,05	0,08
SP	0,06	0,08	0,05		0,05	0,06	0,09
BRA	0,09	0,11	0,08	0,03		0,06	0,10
UB	0,05	0,09	0,06	0,05	0,05		0,10
SB	0,12	0,11	0,10	0,08	0,10	0,12	

Mogi-Guaçu (MG), Montes Claros (MC), Serra Dourada (SD), Serra dos Pireneus (SP), Brasília (BRA), Uberlândia (UB) e Santa Bárbara (SB). Em vermelho os menores valores e em verde, os maiores.

Os valores do fluxo gênico indireto (Nm) estimado entre as populações a partir dos valores de F_{ST} , mostram que o maior fluxo gênico foi entre as populações Serra dos Pireneus – Brasília (5,2) seguido pelo fluxo gênico entre a população de Uberlândia e as populações de Serra dos Pireneus (3,7), Brasília (3,4), Serra dos Pireneus – Serra Dourada (3,4) e Uberlândia – Mogi-Guaçu (3,2) e o menor fluxo gênico foi entre as populações de Mogi-Guaçu – Santa Bárbara e Mogi-Guaçu – Serra Dourada (1,3) (Tabela 12).

Tabela 12. Matriz de fluxo gênico aparente (Nm) (abaixo da diagonal) baseada nos nove *loci* microssatélites e distância geográfica em quilômetros (acima da diagonal) entre as sete populações de *Chrysolaena obovata*.

POP	MG	MC	SD	SP	BRA	UB	SB
MG		712	758	742	714	366	225
MC	1,5		736	602	512	589	897
SD	1,3	2,1		147	233	393	754
SP	2,7	2,1	3,4		90	380	368
BRA	1,8	1,5	2,2	5,2		368	780
UB	3,2	1,9	3,0	3,7	3,4		413
SB	1,3	1,5	1,6	2,0	1,7	1,4	

Mogi-Guaçu (MG), Montes Claros (MC), Serra Dourada (SD), Serra dos Pireneus (SP), Brasília (BRA), Uberlândia (UB) e Santa Bárbara (SB). Em vermelho os menores valores e em verde, os maiores.

Ao analisar o fluxo gênico entre as populações de *C. obovata*, estimado pelo programa *Migrate-n*, foi observado um complexo padrão migratório entre todas as populações. As populações de campos rupestres apresentam principalmente movimento de migrantes entre elas, ou com a população de Uberlândia, que é mais próxima geograficamente. Quanto às populações de cerrado *sensu stricto* apresentam movimento de migrantes entre elas assim como com as populações de longa distância, de regiões de campos rupestres (Figura 11). O maior N_{em} foi observado entre as populações de Mogi-Guaçu e Brasília (1584,9) e o menor valor entre Santa Bárbara – Montes Claros (27,0). Além disso, observa-se migração unidirecional entre as populações de Mogi-Guaçu – Serra dos Pirineus; Brasília – Santa Bárbara. A população de Santa Bárbara doa migrantes para todas as populações, com exceção de Brasília, e por sua vez recebe migrantes só desta última (Tabela 13).

Tabela 13. Número efetivo de migrantes por geração (N_{em}) entre as sete populações de *C. obovata*. Resultados obtidos com o programa *Migrate-n*. Populações marcadas com "+" representam as populações que estão recebendo migrantes.

POP	MG +	MC +	SD +	SP +	BRA +	UB +	SB +
MG		792,4	0,0	190,5	1584,9	593,7	0,0
MC	0,0		34,6	226,5	671,5	374,1	0,0
SD	0,0	57,2		218,0	205,3	0,0	0,0
SP	0,0	293,2	14,8		243,8	831,5	0,0
BRA	44,8	0,0	195,7	61,9		249,9	36,7
UB	212,7	842,8	521,4	142,7	526,1		0,0
SB	148,3	27,0	68,0	567,4	0,0	483,1	

Mogi-Guaçu (**MG**), Montes Claros (**MC**), Serra Dourada (**SD**), Serra dos Pirineus (**SP**), Brasília (**BRA**), Uberlândia (**UB**) e Santa Bárbara (**SB**). Em vermelho os menores valores e em verde, os maiores.

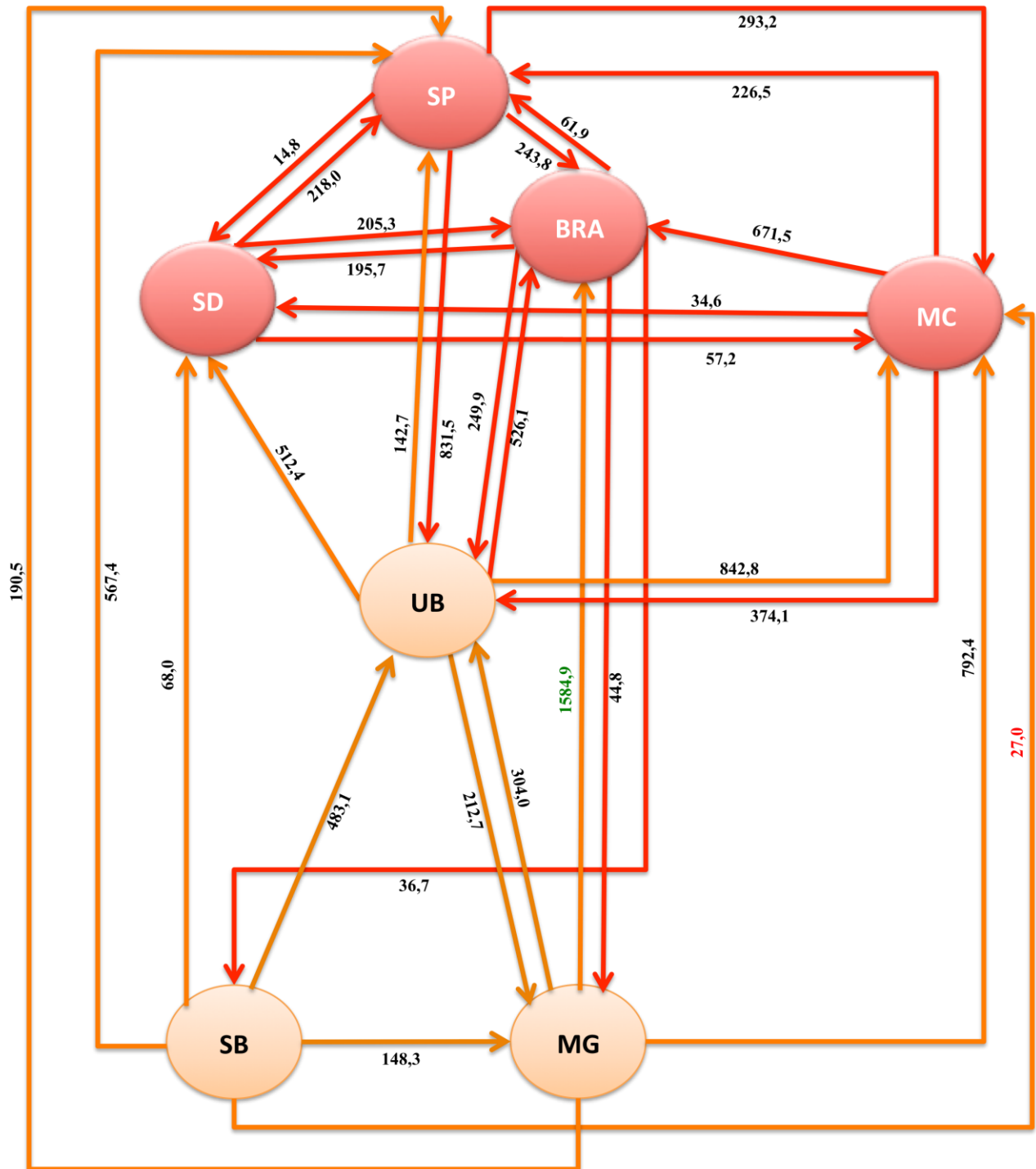


Figura 11. Representação gráfica do número efetivo de migrantes (N_{em}) por geração entre sete populações de *Chrysolaena obovata*, obtida a partir dos dados de análise de coalescência com o programa *Migrate-n*. Cerrado sensu stricto (em laranja): Mogi-Guaçu (MG), Uberlândia (UB) e Santa Bárbara (SB); campos rupestres (em vermelho): Montes Claros (MC), Serra Dourada (SD), Serra dos Pirineus (SP) e Brasília (BRA). A cor da linha varia dependendo da fisionomia a qual doa os migrantes. Em vermelho os menores valores e em verde, os maiores.

O teste de Mantel com 9999 reamostragens, mostrou uma baixa, mas significativa ($R^2 = 0,2312$; $P < 0,05$), correlação entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas das populações. Essas análises indicam que existe um baixo isolamento por distância entre as sete populações de *C. obovata* (Figura 12).

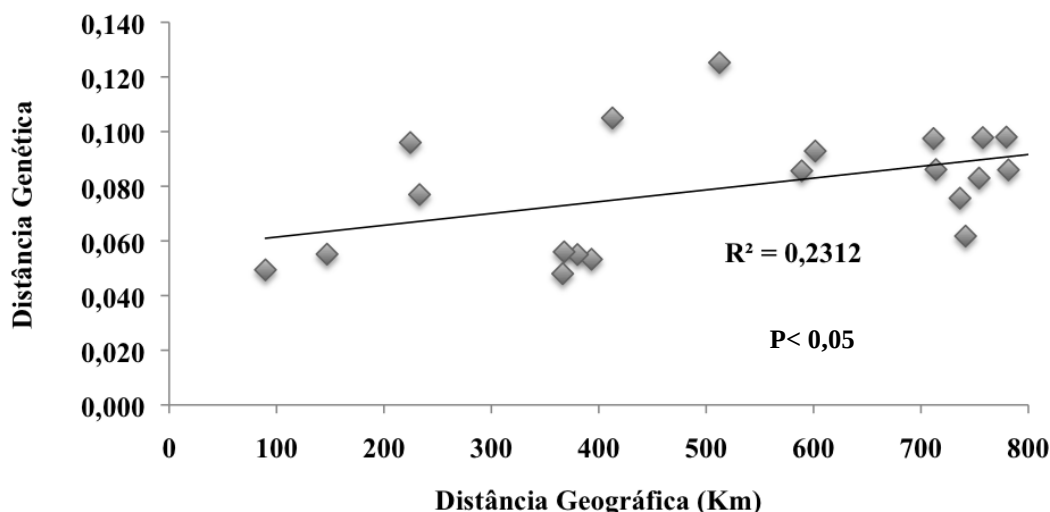


Figura 12. Correlação entre distância genética de Nei (1972) e distância geográfica (em quilômetros) das sete populações de *Chrysolaena obovata*.

Ao se utilizar a matriz de distância genética de Nei (1972) para construir uma árvore utilizando o algoritmo de *Neighbor-joining* (NJ) (Figura 13), pôde-se observar a formação de dois grupos, um primeiro contendo as populações de Montes Claros, Santa Bárbara e Serra Dourada e um segundo agrupando as populações de Serra dos Pireneus, Brasília, Uberlândia e Mogi-Guaçu. Em geral se observa que os valores de suporte estatístico dos grupos (*bootstrap*) são muito baixos, reforçando os resultados obtidos com as outras análises, que mostram a moderada estruturação populacional.

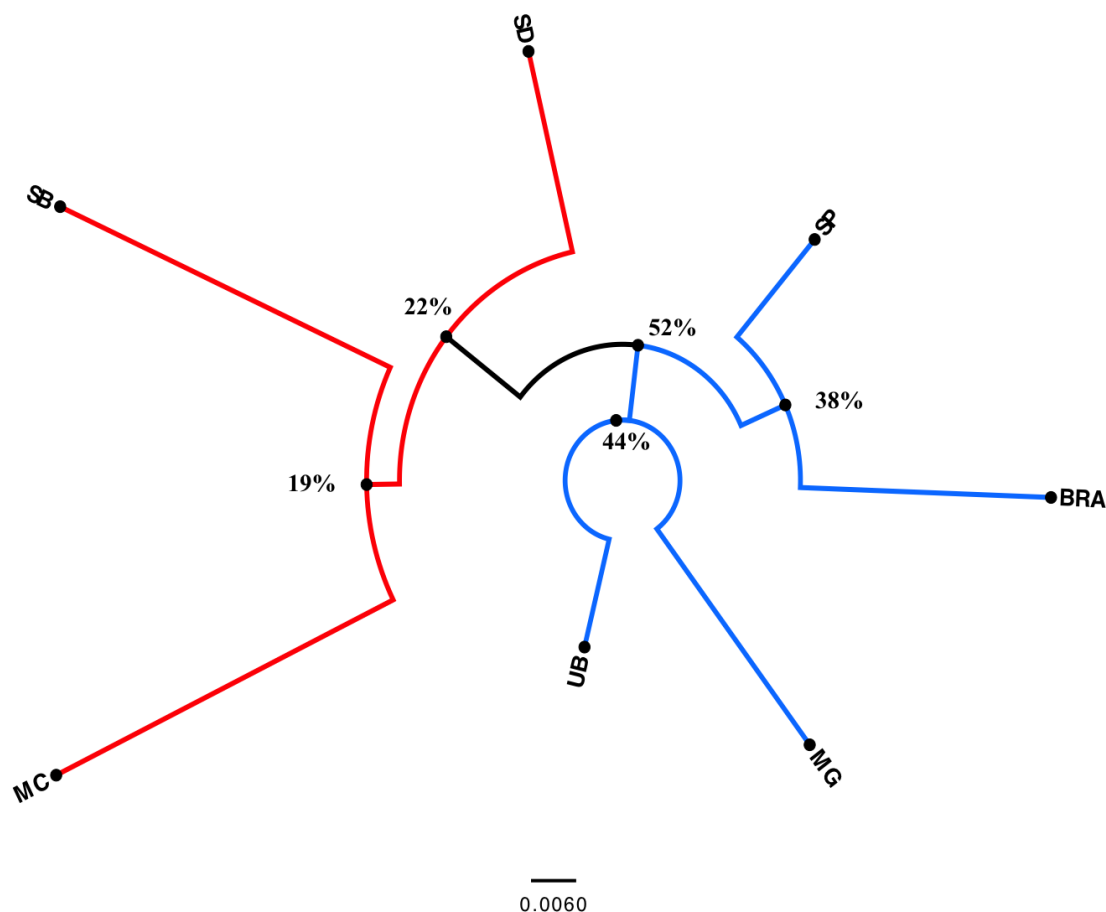


Figura 13. Árvore *Neighbor-joining* (NJ) construída com base nas distâncias genéticas de Nei (1972) de sete populações de *Chrysolaena obovata*. Os valores de *bootstrap* (10.000 repetições) são apresentados nos nós dos ramos. Mogi-Guaçu (MG), Montes Claros (MC), Serra Dourada (SD), Serra dos Pireneus (SP), Brasília (BRA), Uberlândia (UB) e Santa Bárbara (SB).

Na análise de coordenadas principais (PCoA) com os indivíduos de *C. obovata* de diferentes populações (Figura 14) é possível observar que os dois primeiros eixos explicam 24,59% e 18,76% da variação genética entre os indivíduos, respectivamente, para um total de 43,35%. Esta análise mostra novamente uma baixa diferenciação genética entre as populações de *C. obovata* mostrando dois agrupamentos principais, um primeiro entre o maior número de indivíduos das populações de Serra Dourada, Montes Claros, Santa Bárbara e alguns indivíduos de Brasília e Mogi-Guaçu. E o segundo entre os indivíduos de Brasília, Uberlândia, Mogi-Guaçu, Serra dos Pireneus e alguns indivíduos da Serra Dourada e Santa Bárbara.

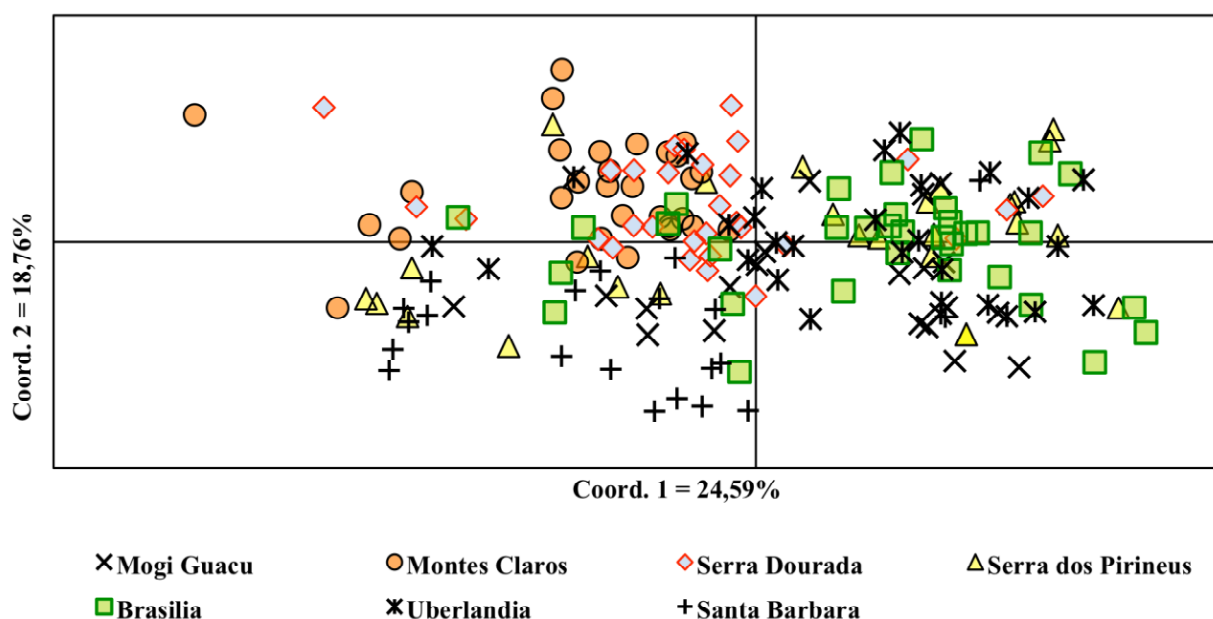


Figura 14. Análise de coordenadas principais (PCoA) para os indivíduos de *Chrysolaena obovata* de sete populações, obtida a partir da matriz de distância genética.

Os resultados da AMOVA obtidos para as sete populações de *C. obovata* indicam que a maior porcentagem de variação, 96,25%, está dentro das populações. A diversidade genética entre as populações corresponde a apenas 3,75% da variância total observada (Tabela 14).

Tabela 14. Análise molecular de variância (AMOVA) para sete populações de *Chrysolaena obovata*.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	% da Variância total	Valor P
Entre as populações	6	7,978	0,01657	3,75	< 0,001
Dentro das populações	377	160,397	0,42546	96,25	< 0,001
Totais	383	168,375	0,44202		
$F_{ST} = 0,03748 \ P < 0,001$					

GL, graus de liberdade

Os resultados da análise de AMOVA, para as populações de *C. obovata* divididas de acordo com a fitofisionomia: (i) cerrado *sensu stricto* - Mogi-Guaçu, Santa Bárbara, Uberlândia; (ii) campos rupestres - Serra Dourada, Serra dos Pirineus, Montes Claros, Brasília; indicam que a maior

porcentagem de variação nas populações de *Chrysolaena obovata* é encontrada dentro das populações (96,21%; $P < 0,01$). A diversidade genética entre as populações dentro dos grupos foi de 3,70% ($P < 0,01$) e a variabilidade genética entre os grupos foi 0,09% mas não significativa ($P = 0,41$) (Tabela 15).

