



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CARINA DE CAMPOS FERREIRA LUCIO

**ESTUDOS GENÉTICOS EM POPULAÇÕES DA ESPÉCIE
HYPOCHAERIS CHILLENSIS (ASTERACEAE) UTILIZANDO
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Londrina
2011



Universidade Estadual De Londrina



Instituto Agronomico Do Paraná



Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária

CARINA DE CAMPOS FERREIRA LUCIO

**ESTUDOS GENÉTICOS EM POPULAÇÕES DA ESPÉCIE
HYPOCHAERIS CHILLENSIS (ASTERACEAE) UTILIZANDO
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Londrina
2011

CARINA DE CAMPOS FERREIRA LUCIO

**ESTUDOS GENÉTICOS EM POPULAÇÕES DA ESPÉCIE
HYPOCHAERIS CHILLENSIS (ASTERACEAE) UTILIZANDO
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudete de Fátima Ruas

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L938e Lucio, Carina de Campos Ferreira..
Estudos genéticos em populações da espécie *Hypochaeris chillensis* (Asteraceae) utilizando marcadores microssatélites / Carina de Campos Ferreira Lucio. – Londrina, 2011.
101 f. : il.

Orientador: Claudete de Fátima Ruas.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Genética de populações – Teses. 2. *Hypochaeris chillensis* – Teses. 3. Marcadores biológicos – Teses. 4. Polimorfismo (Genética) – Teses. 5. Endogamia – Teses. I. Ruas, Claudete de Fátima. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 575.17

CARINA DE CAMPOS FERREIRA LUCIO

**ESTUDOS GENÉTICOS EM POPULAÇÕES DA ESPÉCIE
HYPOCHAERIS CHILLENSIS (ASTERACEAE) UTILIZANDO
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Claudete de Fátima Ruas
UEL – Londrina - PR

Prof^a Dr^a Elisete Pains Rodrigues
UNOPAR – Londrina - PR

Prof^a Dr^a Danielle Cristina Gregorio da Silva
UNOPAR – Londrina - PR

Londrina, 31 de março de 2011.

Dedico esse trabalho aos meus pais, que
sempre batalharam pelos meus estudos!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar, me iluminar e não me deixar desistir nunca.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico pelo apoio financeiro.

À CAPES pela bolsa PNPd (processo no. AUX-PE-PNPd2238/2009), concedida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina. À UEL – Universidade Estadual de Londrina e à Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de estudo.

Aos meus orientadores, professores Dra. Claudete de Fátima Ruas e Dr. Paulo Maurício Ruas, por terem me recebido e confiado na minha capacidade. Em especial à Professora Claudete, por seu empenho e persistência mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha mãe, meu porto-seguro, minha fortaleza.

Ao meu pai, por fazer de tudo por mim e minhas irmãs para que pudéssemos ter um bem precioso: Educação.

Às minhas irmãs, que mesmo distantes sempre estiveram quando eu precisei. Cássia, obrigada pela ajuda!

Aos meus familiares por acreditarem no meu potencial.

Ao Doutor Eduardo Augusto Ruas, pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Aos professores do curso, pelos ensinamentos passados.

Aos meus amigos, de todas as partes, de todos os momentos, por estarem do meu lado.

Às companheiras (irmãs) de república, que fizeram de Londrina meu outro lar: Alana, Ana Paula, Bruna, Lilian, Luana, Tatiane e Viviane.

Ao pessoal do laboratório pelos dias maravilhosos, cheios de alegria e claro por toda ajuda. Em especial às amigas Bruna e Luana, pelo apoio. Um super obrigada à Laís, por dividir comigo as mesmas experiências.

Muito obrigada a todos que me ajudaram a trilhar esse caminho!