Tabela 15. Análise molecular de variância (AMOVA), comparando as populações de acordo com a fitofisionomia, cerrado *sensu stricto* ou campos rupestres.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	% da Variância total	Valor P
Entre os grupos	1	1,372	0,00041	0,09 Va	= 0,41
Entre as populações dentro dos grupos	5	6,605	0,01634	3,70 Vb	< 0,01
Dentro das populações	377	160,397	0,42546	96,21 Vc	< 0,01
Totais	383	168,375	0,44221		
Va = FCT : 0,00093					
Vb = FSC : 0,03699					
Va = F_{ST} : 0,03788					

Graus de liberdade (GL). Grupo 1. cerrado *sensu stricto* - Mogi-Guaçu, Santa Bárbara, Uberlândia; Grupo 2. campos rupestres - Serra Dourada, Serra dos Pirineus, Montes Claros, Brasília.

A fim de determinar a distribuição espacial da diversidade genética nas populações, foi realizada uma análise espacial da variância molecular com o programa SAMOVA. A melhor divisão da diversidade genética é definida pelo grupo com o valor máximo de FCT. O maior valor foi obtido pela subdivisão das populações em cinco unidades (FCT = 0,05021; $P = 0,01$ e FSC = -0,008; $P = \leq 0,001$): (i) Montes Claros, Santa Bárbara; (ii) Serra Dourada, Uberlândia; (iii) Mogi-Guaçu; (iv) Serra dos Pirineus; (v) Brasília. Estes resultados indicam que a maior diversidade genética é encontrada principalmente dentro das populações de *C. obovata* (95,78%) ($P < 0,001$). A diversidade genética entre os grupos foi de 5,02% da variância observada ($P < 0,001$) e a variabilidade genética entre as populações dentro dos grupos foi negativa, tendo sido transformada em zero ($P < 0,05$) (Tabela 16).

Tabela 16. Análise espacial de variância molecular (SAMOVA) para sete populações de *Chrysolaena obovata*.

Fonte de variação	GL	Soma dos quadrados	Variância	% da Variância total	Valor-P
Entre os grupos	4	7,517	0,0223	5,02% Va	< 0,001
Entre populações dentro dos grupos	2	0,461	0*	0% Vb*	< 0,05
Dentro das populações	377	160,397	0,4255	95,78% Vc	< 0,01
Totais	383	168,375	0,4442		
$V_C = F_{ST}: 0,0422$					
$V_b = F_{SC}: -0,0084$					
$V_a = F_{CT}: 0,0502$					

Graus de liberdade (GL). Grupo 1- Montes Claros, Santa Bárbara; Grupo 2- Serra Dourada, Uberlândia; Grupo 3- Mogi-Guaçu; Grupo 4- Serra dos Pireneus; Grupo 5- Brasília. *Os valores da variância (-0,0036) e sua porcentagem (-0,80%) entre as populações dentro dos grupos foram negativos por tanto foram convertidos a zero.

Ao realizar a análise de gargalo genético levando-se em conta a média dos *loci* em cada população nos testes de Wilcoxon para os modelos de Passos de Mutação (SMM) e Duas Fases (TPM), os resultados apontam para um equilíbrio de mutação-deriva, excluindo a ocorrência de gargalo genético nas populações (Tabela 17).

Tabela 17. Testes do equilíbrio entre mutação e deriva genética para as populações de *Chrysolaena obovata*, utilizando os modelos de Passos de Mutação (SMM) e de Duas Fases (TPM).

População	Modelo Passos de Mutação (SMM)			Modelo de Duas Fases (TPM)		
	D	E	P*	D	E	P*
Mogi-Guaçu	4	4	0,8438	4	4	0,8438
Montes Claros	5	4	0,1641	5	4	0,2500
Serra Dourada	4	3	0,5781	4	3	0,8125
Serra dos Pireneus	4	5	0,7344	3	6	0,4258
Brasília	5	4	0,4961	4	5	0,7344
Uberlândia	5	3	0,2500	5	3	0,3828
Santa Bárbara	4	3	0,1094	4	3	0,1094

Loci em déficit de heterozigosidade (D), *Loci* em excesso de heterozigosidade (E), Probabilidade a 95% de ocorrência de gargalo genético para cada população do teste de Wilcoxon (P*).

4.5. ESTIMATIVA BAYESIANA DA ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA POPULACIONAL

Em relação à estruturação genética das populações, os resultados da análise bayesiana indicaram um $K = 3$ (Figura 15), com base na metodologia descrita por Evanno *et al.* (2005), sugerindo o agrupamento dos indivíduos em três populações hipotéticas.

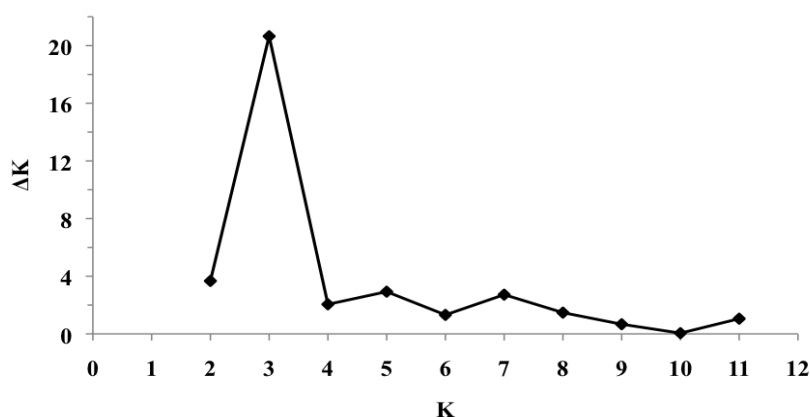


Figura 15. Representação gráfica de ΔK obtidos a partir de 10 simulações independentes para cada número de agrupamentos possíveis (K).

Ao selecionar o valor $K = 3$, foi realizada uma média das 10 simulações para representar a combinação mais provável de genótipos para esse valor de K (Figura 16). Os grupos genéticos identificados pelo programa *Structure* v.2.3.1., em concordância com todas as outras estimativas, reforça a baixa diferenciação genética e alta similaridade entre as populações. O *cluster 1* mostra baixa variação entre as populações. Há tendência de aumento do *cluster 2* nas populações de campos rupestres seguindo o gradiente latitudinal (Figura 16). O *cluster 3*, com maior representatividade nas populações do cerrado *sensu stricto*, apresenta pouca variação entre essas populações, e diminui nas populações de campos rupestres SP e BRA, que possuem. Estas populações hipotéticas tendem a mostrar que as populações são muito semelhantes entre si, se estruturando da seguinte forma: UB-MG; SB-MC-SD; SP-BRA, assim como mostrado nos agrupamentos da árvore de NJ (Figura 13).

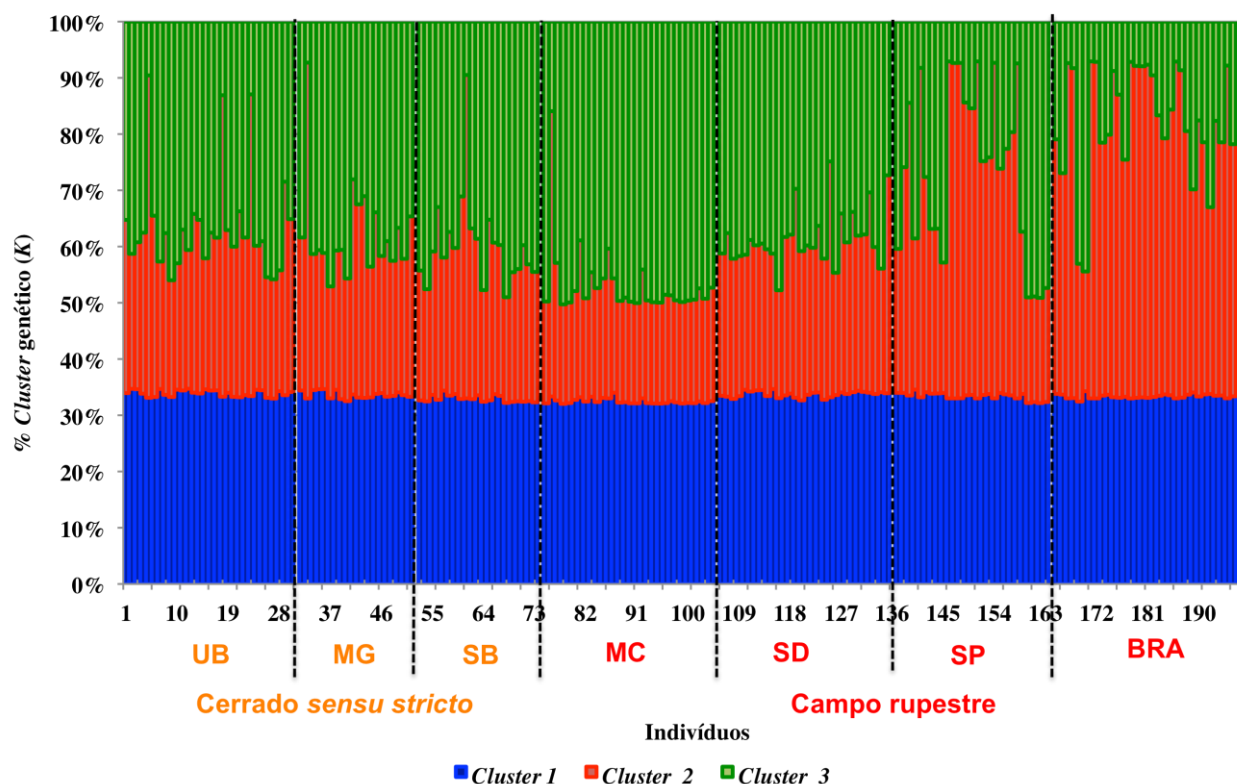


Figura 16. Representação gráfica da estrutura genética dos 192 indivíduos de *Chrysolaena obovata* determinada por análise Bayesiana. Destacando o grau de mistura genética que apresenta cada indivíduo das três populações hipotéticas (*Cluster*) detectadas na análise com o programa *Structure* v.2.3.1., representadas cada uma por uma cor diferente.

4.6. ANÁLISE DO TEOR DE FRUTANOS EM RIZÓFOROS DE *CHRYSOLAENA OBOVATA*

Os conteúdos de frutose total nos extratos brutos feitos a partir dos segmentos proximais dos rizóforos não apresentaram variações significativas entre as populações da Serra Dourada e Serra dos Pirineus (SD-SP; fase vegetativa). Diferenças significativas foram verificadas entre a população de Brasília e Serra Dourada, e entre a população de Uberlândia e as populações de Serra Dourada e Serra dos Pirineus. Nos segmentos distais dos rizóforos, os conteúdos foram inferiores nas populações de Brasília e Uberlândia (BRA-UB; fase de floração) em comparação às populações de Serra Dourada e Serra dos Pirineus. A comparação entre os segmentos distal e proximal em cada população analisada mostrou diferenças significativas, com exceção da população de Brasília, na qual foi mais elevado o teor de frutose total no segmento distal do que no proximal (Figura 17A).

O conteúdo de fruto-polissacarídeos não variou significativamente nos segmentos proximais e distais entre as populações de Serra Dourada e Serra dos Pirineus (SD-SP) ou entre as populações de Brasília e Uberlândia (BRA-UB). Entretanto, foram verificadas diferenças significativas entre

esses dois grupos (SD-SP) vs (BRA-UB). A comparação entre os dois segmentos em cada população analisada mostrou diferença significativa em todas as populações, sendo mais elevado o teor no segmento distal do que no proximal, com exceção da população de Uberlândia (Figura 17B). Os maiores teores de polissacarídeos foram encontrados nas populações de SD e SP, cujas plantas se encontravam em fase vegetativa no momento da coleta.

O teor de fruto-oligossacarídeos nos segmentos proximais apresentou diferenças significativas entre a população da Serra Dourada e as de Brasília e Uberlândia, enquanto os segmentos distais não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das populações analisadas. A comparação entre os dois segmentos em cada população mostrou diferença significativa nas populações de Brasília e Uberlândia sendo o teor mais elevado detectado no segmento distal (Figura 17C).

O conteúdo de açúcares redutores não variou significativamente nos segmentos proximais e distais entre as populações de Serra Dourada e Serra dos Pirineus (SD-SP) ou entre as populações de Brasília e Uberlândia (BRA-UB), mas apresentou diferenças significativas entre esses dois grupos (SD-SP) vs (BRA-UB). A comparação entre os dois segmentos em cada população analisada mostrou diferença significativa apenas nas populações de Serra Dourada e Serra dos Pirineus, sendo mais elevado o teor no segmento proximal do que no distal (Figura 17D). As quantidades mais baixas de açúcar redutor foram verificadas nas populações de SD-SP.