LUCIO, Carina de Campos Ferreira. **Estudos genéticos em populações da espécie *Hypochoeris chillensis* (Asteraceae) utilizando marcadores microssatélites**: 2009-2011. 76f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Hypochoeris possui características que o tornam um interessante modelo para estudos evolutivos em plantas. O gênero inclui cerca de 60 espécies que mostram uma distribuição disjunta, incluindo 15 espécies na região do mediterrâneo e mais de 50 na América do Sul, onde o gênero, aparentemente, teve origem a partir de uma única espécie ancestral, através de eventos de dispersão a longa distância. *Hypochoeris chillensis* se destaca por ser o único representante cosmopolita do grupo. Marcadores microssatélites foram desenvolvidos e caracterizados para *H. chillensis* a fim de acessar a diversidade genética e estrutura genética de populações ao longo da área de distribuição da espécie. Um total de 12 pares de *primers* foram isolados e caracterizados, utilizando 50 indivíduos amostrados em três populações de *H. chillensis*. A amplificação via PCR detectou de um a cinco alelos, com uma média de 2,91 alelos por loco. Os 12 pares de *primers* foram testados para a transferência em dez espécies da América do Sul e no ancestral do grupo, *H. angustifolia*. A transferência teve sucesso na maioria das espécies sul-americanas, bem como para alguns *primers* na espécie *H. angustifolia*. Aplicado a outras espécies, esses marcadores são especialmente úteis para compreender os processos de radiação adaptativa e especiação do gênero desde sua chegada na América do Sul. Dez dos 12 *primer* isolados foram usados para investigar a estrutura genética de oito populações brasileiras de *H. chillensis*. Foram identificados um total de 37 alelos, com 80% de polimorfismo e uma média de 3,7 alelos por loco. A estimativa do número médio de alelos e alelos efetivos por população foi de 2,3 e 1,72, respectivamente. Os índices de heterozigosidade observada variaram de 0,14 a 0,44 e a esperada de 0,25 a 0,41. O coeficiente de endogamia (F_{IS}) foi significativo para cinco populações. Foi encontrado um alto grau de diferenciação genética (F_{ST} = 0,3363), com maior parte da variação (66,37%) identificada dentro de populações, o que evidencia a ausência de estruturação genética nas populações estudadas. A análise de distância genética entre pares de populações (F_{ST}), mostrou ausência de correlação entre distância genética e geográfica. O teste de atribuição de indivíduos às populações mostrou uma pequena taxa de migração em apenas duas populações, evidenciando que a maioria dos indivíduos genotipados foram atribuídos às populações das quais foram amostrados. Os baixos índices de variabilidade encontrados provavelmente são decorrentes do modo aparentemente pioneiro em que a espécie coloniza novos ambientes. Os resultados refletem um padrão característico de dispersão a longa distância sugerindo que, após colonização por poucos indivíduos, as novas populações se estabeleceram sob ação de efeito fundador e endogamia.

Palavras-chave: Diversidade genética. Efeito fundador. Marcadores codominantes. SSR.

LUCIO, Carina de Campos Ferreira. **Population genetic studies of *Hypochaeris chillensis* (Asteraceae) using microsatellites makers**: 2009-2011. 76f.
Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