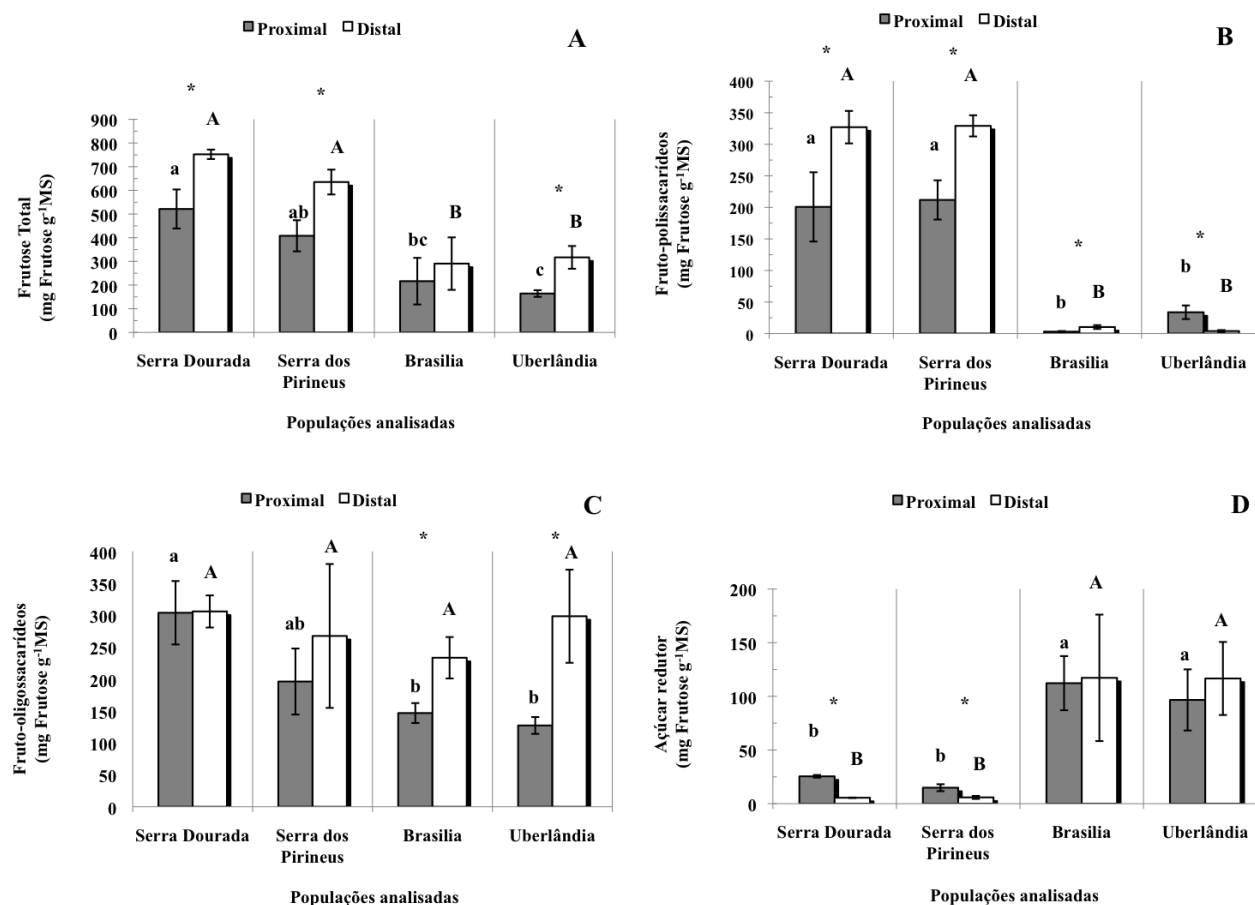
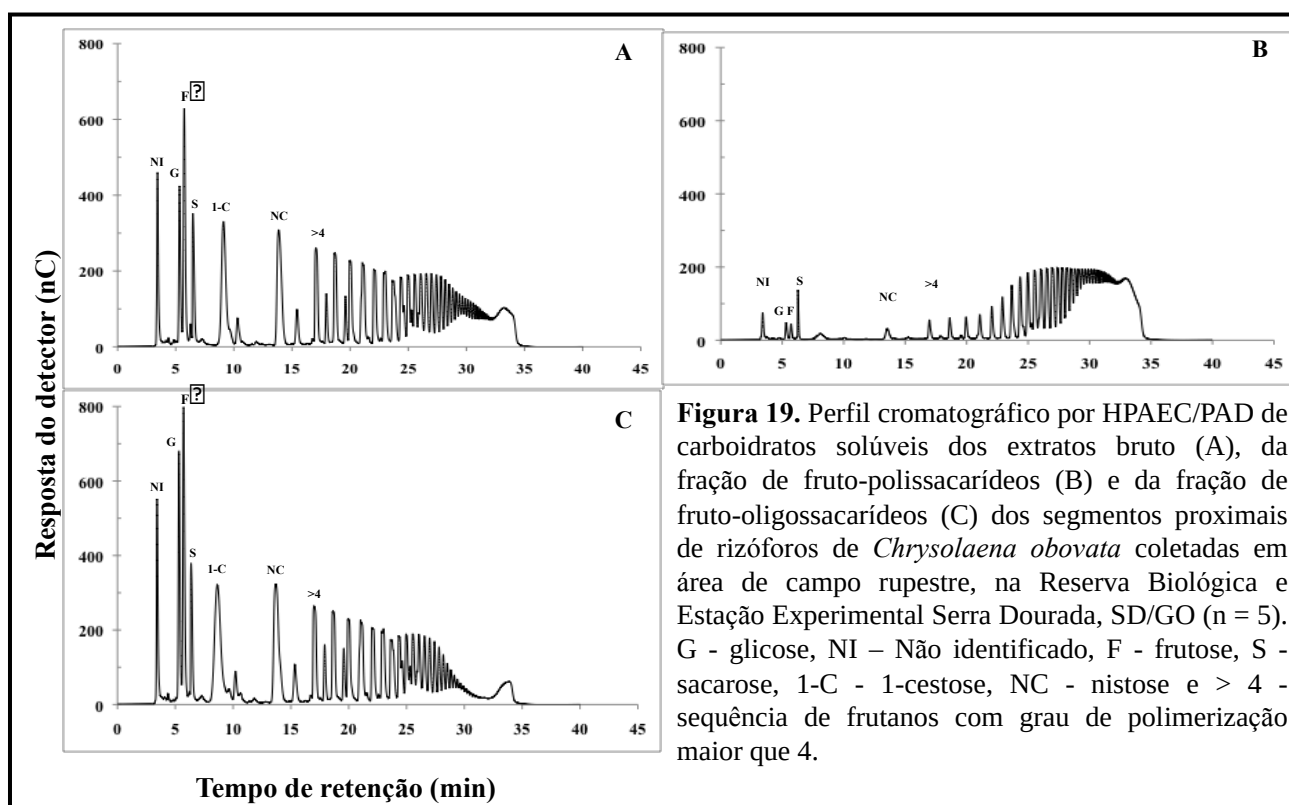
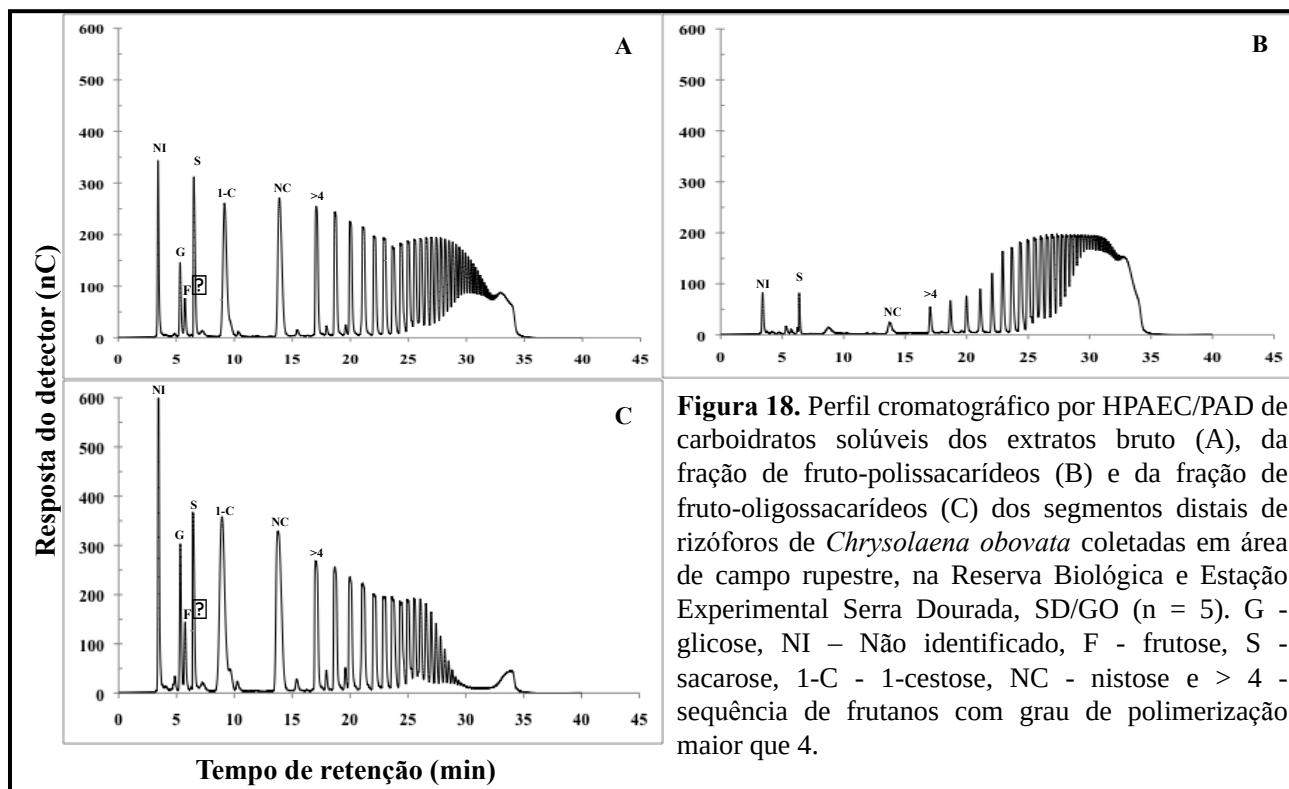
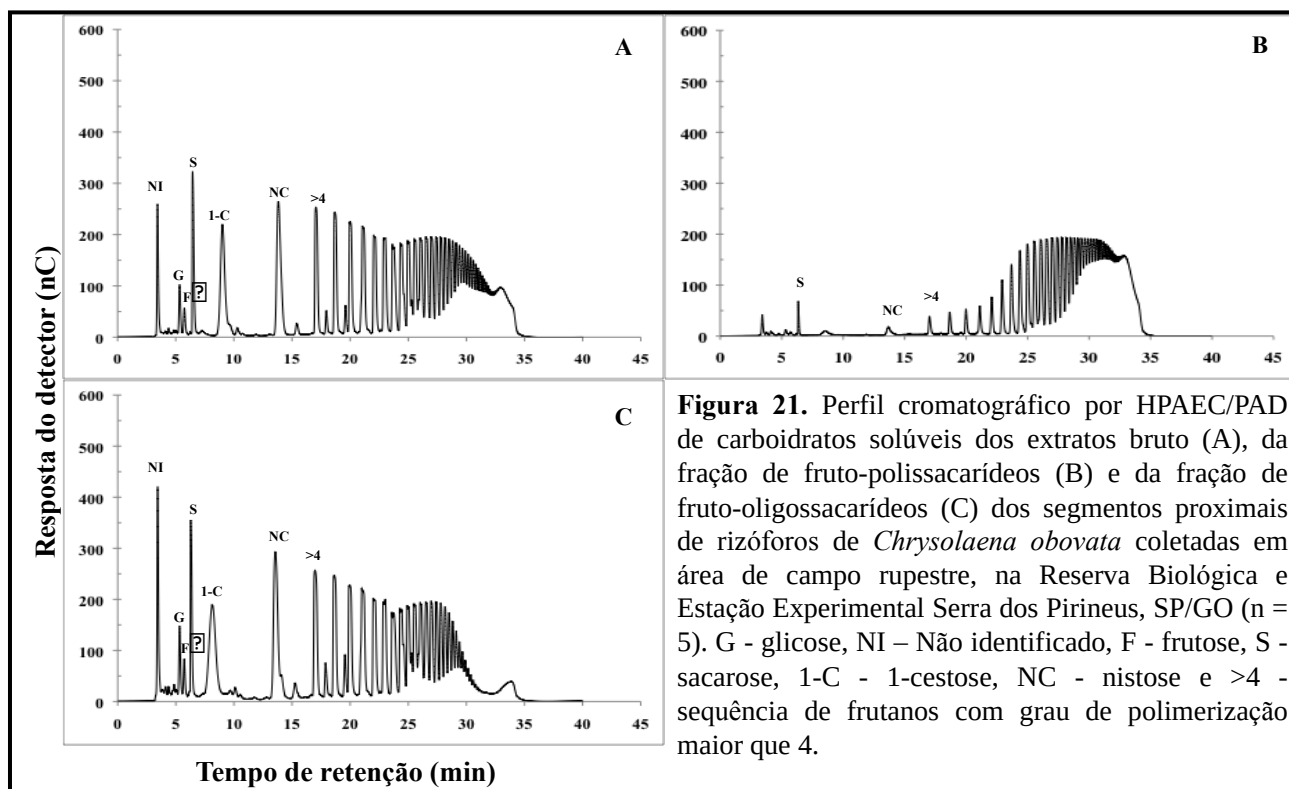
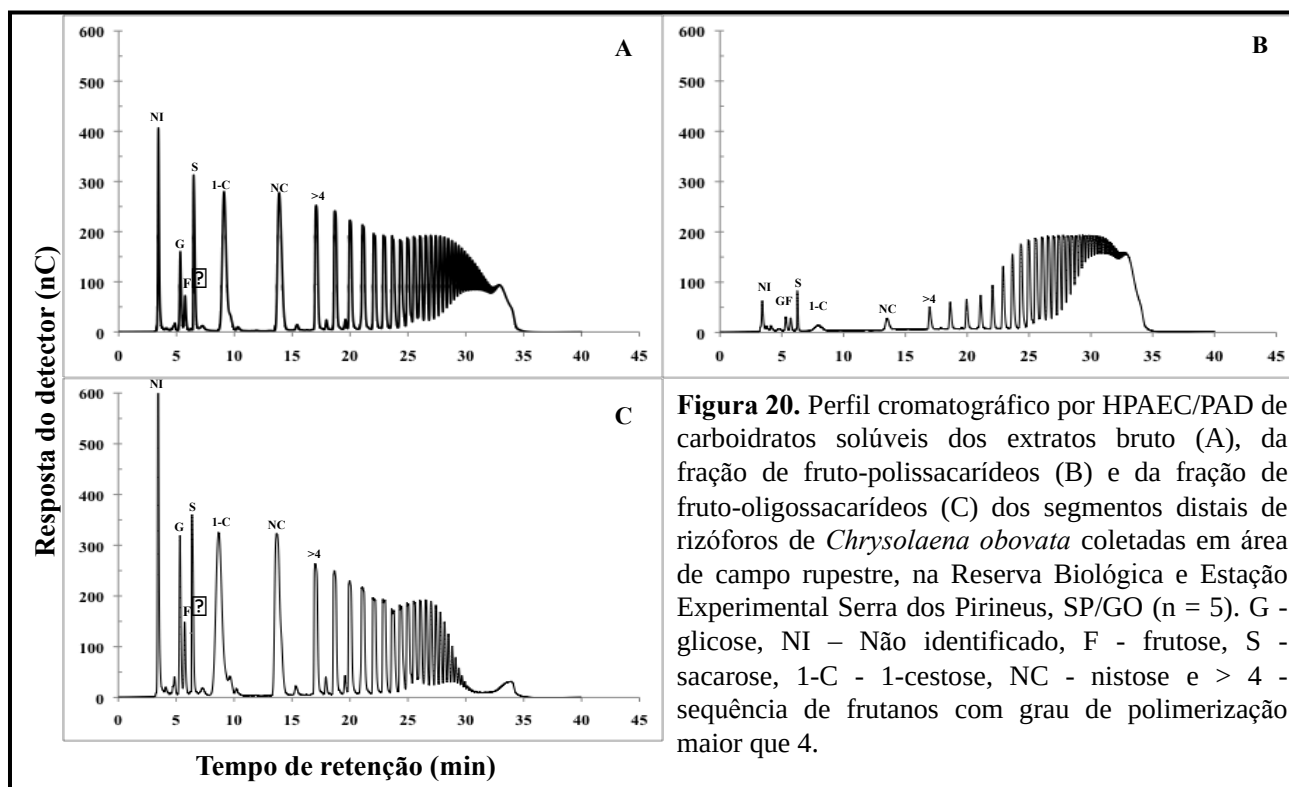


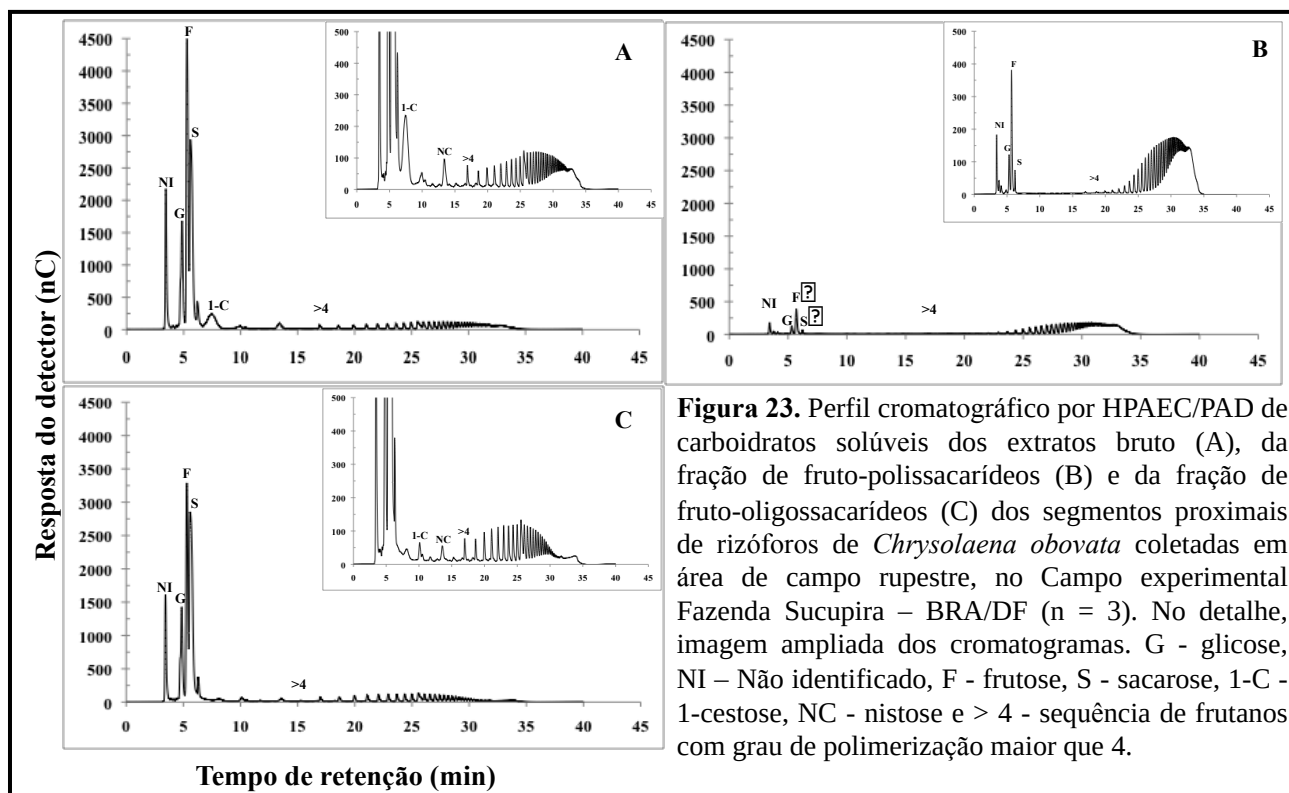
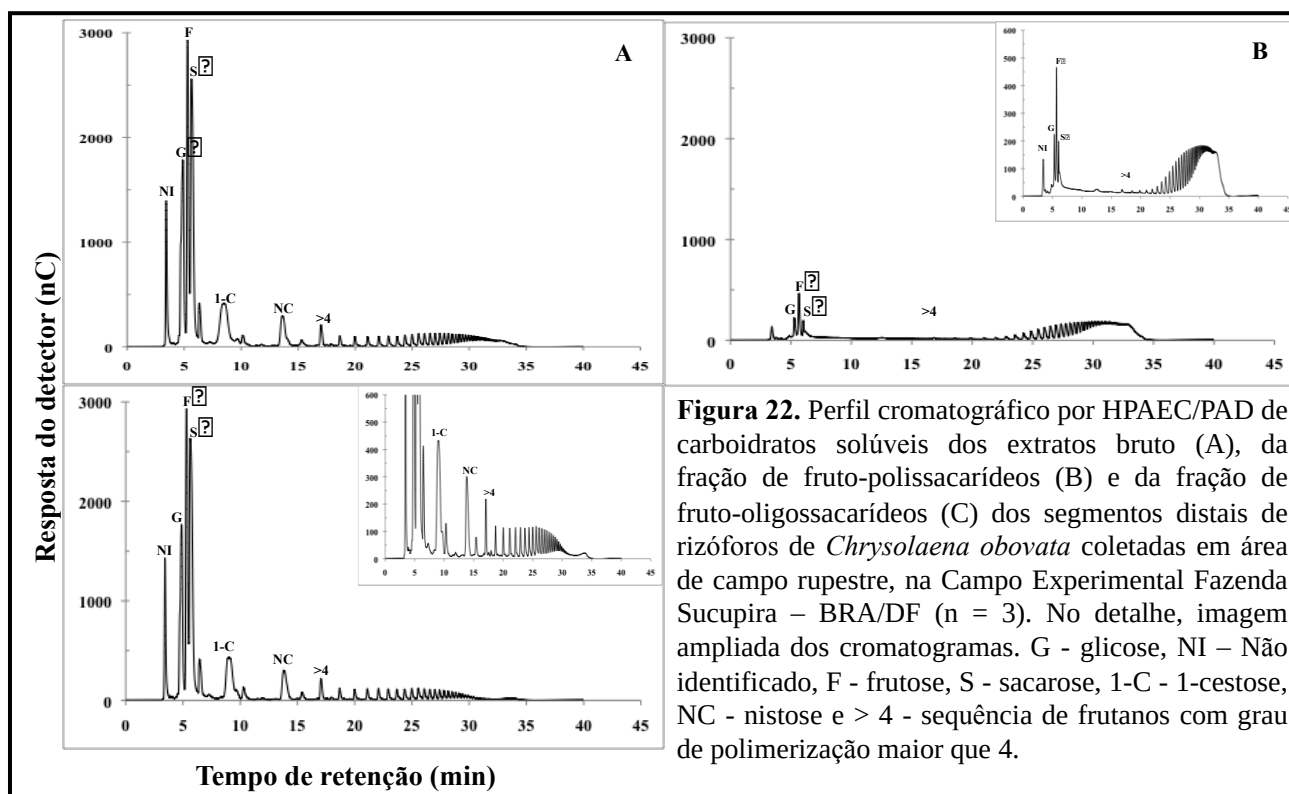
Figura 17. Teor de frutose total dos segmentos proximais e distais dos rizóforos de plantas de *Chrysolaena obovata* de quatro populações do Cerrado. Teor de frutose total nos extratos brutos (A), na fração de fruto-poli (B), e de fruto-oligosacarídeos (C) e teor de açúcares redutores (D) nos segmentos proximais e distais dos rizóforos de plantas de *Chrysolaena obovata* de quatro populações do Cerrado. As barras representam o erro padrão (n = 3). Letras minúsculas comparam os segmentos proximais entre as populações; letras maiúsculas comparam os segmentos distais entre as populações, e * compara os segmentos proximais e distais entre si ($P \leq 0,05$).

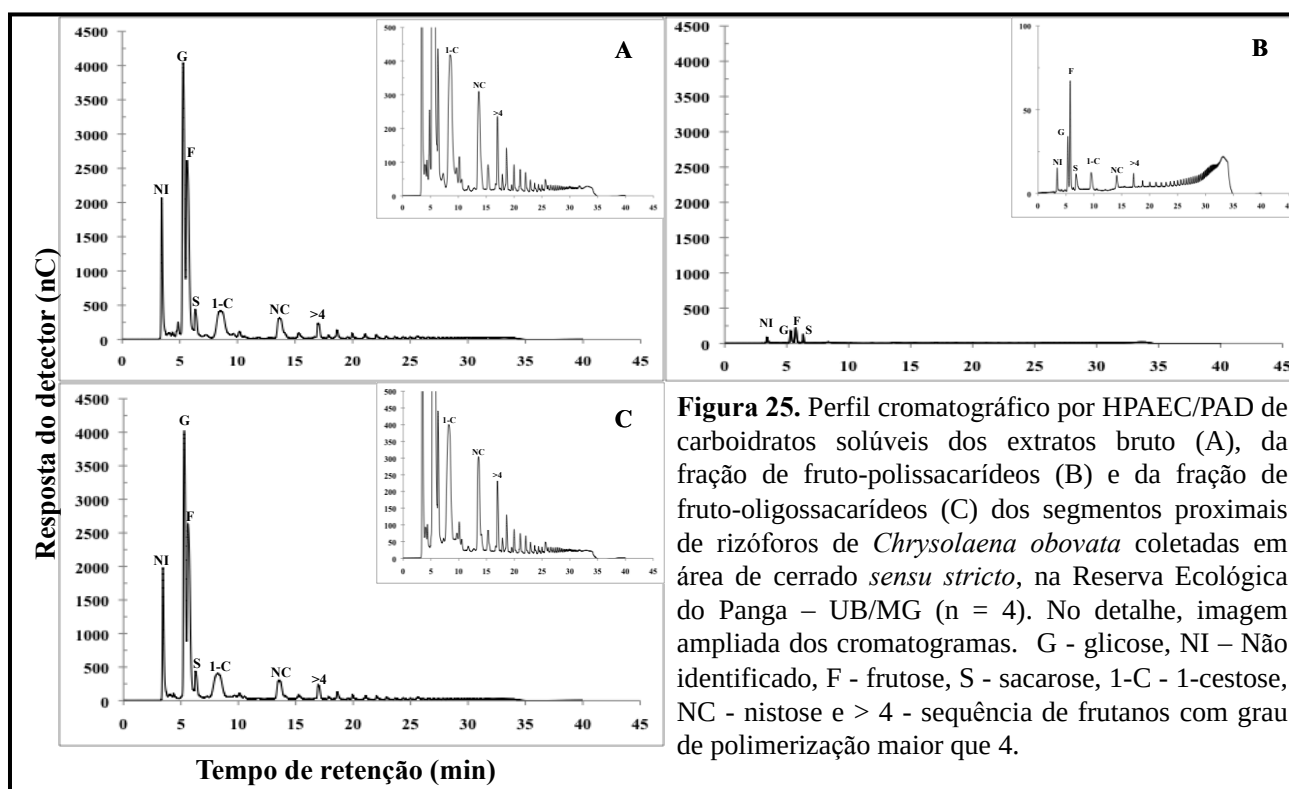
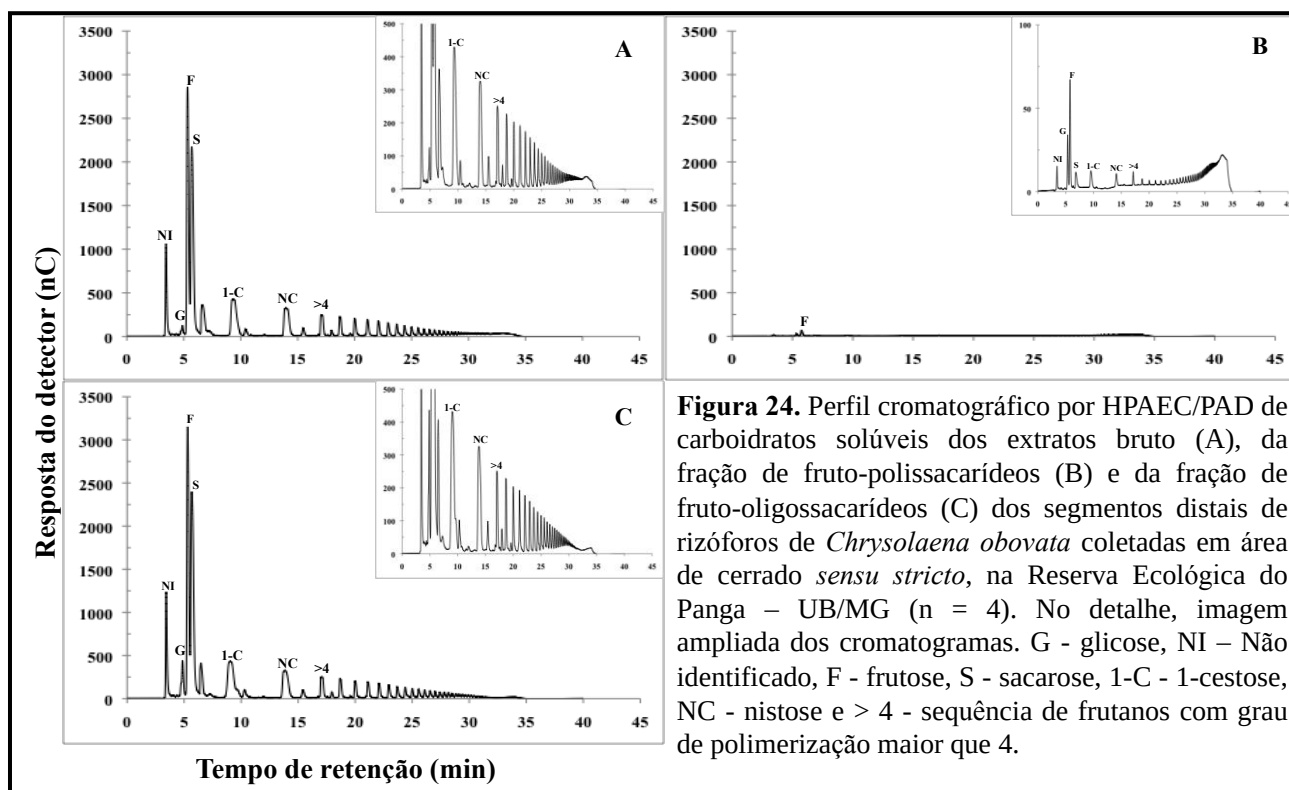
Os perfis cromatográficos dos fruto-polissacarídeos, fruto-oligosacarídeos, da sacarose e das hexoses glucose e frutose obtidos por HPAEC/PAD mostram a presença da série homóloga da inulina em todas as populações analisadas (Figuras 18 – 25). Os cromatogramas obtidos a partir dos extratos de frutanos totais (extrato bruto) e fruto-oligosacarídeos mostram claramente os picos relativos à glucose, frutose, sacarose, ao trissacarídeo 1-cestose, o tetrassacarídeo nistose e aos demais membros da série homóloga, enquanto nos referentes às frações de fruto-polissacarídeos, os picos relativos às moléculas menores são incipientes. Nas populações de Serra Dourada e Serra dos Pirineus verificou-se uma proporção levemente mais elevada de frutanos de maior grau de polimerização (GP) do que nas demais (Figuras 18 – 21). Por outro lado, os cromatogramas

referentes às populações de Brasília e Uberlândia mostraram perfis diferentes dos demais, com uma proporção maior dos picos relativos às hexoses e à sacarose em relação aos demais membros da série da inulina (Figuras 22 – 25). Entretanto, apesar dessa diferença, o grau de polimerização máximo das cadeias de inulina nas duas regiões do rizóforo e nas quatro populações analisadas é semelhante e varia entre 40 e 44.









5. DISCUSSÃO

5.1. DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA *CHRYSOLAENA OBOVATA*

O desenvolvimento da biblioteca enriquecida em *locus* microsatélites foi bastante eficiente, sendo que 93,8% dos clones analisados apresentaram regiões microsatélites. O predomínio de motivos dinucleotídeos já era esperado, tendo em vista a utilização de DNA genômico total no desenvolvimento da biblioteca, com prevalência de sequências de mono, di, tetra e pentanucleotídicas e pelo fato de terem sido utilizados os motivos CT e GT como sonda durante a construção da biblioteca. Outros estudos também relatam uma maior abundância de motivos dinucleotídeos em outras espécies de plantas (Morgante & Olivieri 1993, Ellegren 2004, Le Guen *et al.* 2011, Gao *et al.* 2013, Tambarussi *et al.* 2013, Lu *et al.* 2015).

Na biblioteca enriquecida construída para *C. obovata*, observou-se que a maioria dos motivos microsatélites não apresentaram número de repetições acima de 14 (principalmente dinucleotídeos e trinucleotídeos), o que levou a um ajuste dos parâmetros de busca visando detectar o maior número de microsatélites. De acordo com Ellegren (2004) não existe um consenso sobre o número mínimo de repetições do motivo para que o mesmo seja definido como um *locus* microsatélite, mas o número de repetições pode interferir no nível de polimorfismo dos marcadores, pois motivos com menor número de repetições apresentam menor taxa de mutação e são menos polimórficos (Zhu *et al.* 2000, Gao *et al.* 2009). Em nosso trabalho, somente nove dos 33 *loci* testados (27,3%) foram polimórficos e de acordo com Merritt *et al.* (2015) os marcadores monomórficos estão mais associados a motivos de dinucleotídeos do que a outros motivos de nucleotídeos.

Embora o número de *loci* polimórficos utilizados (nove) esteja um pouco acima do número médio de seis microsatélites utilizados em estudos de genética de populações (Koskinen *et al.* 2004), o número de alelos por *locus* (entre três e nove) foi moderado, levando-se em consideração o esperado para *locus* microsatélites que são potencialmente multialélicos (Ellegren 2004). Contudo, o número médio de alelos por *locus* encontrado neste trabalho (5,78) está próximo da média observada para as Eudicotiledôneas (5,81) e para o clado Asteridae (6,63), conforme recentemente demonstrado por uma meta-análise de 6782 marcadores microsatélites genômicos em plantas (Merritt *et al.* 2015).

O número de alelos por *locus* encontrado na biblioteca genômica de *C. obovata* é maior do que o reportado em outros estudos com Asteraceae. Lúcio *et al.* (2011) encontraram de dois a cinco alelos, com uma média de 2,91 alelos por *locus* em *Hypochaeris chillensis* (Asteraceae) para os 10 iniciadores testados. Já para a espécie *H. catharinensis* (Asteraceae), de ocorrência no Brasil, foram observados de 3 a 14 alelos nos 12 *loci* analisados, uma média de 8,17 alelos por *locus* (Chaves *et*

al. 2015). A análise de 18 *loci* em 36 indivíduos de *Lychnophora ericoides* (Asteraceae) mostrou a presença de 1 a 13 alelos por *locus*, com média de 8,6 alelo por *locus* (Rabelo *et al.* 2011).

Se considerarmos outras espécies de ocorrência no Cerrado brasileiro, há uma grande variação no número de alelos por *locus*. Em *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae), a análise de cinco *loci* em 97 indivíduos pertencentes a três populações permitiu detectar de 3 a 11 alelos por *locus* (Telles *et al.* 2013). Para *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae), foram detectados de 2 a 6 alelos por *locus* na análise de 10 *loci* em 96 indivíduos (Telles *et al.* 2011). Em *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae), um número muito maior de alelos, de 20 a 27 por *locus*, foi observado na análise com 10 marcadores em 10 populações (Collevatti *et al.* 2001).

5.2. TRANSFERABILIDADE DE INICIADORES MICROSSATÉLITES DE *CHRYSOLAENA OBOVATA* EM OUTRAS ESPÉCIES DE ASTERACEAE

O sucesso na transferabilidade de iniciadores microssatélites entre espécies é uma consequência da homologia nas sequências flangeadoras dos microssatélites, sendo esperado que alguns marcadores não amplifiquem em decorrência de mutações nessas regiões, resultantes de processos evolutivos. Como consequência destas mutações, os microssatélites podem surgir em outros sítios e com sequências repetitivas diferentes da espécie para a qual foram gerados inicialmente (Peakall *et al.* 1998).

Os microssatélites genômicos desenvolvidos a partir de *C. obovata* demonstraram um elevado grau de transferabilidade entre diversas espécies de Asteraceae do Cerrado. Isto sugere que as regiões que flanqueiam as sequências SSRs, identificadas nesta biblioteca, são bem conservadas entre as espécies estudadas, mesmo pertencendo a tribos mais distantes filogeneticamente de Vernoniae, à qual *C. obovata* pertence. Estudos prévios relataram altas taxas de transferência dentro de um táxon, com o declínio de sucesso na transferabilidade com o aumento da distância genética (Por exemplo: Saha *et al.* 2006, Barbará *et al.* 2007, Chapman *et al.* 2007, Chapman *et al.* 2009). No entanto, todos os pares de iniciadores descritos neste trabalho amplificaram em pelo menos cinco espécies de Asteraceae e, embora de um modo geral as taxas de sucesso tenham diminuído com o aumento da distância evolutiva, isto não foi constante para todos os marcadores e espécies analisados (Figura 1). Por exemplo, a porcentagem de marcadores amplificados em Heliantheae (88,9%), tribo mais distante de Vernoniae, foi maior do que a da tribo Gnaphalieae (77,8%), que é mais próxima filogeneticamente. No entanto, é importante ressaltar que o número de espécies testada para cada tribo não foi o mesmo e que essa diferença pode ter contribuído para a maior ou menor porcentagem de transferabilidade em determinada tribo. Esse é o caso, por exemplo, da tribo Polymnieae, que apresentou baixa porcentagem de transferabilidade (apenas 11,1%), mas teve uma

única espécie testada (*S. sonchifolius*). Outro aspecto a ser levado em conta é que a transferência bem-sucedida não depende somente da relação filogenética entre as espécies, mas também de outros fatores como tamanho e complexidade do genoma e região na qual os microsatélites estão localizados (codificadoras ou não codificadoras) (Oliveira *et al.* 2006, Barbará *et al.* 2007).

Alguns estudos na família Asteraceae têm evidenciado o potencial de transferabilidade de *locus* microsatélites não codificantes e expressos entre espécies taxonomicamente relacionadas, como observado para o gênero *Hypochaeris* (Ruas *et al.* 2009, Lúcio *et al.* 2011, Chaves *et al.* 2015) e para o gênero *Helianthus* (Pashley *et al.* 2006). Vários estudos com espécies do Cerrado têm evidenciado uma alta taxa de transferabilidade dos *loci* microsatélites entre espécies. Collevatti *et al.* (1999) testaram a transferabilidade de 10 *loci* desenvolvidos para *Caryocar brasiliense* em cinco espécies do mesmo gênero, indicando o alto nível de homologia entre o genoma destas espécies. Doze dos 14 SSR desenvolvidos para *Anarcadium occidental* (caju) foram transferidos para *A. humile* (cajuzinho do Cerrado), sendo utilizados com sucesso para a geração de dados genéticos da espécie (Soares *et al.* 2013). Ciampi *et al.* (2008) desenvolveram nove *loci* microsatélites para *Hymenaea courbaril* (jatobá) e destes, sete (77,8%) foram transferidos para *H. stigonocarpa* (jatobá-do-cerrado), duas espécies nativas, sendo a primeira de ocorrência na Mata Atlântica, e a segunda, no Cerrado. Os iniciadores desenvolvidos no presente trabalho apresentaram uma alta porcentagem de tranferabilidade entre espécies de diferentes gêneros, que variou entre 29,4 e 94,1%, indicando seu potencial de aplicação em estudos genéticos de outras espécies da família Asteraceae. No entanto, para tal é necessário que o polimorfismo dos mesmos seja testado em um maior número de indivíduos de cada espécie e que diferentes populações sejam avaliadas.

Nossos resultados também indicam um elevado potencial de transferência dos marcadores microsatélites na mesma tribo (100%) e entre tribos mais distantes (de 55,5 a 88,8%) da família Asteraceae, como já tinha sido reportado anteriormente por outros autores para táxons menos próximos dentro desta família (Chapman *et al.* 2007, Chapman *et al.* 2009, Vít *et al.* 2015). Este é um resultado importante, pois os iniciadores desenvolvidos neste trabalho podem contribuir para o estudo de espécies de Asteraceae, diminuindo o custo e tempo necessários para o desenvolvimento de iniciadores específicos para cada espécie. Esta contribuição se torna ainda mais relevante se considerarmos que há poucos estudos de transferabilidade em espécies nativas e endêmicas (Barbará *et al.* 2007) e que a família Asteraceae é a maior dentre as plantas vasculares, com mais de 23 mil espécies distribuídas em todos os continentes, excetuando a Antártica (Funk *et al.* 2005).

Embora *C. obovata* não seja uma espécie ameaçada de extinção, a revisão da Lista Vermelha da Flora Brasileira (Fundação Biodiversitas 2007) indica 165 espécies de Asteraceae sob ameaça, sendo que 63,6% destas se encontram no bioma Cerrado (Nakajima *et al.* 2012). Este fato é bastante

preocupante, sobretudo se considerarmos o alto grau de endemismo no Cerrado e que os campos rupestres abrigam grande número de espécies endêmicas de Asteraceae (Giulietti *et al.* 2005). Desta forma, estudos de florística, associados a estudos de diversidade genética de espécies de Asteraceae ameaçadas de extinção, são importantes para definir áreas prioritárias para conservação. Neste sentido, os marcadores de *C. obovata* aqui disponibilizados podem ser usados para determinação do grau de diversidade genética das populações remanescentes dessas espécies.

5.3. DIVERSIDADE GENÉTICA

A diversidade genética é matéria prima para a evolução adaptativa das espécies. O estudo desta diversidade e sua distribuição dentro e entre populações naturais e seus parentes cultivados é fundamental para gerar programas de conservação e exploração de espécies com importância econômica e/ou em perigo de extinção (Varshney *et al.* 2005).

Na revisão feita por Nybom (2004), com base em estudos de diversidade genética com microsatélites (SSR), a média de diversidade genética (H) para plantas com características similares às de *C. obovata* foi de 0,68 para espécies perenes, de 0,65 para espécies com distribuição regional e espécies com polinização cruzada e de 0,61 para espécies dispersas pelo vento. *C. obovata* apresentou uma diversidade moderada ($H = 0,46$) com valores de 0,35 a 0,48 nas diferentes populações, compatível com suas características e forma de vida (espécie perene, subarbusto e alógama), as quais apresentam valores mais baixos de diversidade do que as plantas lenhosas ou com características e forma de vida diferentes (Hamrick *et al.* 1992).

De acordo com as revisões clássicas de Hamrick & Godt (1989, 1996) e Loveless & Hamrick (1984), a distribuição geográfica tem um efeito significativo sobre os níveis de diversidade genética e representa a maior proporção da variação da mesma, juntamente com o sistema reprodutivo. Espécies de distribuição regional (populações presentes em uma região geográfica ou em uma grande porção de um continente) tendem a ter baixos níveis de diversidade genética, entre 60 e 64% menor, quando comparadas com as espécies de distribuição ampla. Considerando a distribuição regional e o sistema reprodutivo (tanto sexuado como vegetativo) de *Chrysolaena obovata*, um moderado nível de diversidade genética já era esperado, sendo o caso, tanto em nível de população quanto de espécie.

O modo de reprodução é a melhor estimativa de diversidade genética vegetal (Glémin *et al.* 2006). Apesar da ausência de estudos de polinização e dispersão de sementes em *C. obovata*, a ocorrência de auto-incompatibilidade e polinização por insetos (abelhas grandes e médias e sem polinizadores exclusivos) já foi reportada para algumas espécies subarbusivas e herbáceas do gênero *Vernonia* (Ex. *V. bardanoides*, *V. brevipeziolata*, *V. ferruginea* e *V. brevipeziolata*) de ocorrência nos campos rupestres de Uberlândia (MG) (Barbosa 1997). Além disso, a morfologia

dos frutos (cipselas ou aquênios) de *C. obovata* (ex. *V. herbacea*) com pápus piloso (Martins & Oliveira 2007) sugere a dispersão anemocórica. Tendo em conta este contexto, as características da biologia reprodutiva de *C. obovata* também podem estar influenciando a distribuição e diversidade genética da espécie, como já discutido por diferentes autores em populações de plantas (Hamrick & Loveless 1989, Holsinger 2000, De Lacerda *et al.* 2008), considerando que espécies com polinização por animais e dispersão pelo vento têm níveis moderados de diversidade genética quando comparadas com espécies de auto-fecundação que possuem baixos níveis (Loveless & Hamrick 1984, Nybom 2004). Adicionalmente, espécies com sistema de reprodução misto e com predominância da reprodução clonal possuem níveis de diversidade genética moderados a altos, mantidos através da reprodução sexual (Ellstrand & Roose 1987).

Estudos com outras espécies de Asteraceae utilizando marcadores microssatélites mostraram uma ampla gama de valores de diversidade genética. Análises de diversidade utilizando microssatélites de regiões expressas em espécies herbáceas do gênero *Helianthus*, revelaram diversidade genética moderada em *H. argophyllus* ($H = 0,48$), espécie de distribuição regional, e alta em *H. annuus* ($H = 0,68$) e *H. petiolaris* ($H = 0,71$) espécies com distribuição ampla (Kane *et al.* 2009). Os autores atribuem a menor diversidade genética de *H. argophyllus* a um menor tamanho efetivo populacional, em função de sua distribuição geográfica restrita e prováveis gargalos genéticos em sua história de vida, quando comparada com espécies de ampla distribuição que podem ter maior tamanho efetivo populacional em sua história de vida recente (Kane *et al.* 2009).