The *Hypochaeris* exhibits many characteristics that make the genus an interesting model for evolutionary studies in plants. It comprises around 60 species with a disjunct distribution, including 15 species the Mediterranean region and possible more than 50 in South America, where the genus apparently derived from a single ancestral species through events of long distance dispersal. *Hypochaeris chillensis* stands out as the only cosmopolitan representative of the group. Microsatellite markers were developed and characterized for *H. chillensis* to assess the genetic diversity and the patterns of genetic structure along the distribution areas of the species. A set of 12 primer pairs were isolated and characterized in a sample of 50 individuals of *H. chillensis*. PCR amplification detected 1-5 alleles, with an average of 2.91 alleles per locus. All primer pairs were tested for cross-amplification in ten additional South American species of *Hypochaeris* and in *H. angustifolia*, recognized as the ancestor of the group. All primer pair resulted in successful amplification in most South American species and some of them in *H. angustifolia*. The microsatellite primers herein described are the first set of molecular markers developed for *H. chillensis* and they have high potential for use in the investigation of genetic structure in populations of this species. These markers will be especially helpful to understand the processes of adaptive radiation and speciation of the genus since it arrived in South America. Ten of the isolated microsatellite loci were used in the investigation of genetic structure of eight Brazilian populations of *H. chillensis*. A total of 37 alleles were detected across all loci, with 80% of polymorphism and an average of 3.7 alleles per locus. The estimate average number of alleles and effective alleles per population were 2.3 and 1.72, respectively. In terms of overall genetic diversity the observed (H_o) and expected heterozygosities ranged from 0.14 to 0.44 and 0.25 to 0.41, respectively. The inbreeding coefficient (F_{IS}) was significant in five populations, showing an excess of heterozygotes. The levels of genetic differentiation was high ($F_{ST}=0.3363$), with most of the genetic variation (66.37%) detected within population. These results are consistent with the lack of genetic structure of the populations. The assignment test revealed that most of the individuals genotyped were attributed to the population in which they were sampled, with migrants detected only between two pairs of populations. There was no positive correlation between pairwise genetic distance (F_{ST}) and geographic distance. The overall results reflect a pattern of long-distance dispersion, suggesting that after colonization by few individuals, the establishment of new populations occurred under influence of founder effects and endogamy.

Key words: Codominant markers. Genetic diversity. Founder effect. SSR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

- Figura 1** - Características morfológicas e ecológicas de *H. chillensis*. (A) folhas basais polimórficas, (B) folhas do ramo, (C) capítulo, visão lateral da flor (D), visão superior da flor (E), ambiente de ocorrência (F e G) em Londrina, Paraná18
- Figura 2** - Distribuição de *H. chillensis* na América do Sul indicando as diferentes formas de involúculos (adaptado de Cabrera, 1976).....20

ARTIGO 2

- Figura 1** - Distribuição geral de *H. chillensis* na América do Sul (adaptado de Cabrera, 1976) e áreas de coleta de oito populações amostradas nos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. CAM - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP; ITA – Zona Rural, Rodovia Raposo Tavares Km 189, Itapetininga, SP; UEL – Campus da Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR; SJ - Zona Rural, Rodovia PR-090, São Jerônimo da Serra – PR; BCA - Área urbana, Balneário Camburiú, SC; LAG - Rodovia entre São José do Cerrito e Campos Novos, Lages – SC; SFP - Rodovia entre São Francisco de Paula e Rio Bonito, RS; SM - Fazenda São Maximiliano, Guaíba – RS.....43
- Figura 2** - Correlação de Pearson entre o F_{ST} par a par e as distâncias geográficas para 10 locos microssatélite em oito populações de *H. chillensis*. ($P \leq 0.05$49

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Table 1** - Characteristics of 11 microsatellite loci isolated for *H. chillensis*.36
- Table 2** - Twelve microsatellite loci developed for *H. chillensis* and tested for cross amplification in 22 samples, representing 10 species of the South American group of *Hypochaeris* and the Moroccan species *H. angustifolia*37