Em *Cirsium arvense*, uma erva invasora de ampla distribuição com sistema de reprodução misto (sexuada e assexuada), foi encontrada uma alta diversidade genética ($H = 0,936$) em populações distribuídas na América do Norte, a qual foi atribuída pelos autores à ampla distribuição geográfica, grande variedade ambiental, grande tamanho populacional, reprodução sexuada e introdução de novos genótipos pelo homem (Bodo Slotta *et al.* 2010). Estudos de diversidade com microssatélites de regiões expressas em duas espécies de girassol revelaram moderada diversidade genética em *Helianthus verticillatus* Small. ($H = 0,48$), uma espécie rara e ameaçada, e baixa diversidade em *H. angustifolius* L. ($H = 0,35$), que apresenta ampla distribuição (Ellis *et al.* 2006). Os autores explicam a diversidade genética encontrada em *H. verticillatus* em função de algumas características de sua história de vida (planta perene e de reprodução clonal) e sugerem que as populações dessa espécie podem não ter sido submetidas a extensa perda de variação por efeitos de fragmentação, como deriva genética e endogamia (Ellis *et al.* 2006).

Ao comparar a diversidade genética encontrada para *C. obovata* neste trabalho com a encontrada para outras espécies do Cerrado, os valores são próximos aos encontrados para *Hypochaeris*

catharinensis (Asteraceae) ($H = 0,48$), uma herbácea, endêmica da região Sul do Brasil, em estudo realizado com 13 populações na área de distribuição da espécie e com nove iniciadores SSR. Segundo os autores, esses valores moderados de diversidade genética podem estar relacionados ao sistema de reprodução misto da espécie e provável efeito fundador (Chaves 2013). Zucchi *et al.* (2003), utilizando sete *loci* microssatélites polimórficos, descreveram uma H de 0,442 ao analisar 10 populações de *Eugenia dysenterica* no Cerrado. Valores de diversidade mais elevados foram reportados para *Caryocar brasiliense* ($H = 0,87$) (Collevatti *et al.* 2010) e *Myracrodruon urundeuva* (H de 0,93 a 0,96) (Viegas *et al.* 2011), mostrando que não há um padrão na diversidade genética observada para diferentes espécies de Cerrado.

Ao comparar a diversidade genética (H) e riqueza alélica (A_R) das populações estudadas (Tabela 7) é importante ressaltar que as populações que apresentaram menor H e A_R foram as populações do estado de São Paulo (MG e SB) as quais, apesar de localizadas em Unidades de Conservação, foram coletadas em locais com maior grau de degradação, em comparação aos locais de coleta das demais populações, visível pela dominância de gramíneas invasoras e proximidade com o plantio de espécies exóticas (pinus e eucalipto) (Melo & Durigan 2011, Giudice Neto *et al.* 2015). A degradação do habitat pode levar à diminuição do número de indivíduos (como observado no campo durante nossas coletas) e, provavelmente, das populações de polinizadores (Aizen & Feinsinger 1994), causando redução e isolamento das populações e diminuição da variabilidade genética (Murcia 1996). Porém, a população de Brasília também se encontra em uma área degradada (observações no campo, população em beira de estrada vicinal, indivíduos muito dispersos, proximidade com moradias), mas apresentou os maiores níveis de H e A_R , o que sugere que o grau de degradação não está relacionado com estes parâmetros de diversidade genética em *C. obovata* ou que a perturbação desse ambiente é recente e foi posterior ao estabelecimento da população, ainda não sendo visíveis os impactos sobre a diversidade genética da mesma.

O coeficiente de endogamia (F_{IS}) apresentou valores negativos em todos os *loci* estudados dentro das populações ($F_{IS} = -0,220$) e no conjunto das populações de *C. obovata*, indicando um excesso de heterozigotos e, conseqüentemente, desvios significativos do EHW (Ivey & Richards 2001, Vasseur 2001, Jump *et al.* 2003). A exceção foi o *locus* Vh10 ($F_{IT} = 0,079$), cujo valor positivo reflete um excesso de homozigotos, o qual pode ser devido à presença de alelos nulos encontrados neste *locus*, os quais são o resultado de possíveis mutações nos locais de hibridação dos iniciadores (Callen *et al.* 1993) nas populações de Serra Dourada e Serra dos Pireneus. Os resultados indicam que a endogamia é baixa ou ausente, ou ainda que há forças seletivas atuando a favor dos indivíduos heterozigotos nas populações (Holsinger & Weir 2009). Esses resultados podem ser explicados pela vantagem na taxa de sobrevivência que podem apresentar os genótipos

heterozigotos (Lesica & Allendorf 1992, Oostermeijer *et al.* 1994, Lesica & Allendorf 1995) combinada com seleção clonal (perda gradual de genótipos, devido por exemplo a pressão seletiva, fazendo com que só genótipos com crescimento vigoroso permaneçam; Schaal & Leverich 1996). De acordo com Balloux *et al.* (2003) uma alta taxa de reprodução clonal leva a um excesso significativo de heterozigotos, fazendo com que a possível perda de diversidade genética da espécie não seja observada. Apesar de não haver estudos sobre o(s) tipo(s) de polinização de *C. obovata*, a baixa endogamia também poderia ser explicada pela auto-incompatibilidade, sendo essa uma das estratégias reprodutivas mais comuns na família Asteraceae (Richards 1997), mas ainda não confirmada para a espécie.

Resultados similares foram observados em *Caryocar brasiliense*, uma árvore de ampla distribuição no Cerrado e de polinização cruzada, tendo sido observado excesso de heterozigotos dentro e no total das populações desta espécie ($f = -0,449$ e $F = -0,420$), indicando forças de seleção atuando a favor dos heterozigotos (Melo Júnior *et al.* 2004). Jump *et al.* (2003) encontraram variações na porcentagem de excesso de heterozigotos em populações de três espécies herbáceas perenes do gênero *Cirsium*, sendo de 7% em *C. acaule*, de 56 a 69% em *C. arvense* e de 48 a 52% em *C. heterophyllum*. As variações nas porcentagens foram atribuídas às diferenças nos níveis de reprodução clonal, que são altos em *C. heterophyllum* e *C. arvense* quando comparados com os de *C. acaule*, indicando que o excesso de heterozigotos nestas espécies pode ser resultante de vantagens do heterozigoto e seleção clonal.

5.4. ESTRUTURA GENÉTICA POPULACIONAL

A estrutura genética das populações naturais pode ser o resultado da interação de fatores ecológicos (distribuição geográfica, história de vida, sistema reprodutivo, etc.) e forças evolutivas (deriva genética, fluxo gênico, seleção natural) que são responsáveis pela distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações (Hamrick 1983, Loveless & Hamrick 1984, Ellstrand & Elam 1993, Hamrick & Godt 1996, Balloux & Lugon-Moulin 2002).

De acordo com o modelo de Wright (1951) as estimativas de estrutura genética populacional em *Chrysolaena obovata* indicam que a diferenciação entre as populações estudadas é moderada, porém significativa ($F_{ST} = 0,087$; $P < 0,001$). Este valor de diferenciação populacional é semelhante ao reportado em outros estudos de populações de plantas (Petit *et al.* 2005b) e esperado para plantas de vida longa e com fertilização cruzada (Nybom 2004). Os resultados da análise de AMOVA confirmam a baixa diferenciação entre as sete populações amostradas, sendo que a diversidade é principalmente observada dentro das populações (96,25% $P < 0,001$). Resultados semelhantes foram obtidos pela análise de AMOVA hierárquica, na qual as populações foram divididas de acordo com a fitofisionomia do Cerrado (96,21% $P < 0,01$).

A árvore gerada pelo método de *Neighbor-joining* (NJ) a partir das distâncias genéticas de Nei (1972), mostra que as populações de *C. obovata* formaram dois agrupamentos, sendo que as populações com maior distância geográfica e genética entre si estavam no primeiro agrupamento (MC-SB-SD) e as populações com maior proximidade genética e geográfica estavam no segundo agrupamento (SP-BRA e MG-UB), mas com valor de *bootstrap* baixo (52%). Essa informação permite confirmar que a correlação positiva e significativa observada entre as matrizes de distância genética e distância geográfica ($r^2 = 0,2312$ $P < 0,05$; Figura 12), apesar de baixa, corrobora a noção do modelo de fluxo gênico e baixo isolamento por distância. Por conseguinte, pode-se sugerir que a baixa divergência genética existente entre as populações amostradas não está fortemente estruturada no espaço geográfico, mas que há uma tendência de estruturação, exigindo novas análises em maior escala (maior número de populações) para verificar se a mesma se mantém. Isto foi confirmado pela análise de coordenadas principais (PCoA), que é referida na literatura como uma análise útil para detectar a presença de estruturação em conjuntos de dados com F_{ST} baixos a moderados, como os encontrados neste estudo ($F_{ST} = 0,03 - 0,11$; Reeves & Richards 2009). Essa análise mostrou a sobreposição dos indivíduos F_{ST} das sete populações amostradas, indicando novamente a proximidade genética entre elas. Porém, é possível observar a formação de dois grupos pouco definidos, cada um contendo maior número de indivíduos de um ou outro agrupamento formado na árvore de *Neighbor-joining* (NJ).

Os resultados da análise Bayesiana foram consistentes com os resultados da PCoA e da árvore de NJ, identificando três grupos genéticos distintos, sendo o 1º agrupamento (azul) muito conservado em todas as populações, o 2º agrupamento (vermelho) tende a aumentar latitudinalmente nas populações de campos rupestres (MC, SP, BRA e SD) e o 3º agrupamento (verde) é maior nas populações de MG, UB, SB e MC, confirmando a baixa diferenciação genética das populações.

De acordo com Hamrick & Godt (1989), Balloux & Lugon-Moulin (2002), Nybom (2004), Duminil *et al.* (2009), a biologia reprodutiva é o fator mais importante na determinação da estrutura genética de populações de plantas. Outros fatores como a perenidade e a forma de crescimento das plantas podem afetar indiretamente as estatísticas de estruturação, mas somente quando associados ao sistema de reprodução (Duminil *et al.* 2009). De fato, espécies de polinização cruzada tendem a apresentar entre 10% e 20% de variação genética entre as populações, enquanto espécies com autopolinização apresentam, em média, 50%. Adicionalmente, espécies auto-incompatíveis e tipicamente alógamas também apresentam a maior parte da variação genética dentro das populações (Hamrick & Godt 1989, Duminil *et al.* 2007). Assim, a alta variabilidade genética dentro das populações e baixa diferenciação entre populações encontrada neste estudo poderia ser explicada, em parte, pelo sistema de reprodução da espécie. Apesar da ausência de estudos de polinização para

a espécie, as características morfológicas das flores, associadas à maior proporção de diversidade genética encontrada dentro das populações, similar ao encontrado para espécies de polinização cruzada e auto-incompatíveis, nos permite sugerir que *C. obovata* possui polinização cruzada, sendo polinizada por insetos e que seja auto-incompatível. Plantas dessa espécie apresentam uma alta porcentagem de fertilidade dos grãos de pólen (97,46%, Via do Pico & Dematteis 2012), mas um baixo número de sementes viáveis (Sasaki *et al.* 1999), sendo que a baixa produção de sementes viáveis pode resultar da moderada variabilidade genética e da presença de mecanismos de auto-incompatibilidade. Outro fator a ser levado em conta é a dispersão anemocórica das cipselas de *C. obovata* (Martins & Oliveira 2007), pois esse tipo de dispersão de sementes aumenta a variação intra-populacional (Loveless & Hamrick 1984, Nybom 2004), sendo que o vento pode promover a dispersão de sementes à longa distância e que a migração de uma pequena semente em longas distâncias é capaz de prevenir a divergência populacional (Tackenberg *et al.* 2003).

A baixa estruturação populacional encontrada neste estudo também pode estar relacionada à distribuição dos indivíduos e ao alto número de genótipos *multilocus* encontrados nas populações amostradas (dados não apresentados), que sugere que a introdução de novos genes é frequente. Deve-se considerar que a fertilização cruzada pode manter os níveis de variabilidade nas populações (Hamrick 1983), enquanto o fluxo gênico, promovido pelo movimento de pólen e sementes, pode reduzir as diferenças entre elas (Loveless & Hamrick 1984, Hamrick *et al.* 1992, Ellstrand 2014).

As populações de *C. obovata* neste trabalho estão distantes uma da outra entre 90 e 897 km. Uma das razões que pode ter contribuído para a baixa estruturação observada nestas populações pode ser o fluxo gênico. O valor aqui encontrado ($Nm = 2,62$) é alto de acordo com Govindajaru (1989, *apud* Zucchi *et al.* 2003) que distinguiu o fluxo gênico em três níveis: alto ($Nm > 1$), intermediário ($0,25 < Nm < 0,99$) e baixo ($Nm < 0,25$). Foi observada menor divergência nas populações quanto maior o fluxo gênico entre elas, sendo que as populações com menor F_{ST} entre elas (BRA – SP; $F_{ST} = 0,03$) foram as que apresentaram o maior fluxo gênico ($Nm = 5,2$) e são as mais próximas geograficamente (90 km). Porém, esta estimativa referi-se a um fluxo gênico histórico, pois algumas populações estudadas encontram-se a grandes distâncias, sendo praticamente impossível a existência de fluxo gênico atual entre elas. Os resultados obtidos com o programa *Migrate-n* (Figura 11) confirmam a existência de fluxo gênico entre as populações estudadas, o qual pode ser classificado como modelo de ilha (Futuyma 1992), mas com tendência à estruturação e isolamento por distância, sendo que a população de Uberlândia representa uma importante ponte entre as populações das duas fitofisionomias. No entanto, estudos genéticos com maior número de populações são necessários para testar esta hipótese.

Ao considerar a longevidade de *C. obovata*, a presença de alelos privados em seis das sete populações estudadas e a fragmentação recente do Cerrado (principalmente na década de 1970; Almeida *et al.* 1998), também podemos sugerir que a semelhança genética entre populações seja o reflexo da estrutura genética destas antes da fragmentação do Cerrado, e não dos altos níveis de fluxo gênico contemporâneo. Para se detectar as consequências genéticas da degradação ou fragmentação do habitat (Cerrado), que resultaria em isolamento das populações (estruturação) e alterações nos níveis de fluxo gênico e perda de diversidade (Young *et al.* 1996, Nason *et al.* 1997, Nason & Hamrick 1997), seria necessário um tempo mais longo de estudo. No entanto, estudos detalhados da biologia reprodutiva desta espécie, fluxo gênico e análises de paternidade são necessários para testar essa hipótese.

As populações em equilíbrio de mutação-deriva tem igual probabilidade de que um *locus* apresente excesso ou déficit de heterozigosidade, ao considerar o tamanho efetivo das populações que no passado recente se manteve constante (Cornuet & Luikart 1996). As análises para detecção de efeito gargalo nas populações estudadas de *C. obovata* indica o equilíbrio entre mutação-deriva em todas as populações. Uma possível explicação seria o fluxo gênico aparente estimado ($N_m = 2,62$), pois segundo Wright (1951), os valores estimados de N_m para espécies tropicais são geralmente maiores que 1,0, indicando que quando houver um ou mais indivíduos migrantes por geração, o efeito da migração é suficiente para contrapor o efeito da deriva (De Lacerda *et al.* 2008). Além disso, a deriva genética, que diminui a variabilidade genética de maneira inversamente proporcional ao tamanho efetivo da população a cada geração, é menos pronunciada em espécies de plantas clonais (Fischer *et al.* 2000), pois só pode ocorrer com a morte de uma geração e sua substituição pela seguinte, fazendo com que a manutenção dos genótipos através dos clones contribua para a conservação da variabilidade genética em longo prazo (Ayres & Ryan 1999).

A maior diferenciação genética encontrada entre a população de Santa Bárbara e as populações de Mogi-Guaçu e Uberlândia ($F_{ST} = 0,12$) populações espacialmente próximas quando comparadas com as demais (225 e 413 Km respectivamente), poderia ser explicada apenas pela limitação de fluxo gênico entre elas (SB-MG, $N_m = 1,3$; SB-UB, $N_m = 1,4$). No entanto, apesar dos microssatélites serem considerados marcadores neutros, casos de diferenciação de populações próximas tem sido associados a fatores de seleção (Linhart & Grant 1996).

As áreas do Cerrado como um todo têm sofrido profundas transformações de natureza antrópica, apresentando crescente processo de degradação (Ratter *et al.* 1997). A moderada diferenciação genética encontrada nas populações estudadas sugere que não é necessário um grande número de populações para preservar a diversidade genética de *C. obovata*. Além disso, sua ampla distribuição, plasticidade fenotípica e sua capacidade de reprodução em diferentes ambientes

contribui para que esta espécie não esteja ameaçada de extinção. No entanto, os resultados obtidos neste estudo mostraram que as populações de Mogi-Guaçu e Santa Barbara apresentam os menores níveis de diversidade genética e, em função disso, sugerimos que maior atenção seja dada a estas populações, com a inclusão das mesmas em programas de conservação *ex-situ*, tendo em vista a presença de alelos privados nestas populações e o maior grau de degradação dessas Unidades de Conservação.

5.5. TEOR DE FRUTANOS NOS RIZÓFOROS

Carvalho & Dietrich (1993) descreveram o crescimento sazonal de *Chrysolaena obovata* o qual foi associado às variações no conteúdo e composição de frutanos nos rizóforos, sendo que alterações nos valores totais e tamanho das moléculas de frutanos foram observadas nas diferentes fases fenológicas da planta. No presente trabalho, as populações de *C. obovata* de Serra Dourada e Serra dos Pirineus, que se encontravam na fase vegetativa, apresentaram maior conteúdo de frutanos e menor de açúcar redutor, principalmente glucose, do que os indivíduos das populações de Brasília e Uberlândia nos dois segmentos do rizóforo, sobretudo no segmento distal. Essas características são consistentes com a fase fenológica em que se encontravam, caracterizadas por um período de biossíntese e não de mobilização destes carboidratos (Moraes *et al.* 2016). Estes resultados têm sido relatados para esta fase do desenvolvimento em plantas de *C. obovata* quando os órgãos aéreos estão totalmente estabelecidos, pois os fotoassimilados produzidos em excesso à demanda de utilização pela planta são translocados para os rizóforos, ativando a síntese de frutanos (Carvalho & Dietrich 1993, Asega & Carvalho 2004, Portes & Carvalho 2006, Portes *et al.* 2008, Rigui *et al.* 2015).

Quanto às populações de Brasília e Uberlândia, cujas plantas se encontravam em floração na época da coleta, apresentaram menor conteúdo de frutanos em relação ao encontrado nas populações de SD e SP, e conteúdo de açúcares redutores, principalmente frutose, superior ao das populações em fase vegetativa. Este maior teor foi confirmado nos perfis cromatográficos, nos quais se observa uma maior quantidade de frutose principalmente e glicose e uma diminuição na quantidade de frutanos de alto GP, principalmente nos segmentos proximais, sugerindo a ocorrência de hidrólise e mobilização de frutanos dos rizóforos para a parte aérea, sendo este um forte dreno metabólico para o desenvolvimento floral. De acordo com Carvalho & Dietrich (1993), Carvalho *et al.* (1997), entre as fases de brotação e floração ocorre um declínio no conteúdo de frutanos, indicando a mobilização dos mesmos para suprir a demanda energética da planta durante o crescimento da parte aérea e desenvolvimento das inflorescências após da fase de dormência.

Os resultados obtidos nas quatro populações analisadas neste trabalho são semelhantes ao que foi descrito para a espécie crescendo naturalmente: no Cerrado da Estação Ecológica Mogi-Guaçu (SP) por Rigui *et al.* (2015) e Carvalho & Dietrich (1993) e em campos rupestres na Serra de Itacambira (MG) por Cangussu (2012), e em vasos com ambiente controlado e diferentes variáveis como por exemplo baixas temperaturas (Portes *et al.* 2008, Asega *et al.* 2011), seca (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004, Garcia *et al.* 2011), elevadas concentrações de CO₂ atmosférico (Oliveira *et al.* 2010), e efeitos do estresse hídrico (Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004, Garcia *et al.* 2011) entre outros, nos quais se observou o mesmo padrão: síntese de frutanos na fase vegetativa e degradação na fase de brotação e floração.