ARTIGO 2

- Tabela 1** - Locais de coleta de *H. chillensis* no Sudeste e Sul do Brasil42
- Tabela 2** - Características de 10 pares de primers desenvolvidos por Lucio *et al.* (em análise para publicação, Am. J. Bot.) para *H. chillensis*.....45
- Tabela 3** - Estimativas de variação genética conforme Nei (1978) para 10 locos microssatélites em oito populações de *H. chillensis*46
- Tabela 4** - Teste de sinal para excesso de heterozigosidade para 10 locos microssatélites em oito populações de *H. chillensis*.....47
- Tabela 5** - Médias e intervalo de confiança a 95% (IC) das distribuições *a posteriori* das proporções de indivíduos não-migrantes e migrantes para as oito populações de *H. chillensis*, com base no método de atribuição *bayesiana* de Wilson e Rannala (2003) em BAYESASS48
- Tabela 6** - Análise de variância molecular (AMOVA) de oito populações de *H. chillensis* utilizando 10 locos microssatélites48
- Tabela 7** - Acima da diagonal estão as distâncias geográficas, em km, entre as populações de *H. chillensis*. Abaixo da diagonal, valores de F_{ST} entre pares de populações.....49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 O GÊNERO <i>Hypochoaeris</i>	14
2.2 CARACTERÍSTICAS DE <i>Hypochoaeris chillensis</i>	17
2.3 VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES.....	20
2.4 MARCADORES MOLECULARES	23
2.5 MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	26
3 JUSTIFICATIVA	29
4 OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVOS GERAIS.....	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5 ARTIGOS	
ARTIGO 1 - CHARACTERIZATION OF 12 MICROSATELLITE LOCI FOR THE COSMOPOLITAN SPECIES <i>HYPOCHAERIS CHILLENSIS</i> (ASTERACEAE)¹ AND THEIR CROSS-AMPLIFICATION IN 11 RELATED SPECIES	31
ARTIGO 2 - ESTRUTURA GENÉTICA DE OITO POPULAÇÕES DE <i>HYPOCHAERIS CHILLENSIS</i> (ASTERACEAE) DO BRASIL	38
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO	68
ANEXO A - Construção de bibliotecas enriquecidas com microssatélites para <i>Hypochoaeris chillensis</i>	69

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Hypochoeris*, pertencente à família Asteraceae, e é representado por plantas herbáceas distribuídas em duas áreas distintas, a região Mediterrânea, que possui cerca de 15 espécies, e a América do Sul com cerca de 50 espécies descritas (LACK, 1979). Entre as espécies sul-americanas podemos destacar *Hypochoeris chillensis* (Kunth) Britton, que se diferencia do grupo por apresentar ampla distribuição geográfica, se diferenciando das outras espécies do grupo (CABRERA, 1976). Evidências obtidas através de estudos cromossômicos e moleculares permitem sugerir que a região mediterrânea é o centro de origem de *Hypochoeris*, enquanto a América do Sul é o centro de diversificação do gênero (STEBBINS, 1971; RUAS et al., 1995; CERBAH et al., 1998a, 1998b). Tem sido proposto que a chegada do gênero no continente sul-americano ocorreu através de uma ou poucas introduções, provavelmente por mecanismos de dispersão a longa distância (TREMETSBERGER et al., 2005). Após a chegada do gênero na América do Sul, a grande disponibilidade de ambientes possibilitou a ocorrência de eventos rápidos de radiação adaptativa e especiação, que permitiram às espécies de *Hypochoeris* a ocupação de uma grande variedade de habitats, exceto em regiões áridas, florestas tropicais e costas de desertos, refletindo um padrão típico de radiação adaptativa (CABRERA e WILLINK 1980, STUESSY et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005).

Em plantas, exemplos de fenômenos evolutivos, como radiação adaptativa, são comumente encontrados em grupos distribuídos em ilhas ou em cenários semelhantes às ilhas (SANG et al., 1994; CARLQUIST, 2001; MOORE et al., 2002), sendo raramente encontrados em continentes. Os mecanismos de radiação adaptativa propostos para o gênero *Hypochoeris* na América do Sul produziram um grande número de espécies, em consequência, provavelmente, da grande diversidade de habitats disponíveis para ocupação do gênero nesta região (STUESSY et al., 2003; SAMUEL et al., 2003). Assim, esse gênero mostra um exemplo de radiação adaptativa no continente sul-americano onde, a partir de uma única espécie ancestral, episódios repetidos de especiação foram capazes de gerar numerosos tipos de descendentes com diferentes tolerâncias ecológicas (STUESSY et al., 2003).

Outro aspecto das espécies sul-americanas de *Hypochaeris* é que elas são um excelente modelo para estudos de evolução cariotípica em plantas, pois possuem características interessantes como pequeno número de cromossomos, de tamanhos relativamente grandes e cariótipo bimodal (CERBAH et al., 1995, 1998a; RUAS et al., 1995; 2005; WEISS et al., 2003, WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2003, 2008).

A posição filogenética das espécies do grupo sul-americano de *Hypochaeris*, sua chegada até a América do Sul, assim como os mecanismos responsáveis pela diversificação rápida e recente no continente, ainda não são completamente explicados. Portanto, o gênero é considerado também um importante modelo para estudos de biogeografia. Assim, espera-se o desenvolvimento de hipóteses biogeográficas específicas com análises de mais taxa das diferentes regiões da América do Sul (STUESSY et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005). Para auxiliar na compreensão dos fenômenos evolutivos e biogeográficos das espécies de *Hypochaeris*, estudos cromossômicos e de organização cariotípica (STEBINS, 1971; CERBAH et al., 1995, 1998a; RUAS et al., 1995; 2005; 2008; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2003; 2007; 2008), filogenéticos (CERBAH et al., 1998b; SAMUEL et al., 2003; STUESSY et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005, 2006) e de estruturas populacionais (TREMETSBERGER et al., 2003a; 2003b; MUELLNER et al., 2005; MIX et al., 2006; TERRAB et al., 2009) têm sido realizados no gênero.

Dados moleculares, especialmente os de DNA, têm proporcionado uma estimativa mais precisa das relações entre grupos de plantas vasculares. Vários tipos de dados moleculares têm sido usados com eficácia em diferentes níveis taxonômicos, desde classificação em ordens e famílias até variação genética dentro e entre populações. O mesmo impacto que os dados moleculares tem tido para a sistemática de plantas, tem sido também verificados em estudos de biogeografia (STUESSY; TAYLOR, 1995).

Poucos exemplos de estudos sobre os modos de especiação e os padrões biogeográficos são encontrados na literatura sobre a flora sul-americana. Entretanto, com o advento dos métodos moleculares, novas ferramentas foram adicionadas para um entendimento mais sofisticado sobre os modos de especiação em plantas (CRAWFORD, 1990, 2000).

Dados obtidos a partir de marcadores genéticos codominantes como os marcadores microssatélites, fornecem informações que, aliadas às características morfológicas e ecológicas das espécies, podem ser úteis para melhor compreensão da biologia da espécie e de suas interações (TELLES et al., 2001). Neste contexto, estudos com a espécie *H. chillensis*, que possui a maior distribuição entre as espécies do grupo sul-americano, podem contribuir significativamente para o entendimento sobre a expansão do gênero *Hypochoeris* na América do Sul.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O GÊNERO *HYPOCHAERIS*

A família Asteraceae é a maior entre as Angiospermas, apresentando cerca de 23.000 espécies, distribuídas em 1.535 gêneros, dentre os quais encontra-se o gênero *Hypochaeris*. Este gênero é agrupado dentro da subfamília Cichorioideae K. Tam., tribo Lactuceae Cass. da subtribo Hypochaerinidinae Less. As espécies de *Hypochaeris* são representadas por plantas herbáceas que apresentam como principal característica a presença de látex, que é exclusiva das Asteraceae pertencentes à tribo Lactuceae (BREMER, 1994).

As espécies de *Hypochaeris* apresentam uma distribuição disjunta, com mais de 15 espécies distribuídas na região do Mediterrâneo, Ilhas Canárias e Ásia, e cerca de 50 espécies na América do Sul (WEISS- SCHNEEWEISS et al., 2003, 2007, 2008; TREMETSBERGER et al., 2005; RUAS et al., 2005). O gênero é considerado um importante modelo para estudos sobre modos de especiação e de biogeografia no continente sul-americano (STUESSY et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005). A delimitação das espécies na América do Sul, suas relações morfológicas e ecologicamente diferenciadas assim como os mecanismos de radiação neste continente ainda não são completamente explicados (STUESSY et al., 2003). Com base em dados sobre número e morfologia dos cromossomos, STEBBINS (1971) sugeriu de que o gênero *Hypochaeris* teve origem na região Mediterrânea e que a América do Sul, onde se concentra um maior número de espécies, é o centro secundário de diversificação (RUAS et al., 1995; 2005, SAMUEL et al., 2003, TREMETSBERGER et al., 2005).