Embora as coletas nas populações estudadas tenham sido feitas em fases fenológicas diferentes, ao comparar os resultados dos teores de frutanos e os perfis cromatográficos com os dados encontrados na literatura (Carvalho & Dietrich 1993, Cangussu 2012, Rigui *et al.* 2015), verificou-se que as alterações na composição de frutanos encontradas foram semelhantes, e ocorrem ao longo de todo o ciclo fenológico, em todas as populações desta espécie já estudadas.

O metabolismo de frutanos está associado à capacidade de suportar temperaturas baixas e falta de água (Livingston *et al.* 2009) e tem sido proposto como um traço evolutivo e adaptativo antigo que poderia explicar o sucesso e sobrevivência das Asteraceae em ambientes sazonalmente secos e frios (Hendry 1994). Nossos resultados sugerem que o metabolismo de frutanos é bem conservado na espécie, sendo que sua presença parece ser evolutivamente vantajosa e estaria contribuindo para aumentar a sobrevivência e capacidade adaptativa de *C. obovata* aos diversos ambientes aos quais a espécie está exposta no Cerrado, principalmente o déficit hídrico característico do inverno neste ecossistema.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este é o primeiro conjunto de marcadores microssatélites desenvolvidos para *Chrysolaena obovata*, uma espécie de Asteraceae não modelo, nativa, com ampla distribuição no Cerrado e que apresenta alto potencial para a produção de inulina.

A biblioteca genômica enriquecida em marcadores microssatélites, desenvolvida para *C. obovata*, foi bastante eficiente, sendo que 93% das sequências analisadas apresentaram regiões microssatélites. Foi possível demonstrar um alto potencial de transferabilidade dos marcadores microssatélites desenvolvidos para *C. obovata* em outras espécies de Asteraceae, inclusive de tribos distantes de Vernonieae, tribo à qual pertence *C. obovata*. Desta forma, os marcadores isolados e caracterizados nesse trabalho poderão ser utilizados para aumentar o conhecimento da diversidade genética de outras espécies de Asteraceae nativas ou endêmicas do cerrado, algumas delas ameaçadas de extinção.

As populações de *C. obovata* estudadas apresentam níveis moderados de diversidade genética, distribuída majoritariamente dentro das populações. Os coeficientes de endogamia negativos encontrados indicam um excesso de heterozigotos e sugerem a existência de mecanismos seletivos atuando a favor dos heterozigotos, e uma taxa de endogamia baixa ou ausente, possivelmente por auto-incompatibilidade polínica associada à alta taxa de reprodução clonal na espécie.

A correlação entre as matrizes de distância genética e geográfica sugere que a variabilidade das sete populações de *C. obovata* está pouco estruturada no espaço geográfico. Foram observados níveis altos de fluxo gênico estimado entre as populações e uma complexa rede de migração entre as populações estudadas.

Considerando os altos níveis de variabilidade genética intrapopulacional de *Chrysolaena obovata* e mesmo esta não sendo considerada uma espécie ameaçada de extinção, as populações do estado de São Paulo estudadas se encontram em áreas com alto grau de perturbação e apresentam os menores níveis de diversidade genética, razão pela qual devem ser consideradas como prioritárias em planos de conservação *ex situ*.

O metabolismo de frutanos estudado em quatro populações de *C. obovata* apresenta o mesmo padrão já descrito na literatura para plantas em campo ou em casa de vegetação, sendo um metabolismo bem conservado nesta espécie. Tendo em vista a importância desse metabolismo para o *fitness* da espécie, relacionado a uma maior tolerância a estresses abióticos, a estabilidade do mesmo pode consistir em vantagem adaptativa para *C. obovata*, contribuindo para sua ampla distribuição e seu estabelecimento e manutenção em diferentes fitofisionomias do Cerrado.

Os resultados encontrados neste trabalho diferem dos esperados para a espécie em função do conhecimento prévio de algumas de suas características biológicas e geram novos questionamentos: i) como a fragmentação do Cerrado afeta a diversidade genética da espécie?; ii) a moderada diversidade genética encontrada em *C. obovata* é característica da espécie ou tem diminuído ao longo de sua história de vida? Para responder a estas perguntas, novos estudos devem ser desenvolvidos, contemplando um maior número de populações e agregando informações sobre a biologia reprodutiva da espécie, dispersão de sementes, estimativas de fluxo gênico direto, entre outros, que sirvam como ferramenta para aumentar o conhecimento sobre a diversidade genética da espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Ambiental de Goiás & Nativa.** 2002. Parque Estadual dos Pireneus - Relatório Inicial: contextualização do parque, Agência Ambiental de Goiás, Goiânia.
- Aizen, M.A. & Feinsinger, P.** 1994. Habitat fragmentation, native insect pollinators, and feral honey bees in Argentine 'Chaco Serrano'. *Ecological Applications* 4: 378-392.
- Allen, G.C., Flores-Vergara, M.A., Krasynanski, S., Kumar, S. & Thompson, W.F.** 2006. A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissues using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature protocols* 1: 2320-2325.
- Almeida, A.M., Fonseca, C.R., Prado, P.I., Almeida-Neto, M., Diniz, S., Kubota, U., Braun, M.R., Raimundo, R.L.G., Anjos, L.A. & Mendonça, T.G.** 2005. Diversidade e ocorrência de Asteraceae em cerrados de São Paulo. *Biota Neotropica* 5: 27-43.
- Almeida, S.P., Proença, C.E.B., Sano, S.M. & Ribeiro, J.F.** 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC. pp. 464.
- Appezato-da-Glória, B., Cury, G., Kasue Misaki Soares, M., Rocha, R. & Hissae Hayashi, A.** 2008. Underground systems of Asteraceae species from the Brazilian Cerrado 1. *The Journal of the Torrey Botanical Society* 135: 103-113.
- Asega, A.F. & Carvalho, M.A.M.** 2004. Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 313-319.
- Asega, A.F., do Nascimento, J.R.O. & Carvalho, M.A.M.** 2011. Increased expression of fructan 1-exohydrolase in rhizophores of *Vernonia herbacea* during sprouting and exposure to low temperature. *Journal of Plant Physiology* 168: 558-565.
- Asega, A.F., do Nascimento, J.R.O., Schroeven, L., Van den Ende, W. & Carvalho, M.A.M.** 2008. Cloning, characterization and functional analysis of a 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant and cell physiology* 49: 1185-1195.
- Ayres, D.R. & Ryan, F.J.** 1999. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques. *American Journal of Botany* 86: 344-353.
- Balloux, F., Lehmann, L. & de Meeûs, T.** 2003. The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* 164: 1635-1644.
- Balloux, F. & Lugon-Moulin, N.** 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155-165.

- Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G.M., Bered, F., Fay, M.F. & Lexer, C.** 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* 16: 3759-3767.
- Barbosa, A.A.A.** 1997. Biologia reprodutiva de uma comunidade de campo sujo, Uberlândia–MG. Tese de Doutorado em Biologia Vegetal - Curso de Pós-graduação em Biologia. Universidade Estadual de Campinas. pp. 180.
- Barbosa, M.A.** 2008. O Ecoturismo e a sustentabilidade - Parque Estadual da Serra Dourada - GO (PESD). Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia. pp. 104.
- Beerli, P.** 2009. How to use MIGRATE or why are Markov chain Monte Carlo programs difficult to use. *Population genetics for animal conservation* 17: 42-79.
- Beerli, P. & Felsenstein, J.** 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 4563-4568.
- Belini, C.M.B., Marques, M.O.M., Figueira, G.M., Bajay, M.M., Campos, J.B., Viana, J.P.G., Pinheiro, J.B. & Zucchi, M.I.** 2016. Characterization of microsatellite markers for *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Applications in Plant Sciences* 4: 150093.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F.** 2000. Genetix, a windows™ based software for population genetic analyses. Laboratoire génome, populations, interactions CNRS UMR 5000. In Université de Montpellier II, Montpellier, France. <http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>
- Bertoni, B.W., Souza, A.V., Biondo, R., França, S.C., Telles, M.P.C. & Pereira, M.A.S.** 2010. Genetic diversity among natural populations of *Mandevilla velutina*. *Horticultura Brasileira* 28: 209-213.
- Billotte, N., Lagoda, P.J.L., Risterucci, A.M. & Baurens, F.C.** 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277-288.
- Bittencourt, J.V.M. & Sebbenn, A.M.** 2007. Patterns of pollen and seed dispersal in a small, fragmented population of the wind-pollinated tree *Araucaria angustifolia* in southern Brazil. *Heredity* 99: 580-591.
- Bodo Slotta, T.A., Foley, M.E., Chao, S., Hufbauer, R.A. & Horvath, D.P.** 2010. Assessing genetic diversity of Canada thistle (*Cirsium arvense*) in North America with microsatellites. *Weed Science* 58: 387-394.
- Borlaug, N.E.** 2002. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 38: 221-228.

- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. & Davis, R.W.** 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics* 32: 314-331.
- Braga, A.C., Reis, A.M.M., Leoi, L.T., Pereira, R.W. & Collevatti, R.G.** 2007. Development and characterization of microsatellite markers for the tropical tree species *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae). *Molecular Ecology Notes* 7: 53-56.
- Buso, G.S.C., Ciampi, A.Y., Moretzsohn, M.C., Amaral, Z.P.S. & Brondani, R.V.** 2003. Marcadores microssatélites em espécies vegetais. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 7: 46-50.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, R.I., Mulley, J.C. & Sutherland, G.R.** 1993. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American journal of human genetics* 52: 922-927.
- Cangussu, L.M.B.** 2012. Variação sazonal do acúmulo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby sob condições de campo rupestre. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Montes Claros. pp. 46.
- Cardoso, E., Moreno, M.I.C., Bruna, E.M. & Vasconcelos, H.L.** 2010. Mudanças fitofisionômicas no cerrado: 18 anos de sucessão ecológica na estação ecológica do panga, Uberlândia-MG. *Caminhos de Geografia* 10: 254-268.
- Carvalho, M.A.M., Asega, A.F., Figueiredo-Ribeiro, R., Norio, S., Nouredine, B. & Shuichi, O.** 2007. Fructans in Asteraceae from the Brazilian cerrado. *Recent advances in fructooligosaccharides research*: 69-91.
- Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.M.C.** 1993. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Veil.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735-740.
- Carvalho, M.A.M., Pinto, M.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21: 275-280.
- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C.** 1997. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. *New Phytologist* 136: 153-161.
- Chalmers, K.J., Waugh, R., Sprent, J.I., Simons, A.J. & Powell, W.** 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69: 465-465.

- Chapman, M.A., Chang, J., Weisman, D., Kesseli, R.V. & Burke, J.M.** 2007. Universal markers for comparative mapping and phylogenetic analysis in the Asteraceae (Compositae). *Theoretical and Applied Genetics* 115: 747-755.
- Chapman, M.A., Hvala, J., Strever, J., Matvienko, M., Kozik, A., Michelmore, R.W., Tang, S., Knapp, S.J. & Burke, J.M.** 2009. Development, polymorphism, and cross-taxon utility of EST-SSR markers from safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 120: 85-91.
- Chase, M.R., Moller, C., Kesseli, R. & Bawa, K.S.** 1996. Distant gene flow in tropical trees. *Nature* 383: 398-399.
- Chaves, C.L.** 2013. Estrutura genética de populações de *Hypochoeris catharinensis* Cabrera (Asteraceae) utilizando marcadores de microssatélites. Centro de Ciências Agrárias. Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Estadual de Londrina. pp. 69.
- Chaves, C.L., Ruas, C.F., Ruas, P.M., Schneider, A.A., Rocha, K.R., Urtubey, E. & Ruas, E.A.** 2015. Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite loci for *Hypochoeris catharinensis* (Asteraceae) and cross-amplification in related species. *Journal of genetics* 94: e39-e42.
- Ciampi, A.Y., Azevedo, V.C.R., Gaiotto, F.A., Ramos, A.C.S. & Lovato, M.B.** 2008. Isolation and characterization of microsatellite loci for *Hymenaea courbaril* and transferability to *Hymenaea stigonocarpa*, two tropical timber species. *Molecular ecology resources* 8: 1074-1077.
- Clarke, K.R. & Gorley, R.N.** 2001. Primer V5 (Plymouth routines in multivariate ecological research): user manual/tutorial. Primer-E. pp. 91.
- Clarke, K.R. & Warwick, R.M.** 1994. Change in Marine Communities: An approach to statistical analysis and interpretation. PRIMER-E, Plymouth, UK. 2nd. pp. 172.
- Cockerham, C.C.** 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-84.
- Collevatti, R.G., Brondani, R.V. & Grattapaglia, D.** 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity* 83: 748-756.
- Collevatti, R.G., Estolano, R., Garcia, S.F. & Hay, J.D.** 2010. Short-distance pollen dispersal and high self-pollination in a bat-pollinated neotropical tree. *Tree Genetics & Genomes* 6: 555-564.
- Collevatti, R.G., Grattapaglia, D. & Hay, J.D.** 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 349-356.

- Collevatti, R.G., Grattapaglia, D. & Hay, J.D.** 2003. Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. *Molecular Ecology* 12: 105-115.
- Cornuet, J.M. & Luikart, G.** 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Cota, L.G., Moreira, P.A., Menezes, E.V., Gomes, A.S., Ericsson, A.R.O., Oliveira, D.A. & Melo Jr, A.F.** 2012. Transferability and characterization of simple sequence repeat markers from *Anacardium occidentale* to *A. humile* (Anacardiaceae). *Genetics and Molecular Research* 11: 4609-4616.
- Coutinho, L.M.** 1977. Aspectos ecológicos do fogo no cerrado. II - As queimadas e a dispersão de sementes em algumas espécies anemocóricas do estrato herbáceo-subarbustivo. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 5: 57-64.
- Coutinho, L.M.** 1980. As queimadas e seu papel ecológico. *Brasil Florestal* 10: 15-23.
- Coutinho, L.M.** 2000. O bioma do cerrado. In: A.L. Klein (ed.). *Eugen Warming e o cerrado brasileiro um século depois*. São Paulo: Unesp. pp. 77-91.
- Coutinho, L.M.** 2006. O conceito de bioma. *Acta Botanica Brasilica* 20: 13-23.
- Crow, J.F. & Aoki, K.** 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81: 6073-6077.
- Cuzzuol, G.R.F., Carvalho, M.A.M., Barbedo, C.J. & Zaidan, L.B.P.** 2003. Crescimento e conteúdo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas à adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Botânica* 26: 81-91.
- Cuzzuol, G.R.F., Carvalho, M.A.M. & Zaidan, L.B.P.** 2008. Fructan production in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby is related to adequate nitrogen supply and period of cultivation. *Brazilian Journal of Botany* 31: 95-103.
- Davies, N., Villablanca, F.X. & Roderick, G.K.** 1999. Determining the source of individuals: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 17-21.
- De Lacerda, B.E., André, Kanashiro, M. & Sebbenn, A.M.** 2008. Long-pollen Movement and Deviation of Random Mating in a Low-density Continuous Population of a Tropical Tree *Hymenaea courbaril* in the Brazilian Amazon. *Biotropica* 40: 462-470.
- Dematteis, M.** 2009. Revisión taxonómica del género sudamericano *Chrysolaena* (Vernonieae, Asteraceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 44: 103-170.

- Dematteis, M.** 2015. *Chrysolaena* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB104805>>. (Acesso em: 18 janeiro 2015).
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M. & Freimer, N.B.** 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 3166-3170.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Carvalho, M.A.M. & Dietrich, S.** 1999. Fructan variation in the rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby, as influenced by temperature. *Brazilian Journal of Botany* 22: 267-273.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Itaya, N.M., Carvalho, M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Dietrich, S.** 2004. Fructans and water suppression on intact and fragmented rhizophores of *Vernonia herbacea*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47: 363-373.
- Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Jordano, P., Salvini, D., Vendramin, G.G. & Petit, R.J.** 2007. Can population genetic structure be predicted from life-history traits?. *The American Naturalist* 169: 662-672.
- Duminil, J., Hardy, O.J. & Petit, R.J.** 2009. Plant traits correlated with generation time directly affect inbreeding depression and mating system and indirectly genetic structure. *BMC Evolutionary Biology* 9: 1-14.
- Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L.** 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-2581.
- Earl, D.A. & Vonholdt, B.M.** 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- Ellegren, H.** 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews: Genetics* 5: 435-445.
- Ellis, J.R., Pashley, C.H. & McCauley, D.E.** 2006. High genetic diversity in a rare and endangered sunflower as compared to a common congener. *Molecular Ecology* 15: 2345-2355.
- Ellstrand, N.C.** 2014. Is gene flow the most important evolutionary force in plants? *American Journal of Botany* 101: 737-753.
- Ellstrand, N.C. & Elam, D.R.** 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- Ellstrand, N.C. & Roose, M.L.** 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* 74: 123-131.

- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J.** 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S.** 2005. ARLEQUIN ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- Felfili, J.M. & da Silva, M.C.** 1993. A comparative study of Cerrado (sensu stricto) vegetation in Central Brazil. *Journal of Tropical Ecology* 9: 277-289.
- Felfili, J.M. & Silva Júnior, M.C.** 2005. Diversidade alfa e beta no cerrado sensu stricto, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais e Bahia. In: A. Scariot, J.C. Sousa-Silva, J.M. Felfili, Orgs. (eds.). Cerrado, ecologia, biodiversidade e conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. pp. 143-154.
- Felfili, J.M., Sousa-Silva, J.C. & Scariot, A.** 2005. Biodiversidade, ecologia e conservação do Cerrado: avanços do conhecimento. In: A. Scariot, J.C. Sousa-Silva, J.M. Felfili (eds.). Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília, Ministério do Meio Ambiente. pp. 25-44.
- Felsenstein, J.** 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5 c. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 33: 19-56.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D.** 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-Cenargen, Brasília. pp. 220.
- Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1993. Distribuição, aspectos estruturais e funcionais dos frutanos, com ênfase em plantas herbáceas do cerrado. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 5: 203-208.
- Fischer, M., Husi, R., Prati, D., Peintinger, M., Van Kleunen, M. & Schmid, B.** 2000. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* 87: 1128-1137.
- Frankham, R., Briscoe, D.A. & Ballou, J.D.** 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. pp. 617.
- Fundação Biodiversitas.** 2007. Revisão das listas das espécies da flora e da fauna ameaçadas de extinção do estado de Minas Gerais 1. pp. 36.
- Funk, V.A., Bayer, R.J., Keeley, S., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., Schilling, E., Panero, J.L., Baldwin, B.G., Garcia-Jacas, N., Susanna, A. & Jansen, R.K.** 2005. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. In: I. Friis, H. Balslev (eds.). *Plant Diversity and Complexity Patterns—Local, Regional and Global Dimensions*. Biol. Skr. pp. 343-373.
- Funk, V.A., Susanna, A., Stuessy, T.F. & Robinson, H.** 2009. Classification of compositae. In: V.A. Funk, A. Susanna, T.F. Stuessy, R.J. Bayer (eds.). *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*. Sheridan Books Ann Arbor. pp. 171-192.

- Futuyma, D.J.** 1992. *Biologia Evolutiva*: Sociedade Brasileira de Genética. CNPq Ribeirão Preto. pp. 646.
- Gao, C., Ren, X., Mason, A.S., Li, J., Wang, W., Xiao, M. & Fu, D.** 2013. Revisiting an important component of plant genomes: microsatellites. *Functional Plant Biology* 40: 645-661.
- Gao, H., Cai, S., Yan, B., Chen, B. & Yu, F.** 2009. Discrepancy variation of dinucleotide microsatellite repeats in eukaryotic genomes. *Biological research* 42: 365-375.
- Garcia, P.M.A., Asega, A.F., Silva, E.A. & Carvalho, M.A.M.** 2011. Effect of drought and re-watering on fructan metabolism in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 664-670.
- Garcia, P.M.A., Hayashi, A.H., Silva, E.A.d., Figueiredo-Ribeiro, R.d.C.L. & Carvalho, M.A.M.** 2015. Structural and metabolic changes in rhizophores of the Cerrado species *Chrysolaena obovata* (Less.) Dematt. as influenced by drought and re-watering. *Frontiers in plant science* 6: 1-13.
- Giudice Neto, J., Mecca, P.M., Rossi, L., Penteado Zaidan, L.B., Suarez, M.I., Brum, P.P.R. & Alves de Godoi, G.E.** 2015. Plano de manejo da Estação Ecológica e Reserva Biológica de Mogi-Guaçu. pp. 609
- Giulietti, A.M., Harley, R.M., Queiroz, L.P., Wanderley, M.G.L. & Pirani, J.R.** 2000. Caracterização e endemismos nos campos rupestres da Cadeia do Espinhaço. In: T.B. Cavalcanti, B.M. Walter (eds.). *Tópicos Atuais em Botânica*. pp. 311-318.
- Giulietti, A.N.A., Harley, R.M., De Queiroz, L.P., Wanderley, M.D.G.L. & Van Den Berg, C.** 2005. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conservation Biology* 19: 632-639.
- Glémin, S., Bazin, E. & Charlesworth, D.** 2006. Impact of mating systems on patterns of sequence polymorphism in flowering plants. *Proceedings of the Royal Society of London B-Biological Sciences* 273: 3011-3019.
- Godoy, J.A.** 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Revista Ecosistemas* 18: 23-33.
- Godt, M.J.W., Hamrick, J.L. & Bratton, S.** 1995. Genetic diversity in a threatened wetland species, *Helonias bullata* (Liliaceae). *Conservation Biology* 9: 596-604.
- Gomes, P.C.B.** 2003. Plano da bacia hidrográfica do rio Mogi Guaçu. Plano da bacia hidrografica do rio Mogi Guacu. EDUFSCAR. pp. 1-23.
- Gonçalves, L.O.** 2011. Desenvolvimento de microssatélites e caracterização de populações naturais de *Erythrina velutina* Willd com marcadores ISSR. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais – Núcleo de Pós- Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Sergipe. pp. 45.

- Haber, L.H., Cavallari, M.M., Santos, F.R.C., Marques, M.O.M., Gimenes, M.A. & Zucchi, M.I.** 2009. Development and characterization of microsatellite markers for *Lychnophora pinaster*: a study for the conservation of a native medicinal plant. *Molecular ecology resources* 9: 811-814.
- Hamrick, J.L.** 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: C. M. Schonewald-Cox, S. M. Chambers, B. MacBryde, W.L. Thomas. (eds.). *Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California, USA. pp. 335-348.
- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W.** 1989. Allozyme diversity in plant species. In: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, B.S. Weir (eds.). *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Associates: Sunderland, MA. pp. 43-63.
- Hamrick, J.L. & Godt, M.J.W.** 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 351: 1291-1298.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W. & Sherman-Broyles, S.L.** 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6: 95-124.
- Hamrick, J.L. & Loveless, M.D.** 1989. The genetic structure of tropical tree populations: Association with reproductive biology. In: J.H. Bock., Y.B. Linhart (eds.). *Plant evolutionary biology*. Boulder, Colo.: Westview Press. pp. 131 - 146.
- Hamrick, J.L. & Murawski, D.A.** 1991. Levels of allozyme diversity in populations of uncommon neotropical tree species. *Journal of Tropical Ecology* 7: 395-399.
- Hardy, O.J., Maggia, L., Bandou, E., Breyne, P., Caron, H., Chevallier, M.H., Doligez, A., Dutech, C., Kremer, A. & Latouche-Hallé, C.** 2006. Fine-scale genetic structure and gene dispersal inferences in 10 Neotropical tree species. *Molecular Ecology* 15: 559-571.
- Haridasan, M.** 2007. Solos. In: J.M. Felfili, A.V. Rezende, M.C. Silva Júnior (eds.). *Biogeografia do bioma Cerrado- Chapada dos Veadeiros*. Ed. UnB, Brasília. . pp. 27-43.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G.** 1997. *Principles of population genetics*. Fourth edition ed. Sinauer associates Sunderland. pp. 650.
- Hayashi, A.H. & Appezzato-da-Glória, B.** 2005. The origin and anatomy of rhizophores in *Vernonia herbacea* and *V. platensis* (Asteraceae) from the Brazilian Cerrado. *Australian Journal of Botany* 53: 273-279.
- Hedrick, P.** 2011. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury Massachusetts. pp. 675.
- Hendry, G.A.F.** 1996. Fructan and the ecology and evolution of the Compositae. In: P.D.S. Caligari, D.J.N. Hind (eds.). *Compositae: Biology & Utilization*. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew. 1994, 2: 121-128. Royal Botanic Garden, Kew.

- Holsinger, K.E.** 2000. Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 7037-7042.
- Holsinger, K.E. & Gottlieb, L.D.** 1991. Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. In: D.A. Falk, K.E. Holsinger (eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York, USA. pp. 195-208.
- Holsinger, K.E. & Weir, B.S.** 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews Genetics* 10: 639-650.
- Huang, X. & Madan, A.** 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9: 868-877.
- Isagi, Y., Saito, D., Kawaguchi, H., Tatenno, R. & Watanabe, S.** 2007. Effective pollen dispersal is enhanced by the genetic structure of an *Aesculus turbinata* population. *Journal of Ecology* 95: 983-990.
- Ivey, C.T. & Richards, J.H.** 2001. Genetic diversity of everglades sawgrass, *Cladium jamaicense* (Cyperaceae). *International Journal of Plant Sciences* 162: 817-825.
- Jakobsson, M. & Rosenberg, N.A.** 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801-1806.
- Jermyn, M.A.** 1956. A new method for determining ketohexoses in the presence of aldohexoses. *Nature* 177: 38-39.
- Jiménez, P. & Collada, C.** 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Forest Systems* 9: 237-248.
- Joaquim, E.d.O., Figueiredo-Ribeiro, R.d.C.L., Hayashi, A.H. & Carvalho, M.A.M.d.** 2014. Inulin contents and tissue distribution in underground storage organs of Asteraceae species from the Brazilian rocky fields. *Botany* 92: 827-836.
- Jump, A.S., Woodward, F.I. & Burke, T.** 2003. *Cirsium* species show disparity in patterns of genetic variation at their range-edge, despite similar patterns of reproduction and isolation. *New Phytologist* 160: 359-370.
- Kalinowski, S.T.** 2005. Hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes* 5: 187-189.
- Kane, N.C., King, M.G., Barker, M.S., Raduski, A., Karrenberg, S., Yatabe, Y., Knapp, S.J. & Rieseberg, L.H.** 2009. Comparative genomic and population genetic analyses indicate highly porous genomes and high levels of gene flow between divergent *Helianthus* species. *Evolution* 63: 2061-2075.

- Karp, A.** 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. Bioversity International. pp. 47.
- Klink, C.A. & Machado, R.B.** 2005. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1: 147-155.
- Koskinen, M.T., Hirvonen, H., Landry, P.A. & Primmer, C.R.** 2004. The benefits of increasing the number of microsatellites utilized in genetic population studies: an empirical perspective. *Hereditas* 141: 61-67.
- Lacerda, D.R., Acedo, M.D., Filho, J.P. & Lovato, M.B.** 2001. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from the Brazilian Cerrado. *Molecular Ecology* 10: 1143-1152.
- Lander, T.A., Boshier, D.H. & Harris, S.A.** 2010. Fragmented but not isolated: contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered Chilean tree. *Biological Conservation* 143: 2583-2590.
- Latouche-Hallé, C., Ramboer, A., Bandou, E., Caron, H. & Kremer, A.** 2004. Long-distance pollen flow and tolerance to selfing in a neotropical tree species. *Molecular Ecology* 13: 1055-1064.
- Le Guen, V., Gay, C., Xiong, T.C., Souza, L.M., Rodier-Goud, M. & Seguin, M.** 2011. Development and characterization of 296 new polymorphic microsatellite markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Breeding* 130: 294-296.
- Lesica, P. & Allendorf, F.W.** 1992. Are small populations of plants worth preserving? *Conservation Biology* 6: 135-139.
- Lesica, P. & Allendorf, F.W.** 1995. When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology* 9: 753-760.
- Linhart, Y.B. & Grant, M.C.** 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27: 237-277.
- Livingston, D.P., Hinch, D.K. & Heyer, A.G.** 2009. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 2007-2023.
- Loveless, M.D. & Hamrick, J.L.** 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65-95.
- Lu, Y., Cheng, T., Zhu, T., Jiang, D., Zhou, S., Jin, L., Yuan, Q. & Huang, L.** 2015. Isolation and characterization of 18 polymorphic microsatellite markers for the “Female Ginseng” *Angelica sinensis* (Apiaceae) and cross-species amplification. *Biochemical Systematics and Ecology* 61: 488-492.

- Lúcio, C.C.F., Ruas, E.A., Rodrigues, L.A., Ruas, P.M., Vidotto, T., De Souza, L.B., Matzenbacher, N.I. & Ruas, C.F.** 2011. Characterization of 12 microsatellite loci for *Hypochaeris chillensis* (Asteraceae) and cross-amplification in related species. *American Journal of Botany* 98: e262-e264.
- Machado, R.B., Ramos Neto, M.B., Pereira, P.G.P., Caldas, E.F., Gonçalves, D.A., Santos, N.S., Tabor, K. & Steininger, M.** 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. *Conservation International do Brasil*, Brasília. pp. 23.
- Manoel, L.C.** 1999. Composição florística, fitossociologia e estado nutricional de comunidades arbóreas de um cerrado rupestre e um cerrado ralo na Serra Dourada–Goiás. Dissertação de Mestrado. Departamento de Biologia. Universidade Federal de Goiás (UFG). pp. 61.
- Mantovani, W. & Martins, F.R.** 1988. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu, Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 11: 101-102.
- Martins, K., Chaves, L., Buso, G.S.C. & Kageyama, P.** 2006. Mating system and fine-scale spatial genetic structure of *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) in the Brazilian Cerrado. *Conservation Genetics* 7: 957-969.
- Martins, M.A.G. & Oliveira, D.M.T.** 2007. Morfoanatomia comparada dos frutos em desenvolvimento de *Vernonia brevifolia* Less. e *V. herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae). *Revista Brasileira de Botânica* 30: 101-112.
- Matocq, M.D. & Villablanca, F.X.** 2001. Low genetic diversity in an endangered species: recent or historic pattern? *Biological Conservation* 98: 61-68.
- Medeiros, M.B. & Miranda, H.S.** 2008. Post-fire resprouting and mortality in cerrado woody plant species over a three-year period. *Edinburgh Journal of Botany* 65: 53-68.
- Meira Neto, J.A.A., Martins, F.R. & Valente, G.E.** 2007. Composição florística e espectro biológico na Estação Ecológica de Santa Bárbara, estado de São Paulo, Brasil. *Revista Árvore* 31: 907-922.
- Melo, A.C.G. & Durigan, G.** 2011. Plano de Manejo da Estação Ecológica de Santa Bárbara. Instituto Florestal/SEMA, São Paulo. pp. 222.
- Melo Júnior, A.F., Carvalho, D., Póvoa, J.S.R. & Bearzoti, E.** 2004. Estrutura genética de populações naturais de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Scientia Forestalis* 66: 56-65.
- Mendonça, R.C., Felfili, J.M., Walter, B.M.T., Silva Júnior, M.C., Rezende, A.V., Filgueiras, T.S. & Nogueira, P.E.** 1998. Flora vascular do Cerrado. In: S.M. Sano, S.P. Almeida (eds.). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina: EMBRAPA/CPAC pp. 289-539.
- Mendonça, R.C., Felfili, J.M., Walter, B.M.T., Silva-Júnior, M.C., Rezende, A.V., Filgueiras, T.S., Nogueira, P.E. & Fagg, C.W.** 2008. Flora vascular do Bioma Cerrado: checklist

- com 12.356 espécies. In: S.M. Sano, S.P. Almeida, J.F. Ribeiro (eds.). Cerrado: ecologia e flora. pp. 421-442.
- Merritt, B.J., Culley, T.M., Avanesyan, A., Stokes, R. & Brzyski, J.** 2015. An empirical review: characteristics of plant microsatellite markers that confer higher levels of genetic variation. *Applications in Plant Sciences* 3: 1500025.
- Miranda, S.C., da Silva Júnior, M.C. & Salles, L.A.** 2015. A comunidade lenhosa de cerrado rupestre na Serra Dourada, Goiás. *Heringeriana* 1: 43-53.
- Mondini, L., Noorani, A. & Pagnotta, M.A.** 2009. Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity* 1: 19-35.
- Moraes, G.M., Carvalho, M.A.M., Franco, A.C., Pollock, C.J. & Figueiredo-Ribeiro, Rita de Cássia L.** 2016. Fire and drought: soluble carbohydrate storage and survival mechanisms in herbaceous plants from the Cerrado. *Bioscience* 66: 107-117.
- Morand, M.E., Brachet, S., Rossignol, P., Dufour, J. & Frascaria-Lacoste, N.** 2002. A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations. *Molecular Ecology* 11: 377-385.
- Morden, C.W. & Loeffler, W.** 1999. Fragmentation and genetic differentiation among subpopulations of the endangered Hawaiian mint *Haplostachys haplostachya* (Lamiaceae). *Molecular Ecology* 8: 617-625.
- Moreno, M.A., Tarazi, R., Ferraz, E.M. & Gandara, F.B.** 2009. Estrutura genética espacial em populações de *Hymenaea stigonacarpa* Mart. ex Hayne mediante a utilização de marcadores microssatélites cloroplastidiais. *Scientia Forestalis* 37: 513-523.
- Moreno, M.I.C., Schiavini, I. & Haridasan, M.** 2008. Fatores edáficos influenciando na estrutura de fitofisionomias do Cerrado. *Caminhos de Geografia* 9: 173-194.
- Morgante, M. & Olivieri, A.M.** 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The plant journal* 3: 175-182.
- Moura, N.F., Chaves, L.J., Vencovsky, R., Naves, R.V., de Aguiar, A.V. & Moura, M.F.** 2011. Genetic structure of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) populations in the cerrado region of central Brazil. *Bioscience Journal* 27: 473-481.
- Munhoz, C.B.R. & Felfili, J.M.** 2007. Reproductive phenology of an herbaceous-subshrub layer of a Savannah (Campo Sujo) in the Cerrado Biosphere Reserve I, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 67: 299-307.
- Murcia, C.** 1996. Forest fragmentation and the pollination of neotropical plants. *Forest Patches in Tropical Landscapes*. Island Press, London. pp. 19-33.

- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B. & Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nakajima, J.N., Junqueira, T.V., Freitas, F.S. & Teles, A.M.** 2012. Comparative analysis of red lists of the Brazilian flora: Asteraceae. *Rodriguésia* 63: 039-054.
- Nakajima, J.N., Loeuille, B., Heiden, G., Dematteis, M., Hattori, E.K.O., Magenta, M.A.G., Ritter, M.R., Mondin, C.A., Roque, N., Ferreira, S.C., *et al.*** 2016. Asteraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB55>>. (Acesso em: 18 Jan 2016).
- Nason, J.D., Aldrich, P.R. & Hamrick, J.L.** 1997. Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. *Tropical Forest Remnants: Ecology Management and Conservation of Fragmented Communities*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois. pp. 304-320.
- Nason, J.D. & Hamrick, J.L.** 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of neotropical canopy trees. *Journal of Heredity* 88: 264-276.
- Nei, M.** 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei, M.** 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70: 3321-3323.
- Nei, M.** 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of human genetics* 41: 225-233.
- Nei, M.** 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press. pp. 512.
- Neves, S.P.S. & Conceição, A.A.** 2010. Campo rupestre recém-queimado na Chapada Diamantina, Bahia, Brasil: plantas de rebrota e sementes, com espécies endêmicas na rocha. *Acta Botanica Brasilica* 24: 697-707.
- Newton, A.C., Allnutt, T.R., Gillies, A.C.M., Lowe, A.J. & Ennos, R.A.** 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 140-145.
- Noyes, R.D.** 2007. Apomixis in the Asteraceae: diamonds in the rough. *Functional plant science and biotechnology* 1: 207-222.
- Nybom, H.** 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Nybom, H. & Bartish, I.V.** 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3: 93-114.

- Ohta, T. & Kimura, M.** 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetical Research* 22: 201-204.
- Oliveira, E.J., Pádua, J.G., Zucchi, M.I., Vencovsky, R. & Vieira, M.L.C.** 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294-307.
- Oliveira, J.B., Camargo, M.N., Rossi, M., Calderano Filho, B., da Silva, L.F., Carvalho Filho, R., Melo, A.A.O.d., Rico, M.A., Bourne, W.C. & Rico, M.A.** 1999. Mapa pedológico do Estado de São Paulo: legenda expandida. Campinas: Instituto Agrônomo/EMBRAPA Solos. pp. 64.
- Oliveira, V.F., Zaidan, L.B.P., Braga, M.R., Aidar, M.P.M. & Carvalho, M.A.M.** 2010. Elevated CO₂ atmosphere promotes plant growth and inulin production in the Cerrado species *Vernonia herbacea*. *Functional Plant Biology* 37: 223-231.
- Oliveira-Filho, A.T. & Ratter, J.A.** 2002. Vegetation physiognomies and woody flora of the cerrado biome. In: P.S. Oliveira, R.J. Marquis (eds.). *The Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna*. Columbia University Press New York, New York, USA. pp. 91-120.
- Oostermeijer, J.G.B., Van Eijck, M.W. & Den Nijs, J.C.M.** 1994. Offspring fitness in relation to population size and genetic variation in the rare perennial plant species *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae). *Oecologia* 97: 289-296.
- Paniego, N., Echaide, M., Muñoz, M., Fernández, L., Torales, S., Faccio, P., Fuxan, I., Carrera, M., Zandomeni, R. & Suárez, E.Y.** 2002. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome* 45: 34-43.
- Park, S.** 2008. MStools v 3.1.1: Excel Spreadsheet Toolkit for Data Conversion. . Animal Genomics Lab, University College, Dublin, Ireland. Available at (<http://animalgenomics.ucd.ie/sdeparck/ms-toolkit/>).
- Pashley, C.H., Ellis, J.R., McCauley, D.E. & Burke, J.M.** 2006. EST databases as a source for molecular markers: lessons from *Helianthus*. *Journal of Heredity* 97: 381-388.
- Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W., Morgante, M. & Rafalski, A.** 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1275-1287.
- Peakall, R.O.D. & Smouse, P.E.** 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Peel, M.C., Finlayson, B.L. & McMahon, T.A.** 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences Discussions* 4: 439-473.

- Pérez de la Vega, M. & García, P.** 2000. Análisis de la variación genética en las poblaciones. In: F. Nuez, J.M. Carillo (eds.). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. pp. 409-440.
- Petit, R.J., Deguilloux, M., Chat, J., Grivet, D., Garnier-Géré, P. & Vendramin, G.G.** 2005a. Standardizing for microsatellite length in comparisons of genetic diversity. *Molecular Ecology* 14: 885-890.
- Petit, R.J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D. & Vendramin, G.G.** 2005b. Invited review: comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 689-701.
- Pinto, M.M., Giudice Neto, J., Parente, P.R. & Silva, D.A.** 2009. Unidades de Conservação de Mogi-Guaçu: Diagnóstico ambiental e ações de manejo integrado necessárias à conservação da biodiversidade e uso público. In: M.S.M. Mantovani, R. Glezer (eds.). Parques Urbanos: preservação e lazer nas áreas públicas. pp. 221-236.
- Piry, S., Luikart, G. & Cornuet, J.-M.** 1999. BOTTLENECK: a program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. *Journal of Heredity* 90: 502-503.
- Pollock, C.J., Chatterton, N.J. & Preiss, J.** 1988. Fructans. The biochemistry of plants. A comprehensive treatise 14: 109-140.
- Portes, M.T. & Carvalho, M.A.M.** 2006. Spatial distribution of fructans and fructan metabolizing enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae) in different developmental phases. *Plant Science* 170: 624-633.
- Portes, M.T., Rita de Cássia, L. & de Carvalho, M.A.M.** 2008. Low temperature and defoliation affect fructan-metabolizing enzymes in different regions of the rhizophores of *Vernonia herbacea*. *Journal of Plant Physiology* 165: 1572-1581.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P.** 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Rabelo, S.G., Teixeira, C.F., Telles, M.P.C. & Collevatti, R.G.** 2011. Development and characterization of microsatellite markers for *Lychnophora ericoides*, an endangered Cerrado shrub species. *Conservation Genetics Resources* 3: 741-743.
- Ratter, J.A., Bridgewater, S., Atkinson, R. & Ribeiro, J.F.** 1996. Analysis of the floristic composition of the Brazilian cerrado vegetation II: comparison of the woody vegetation of 98 areas. *Edinburgh Journal of Botany* 53: 153-180.
- Ratter, J.A., Ribeiro, J.F. & Bridgewater, S.** 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of botany* 80: 223-230.
- Reeves, P.A. & Richards, C.M.** 2009. Accurate inference of subtle population structure (and other genetic discontinuities) using principal coordinates. *PLoS One* 4: e4269.

- Reis, M.S.** 1996. Dinâmica da movimentação dos alelos: subsídios para conservação e manejo de populações naturais de plantas. *Brazilian Journal of Genetics* 19: 37-47.
- Ribeiro, J.F. & Walter, B.M.T.** 1998. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: S.M. Sano, S.P. Almeida (eds.). *Cerrado: ambiente e flora*. Embrapa-CPAC Planaltina. pp. 86-166.
- Richards, A.J.** 1997. *Plant breeding systems*. Chapman & Hall, London. pp. 529.
- Rigui, A.P., Gaspar, M., Oliveira, V.F., Purgatto, E. & de Carvalho, M.A.M.** 2015. Endogenous hormone concentrations correlate with fructan metabolism throughout the phenological cycle in *Chrysolaena obovata*. *Annals of botany* 115: 1163-1175.
- Ritsema, T. & Smeekens, S.** 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 223-230.
- Ritter, L.M.O., Bajay, M.M., Monteiro, M., Souza, R.G.V.C., Moreno, M.A. & Kageyama, P.Y.** 2012. Development of microsatellite markers for *Qualea grandiflora* (Vochysiaceae), a typical species of the Brazilian Cerrado. *American Journal of Botany* 99: e97-e98.
- Rivera, V.L.** 2006. Estudos fitogeográficos em *Vernonia* Schreb. *sensu lato* (Asteraceae) no domínio Cerrado. Dissertação de Mestrado. Departamento de Botânica Programa de Pós Graduação em Botânica. Universidade de Brasília, Brasília. pp. 106.
- Rosa, R., Lima, S.d.C. & Assunção, W.L.** 1991. Abordagem preliminar das condições climáticas de Uberlândia (MG). *Sociedade e Natureza* 3: 91-108.
- Rossetto, M., Weaver, P.K. & Dixon, K.W.** 1995. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). *Molecular Ecology* 4: 321-330.
- Ruas, C.F., Nakayama, T.J., Ortiz, M., Kuroki, M.A., Stuessy, T.F., Tremetsberger, K., Ruas, E.A., de Oliveira Santos, M., Talavera, S. & Ruas, P.M.** 2009. Isolation and characterization of eight microsatellite loci from the endangered plant species *Hypochaeris salzmänniana* (Asteraceae). *Conservation Genetics* 10: 1413-1416.
- Saha, M.C., Cooper, J.D., Mian, M.A.R., Chekhovskiy, K. & May, G.D.** 2006. Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1449-1458.
- Salmona, Y.B., Ribeiro, F.F. & Matricardi, E.A.T.** 2014. Parques “no papel” conservam?: o caso do Parque dos Pirineus em Goiás. *Boletim Goiano de Geografia* 34: 295-310.
- Sano, E.E., Rosa, R., Brito, J.L.S. & Ferreira, L.G.** 2007. Mapeamento de cobertura vegetal do bioma Cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados. pp. 30.
- Sano, E.E., Rosa, R., Brito, J.L.S. & Ferreira, L.G.** 2008. Notas Científicas Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília 43: 153-156.

- Santos, L.M.** 2003. Florística e biologia reprodutiva de espécies de Melastomataceae no Parque Estadual da Serra de Caldas Novas e Parque Estadual de Pireneus, Goiás. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília. pp. 159.
- Sasaki, R.M., Rondon, J.N., Zaidan, L.B.P. & Felipe, G.M.** 1999. Germination of seeds from herbaceous plants artificially stored in Cerrado soil. *Revista Brasileira de Biologia* 59: 271-279.
- Schaal, B.A. & Leverich, W.J.** 1996. Molecular variation in isolated plant populations. *Plant Species Biology* 11: 33-40.
- Schiavini, I. & Araújo, G.M.** 1989. Considerações sobre a vegetação da Reserva Ecológica do Panga (Uberlândia). *Sociedade & Natureza* 1: 61-66.
- Schlötterer, C.** 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.
- Schuelke, M.** 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Schulman, A.H.** 2007. Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158: 313-321.
- Silva, F.G.d., Cangussu, L.M.B., Paula, S.L.A., Melo, G.A. & Silva, E.A.** 2013. Seasonal changes in fructan accumulation in the underground organs of *Gomphrena marginata* Seub. (Amaranthaceae) under rock-field conditions. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 25: 46-55.
- Slatkin, M.** 1994. Gene flow and population structure. In: L.A. Real (ed.). *Ecological genetics*. Princeton, NJ: Princeton University Press. pp. 3-17.
- Soares, T.N., Sant'ana, L.L., de Oliveira, L.K., Telles, M.P. & Collevatti, R.G.** 2013. Transferability and characterization of microsatellite loci in *Anacardium humile* A. St. Hil. (Anacardiaceae). *Genetics and Molecular Research* 12: 3146-3149.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-63.
- Sosa, P., Batista, F., González, M.A. & Bouza, N.** 2002. Conservación genética de especies vegetales amenazadas. In: A. Bañares-Baudet (ed.). *Biología de la conservación de plantas amenazadas*. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. pp. 133-160.
- Tackenberg, O., Poschlod, P. & Bonn, S.** 2003. Assessment of wind dispersal potential in plant species. *Ecological Monographs* 73: 191-205.
- Tambarussi, E.V., Sebbenn, A.M., Moreno, M.A., Ferraz, E.M., Kageyama, P.Y. & Vencovsky, R.** 2013. Microsatellite markers for *Cariniana legalis* (Lecythidaceae) and their transferability to *C. estrellensis*. *Applications in Plant Sciences* 1: 1200493.

- Telles, M.P., Peixoto, F.P., Lima, J.S., Resende, L.V., Vianello, R.P., Walter, M.E. & Collevatti, R.G.** 2011. Development of microsatellite markers for the endangered Neotropical tree species *Tibouchina papyrus* (Melastomataceae). *Genetics and Molecular Research* 10: 321-325.
- Telles, M.P., Silva, J.B., Resende, L.V., Vianello, R.P., Chaves, L.J., Soares, T.N. & Collevatti, R.G.** 2013. Development and characterization of new microsatellites for *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae). *Genetics and Molecular Research* 12: 3124-3127.
- Trevisan, F., Chu, E.P., Gaspar, M. & Carvalho, M.A.M.** 2014. In vitro culture and fructan production by *Vernonia herbacea* (Asteraceae). *Acta Physiologiae Plantarum* 36: 2299-2307.
- Trindade, M.d.G. & Chaves, L.J.** 2005. Genetic structure of natural *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) populations in northeastern Goiás, Brazil, accessed by morphological traits and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology* 28: 407-413.
- Valdes, A.M., Slatkin, M. & Freimer, N.B.** 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* 133: 737-749.
- Vale, G.D., Fontes, C.G., Pereira, J.B., Vieira, R.C. & Walter, B.M.T.** 2007. Flora vascular da Fazenda Sucupira-DF-Embrapa Recursos Genéticos Biotecnologia segunda atualização. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. pp. 12.
- Van de Wiel, C., Arens, P. & Vosman, B.** 1999. Microsatellite retrieval in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Genome* 42: 139-149.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P.** 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Varshney, R.K., Graner, A. & Sorrells, M.E.** 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23: 48-55.
- Vasseur, L.** 2001. Allozymic diversity of *Allium tricoccum* (Ait.) Solander var. *burdickii* Hanes in isolated populations of Nova Scotia (Canada). *Plant Systematics and Evolution* 228: 71-79.
- Vazquez-Lobo, A. & Morales, G.A.E.** 2014. Microsatélites. In: R.A. Cornejo, D.A. Serrato, B. Rendón, M.G. Rocha-Munive (eds.). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. pp. 75-100.
- Via do Pico, G.M. & Dematteis, M.** 2012. Chromosome number, meiotic behavior and pollen fertility of six species of *Chrysolaena* (Vernonieae, Asteraceae). *Caryologia* 65: 176-181.
- Viana, H.S. & Alkimim, W.R.R.** 2004. Projeto cadastro de abastecimento por águas subterrâneas, Estados de Minas Gerais e Bahia: Diagnóstico do município de Itacambira, MG, Belo Horizonte, Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais - CPRM. pp. 13.

- Viegas, M.P., Silva, C., Moreira, J.P., Cardin, L.T., Azevedo, V.C.R., Ciampi, A.Y., Freitas, M.L.M., Moraes, M.L.T.d. & Sebbenn, A.M.** 2011. Diversidade genética e tamanho efetivo de duas populações de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All., sob conservação *ex situ*. *Revista Árvore* 35: 769-779.
- Vilhalva, D.A.A. & Appezzato-da-Glória, B.** 2006. Morfoanatomia da raiz tuberosa de *Vernonia oxylepis* Sch. Bip. in Mart. ex Baker-Asteraceae. *Acta Botanica Brasilica* 20: 591-598.
- Vít, P., Šingliarová, B., Zozomová-Lihová, J., Marhold, K. & Krak, K.** 2015. Microsatellite markers for the *Pilosella alpicola* group (Hieraciinae, Asteraceae) and their cross-amplification in other *Hieraciinae* genera. *Applications in Plant Sciences* 3: 1500048.
- Weir, B.S.** 1996. Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data. Sunderland, MA: Sinauer Associates. pp. 445.
- Werpachowski, J.S., Varassin, I.G. & Goldenberg, R.** 2004. Ocorrência de apomixia e partenocarpia em algumas espécies subtropicais de Asteraceae. *Brazilian Journal of Botany* 27: 607-613.
- White, G.M., Boshier, D.H. & Powell, W.** 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Molecular Ecology* 8: 1899-1909.
- White, G.M., Boshier, D.H. & Powell, W.** 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 2038-2042.
- Wright, S.** 1951. The genetical structure of populations *Annals of eugenics* 15: 323-354.
- Wright, S.** 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Yeh, F.C. & Boyle, T.J.** 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* 129: 157-163.
- Young, A., Boyle, T. & Brown, T.** 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 413-418.
- Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T.** 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zhu, Y., Strassmann, J.E. & Queller, D.C.** 2000. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Genetical Research* 76: 227-236.
- Zucchi, M.I., Brondani, R.P.V., Pinheiro, J.B., Brondani, C. & Vencovsky, R.** 2002. Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Molecular Ecology Notes* 2: 512-513.

- Zucchi, M.I., Brondani, R.P.V., Pinheiro, J.B., Chaves, L.J., Coelho, A.S.G. & Vencovsky, R.** 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. *Genetics and Molecular Biology* 26: 449-457.
- Zucchi, M.I., Pinheiro, J.B., Chaves, L.J., Coelho, A.S.G., Couto, M.A., Morais, L.K.d. & Vencovsky, R.** 2005. Genetic structure and gene flow of *Eugenia dysenterica* natural populations. *Pesquisa agropecuária brasileira* 40: 975-980.

ANEXO A

MEIOS E SOLUÇÕES

TAMPÃO PARA EXTRAÇÃO DE DNA (250mL)

Tris 1M (pH:8,0)	25mL
NaCl 5M	70mL
EDTA 0.5M	10mL
CTAB	5g

Adicionar 2% de polivinilpirolidona e 2% de β -mercaptoetanol momentos antes de adicioná-lo à amostra.

TAMPÃO TE (1L)

Tris 1M (pH 8,0)	10 mL
EDTA 0.5 M	2 mL

TAMPÃO TAE 50X (1L)

Tris Base	242,2g
EDTA 0,5M (pH 8,0)	100mL
Ácido Acético Glacial	57,1mL
H ₂ O Milli-Q	1L

Esta solução estoque é diluída 50:1 com água para obter a solução de trabalho 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA).

TAMPÃO SSC 20X (500mL)

NaCl	87,7g
Citrato Trisódico Di-hidratado	44,1g

Ajustar o pH para 7,2 com HCl e ajustar o volume para 500mL.

MEIOS PARA CULTIVO DE BACTÉRIAS

MEIO SOB

Tryptona	20g
Extrato de levedura	5g
NaCl	0,5g
Água milliQ	950mL

Adicionar a essa solução 10 ml de KCl 250 mM e 5 mL de MgCl_2 2M.

Deixar o SOB esfriar e adicionar 20 mL de solução 1M de glicose estéril (esterilizada por filtração).

MEIO LB SÓLIDO

Tryptona	10g
Extrato de levedura	5g
NaCl	10g
Select Agar	15g
H ₂ O Milli-Q	1L

Ajustar o pH para 7,5, autoclavar e armazenar à 4°C.

MEIO 2YT- HMFM (500mL)

Meio 2YT (450 mL)

Tryptona	8g
Extrato de levedura	5g
NaCl	2,5g
Água MilliQ	450mL
Autoclavar.	

Meio 10HMFM (50 ml)

Solução 1 (40 ml)

Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,038g
Citrato de sódio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 3\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,225g
Sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	0,450g

Glicerol	22g
H ₂ O Milli-Q	15mL

Ajustar o volume para 40 mL e filtrar (Filtro 0,22 µ).

Solução 2 (10 ml)

Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0,9g
Fosfato de potássio dibásico (K ₂ HPO ₄)	2,35g
H ₂ O MilliQ	10mL

Autoclavar.

No fluxo laminar, misturar as soluções 1 e 2 (= 10HMFM). Misturar em seguida o meio 2 YT ao 10 HMFM e armazenar a 4°C.

MEIO CIRCLE GROW

Circle Grow	40g
H ₂ O destilada	1L

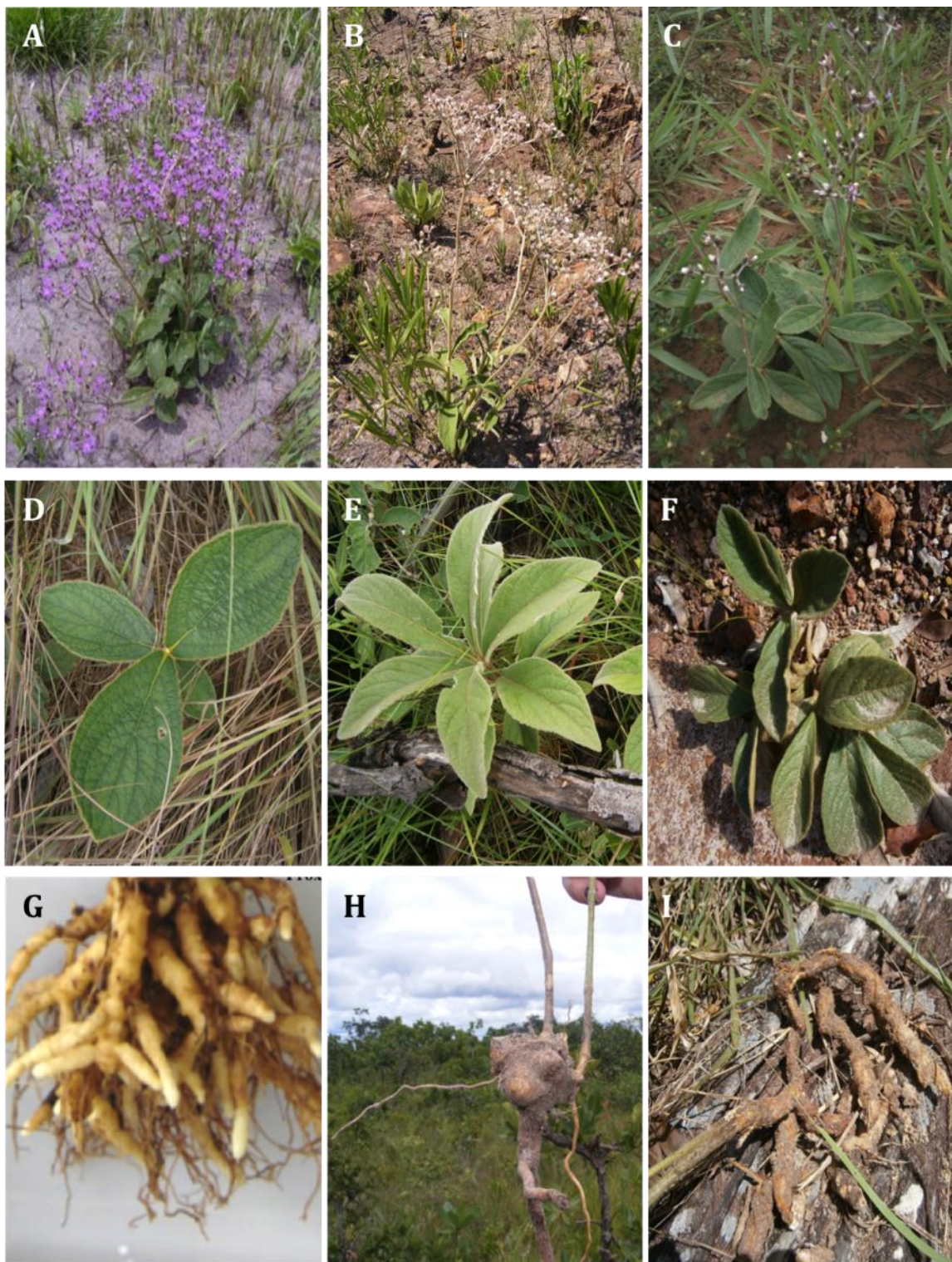
Autoclavar; armazenar a 4°C.

GTE - GLICOSE-TRIS-EDTA

Glicose 20%	23mL
Tris 1 M (pH 7,4)	13mL
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	10mL
H ₂ O Milli-Q	500 mL

Armazenar a 4°C.

ANEXO B



Fotografias da variação fenotípica observada nas populações estudadas de *Chrysolaena obovata* (Less.) Dematt. Indivíduos em fase vegetativa detalhe da forma de crescimento dos indivíduos em: cerrado *sensu stricto* Mogi-Guaçu (**A**); campos rupestres em Brasília (**B**); campos rupestres em Uberlândia (**C**); detalhe da variação na forma, cor e pubescência das folhas em: cerrado *sensu stricto* Santa Bárbara (**D**); campos rupestres na Serra Dourada (**E**); campos rupestres na Serra dos Pireneus (**F**); Detalhe do crescimento dos rizóforos em: cerrado *sensu stricto* (**G**); campos rupestres na Serra Dourada (**H**); campos rupestres na Serra dos Pireneus (**I**).