Vários tratamentos foram considerados no passado para determinar os limites taxonômicos do gênero *Hypochaeris* (= *Hypochoeris* L.; HARRIMAN, 1980), sendo o mais significativo, aquele proposto por HOFFMANN, 1890) que, com base em dados morfológicos, especialmente na estrutura do páppus e morfologia dos aquênios observados nas espécies européias, classificou *Hypochaeris* como um grande gênero, dividido em cinco seções: *Seriola*; *Euhypochaeris*; *Metabasis*; *Robertia* e *Achyrophorus*. Os caracteres considerados para a separação das seções

incluíram o número de linhas de páppus, forma das cabeças, arranjo das filárias e tamanho dos aquênios. Neste grupo de espécies são encontrados diferentes números básicos de cromossomos, com $x = 3, 4, 5$ e eventualmente 6, associados a cariótipos simétricos, com cromossomos grandes (2 a 9 μm) e morfologicamente variáveis (STEBBINS, 1971; CERBAH et al., 1995, 1998a). Além disso, essas espécies coexistem com outras do gênero *Leontodon*, considerado muito próximo de *Hypochoeris* (SAMUEL et al., 2003). Hipóteses sugerem que os mecanismos de evolução cariotípica no gênero envolvem tanto aumento quanto redução no número de cromossomos, a partir de um número básico ancestral com $x = 5$. A partir desses dados, considerou-se que o ancestral do gênero *Hypochoeris* é de origem européia (STEBBINS, 1971; RUAS et al., 1995; CERBAH et al., 1998a).

Enquanto nas espécies européias os diferentes números básicos têm certo grau de correlação com as diferenças seccionais (MUGNIER, SILJAK-YAKOVLEV, 1987; CERBAH et al., 1995), as espécies nativas conhecidas (cerca de 50 espécies) na América do Sul têm um único número básico ($x = 4$) e, por apresentar como principal característica um único tipo de aquênios, são, todas elas, classificadas na seção *Achyrophorus* (CABRERA, 1963, 1976; BORTIRI, 1999; STUESSY et al., 2003). Além disso, nessas espécies o número básico de $x = 4$ encontra-se associado a cariótipos bimodais e altamente assimétricos (CERBAH et al., 1995, 1998a; RUAS et al., 1995, 2005; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2007). Neste grupo, ocasionalmente, tem sido verificada a presença de indivíduos poliplóides dentro de populações diplóides (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2003, 2008) e, mais raramente, populações inteiramente poliplóides (FIORIN, 2008).

O modo de distribuição das espécies de *Hypochoeris* no continente sul-americano reflete um padrão característico de radiação adaptativa. Supõe-se que o gênero surgiu na América do Sul entre 0,25 e 3,5 milhões de anos durante o Plioceno ou Pleistoceno tendo evoluído rapidamente (TREMETSBERGER et al., 2005, 2006). Neste processo, foi favorecido o cariótipo padrão com cromossomos grandes e em pequeno número (RUAS et al., 1995, 2005; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2003, 2007).

Outra característica interessante nos cariótipos do grupo sul-americano de *Hypochoeris* é a variação observada no número e na distribuição de sítios de rDNA, que ocorre entre as espécies. Neste grupo, o padrão de variação dos sítios de rDNA sugere que a evolução cromossômica tem ocorrido por meio de

mecanismos de inversão e/ou transposição, que levaram à alterações na posição da constrição secundária no braço curto do cromossomo 3, e por eventos de inativação e perda de genes ribossomais no cromossomo 2 (CERBAH et al., 1998a; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2003; RUAS et al., 1995, 2005). Deste modo, considerando o número e distribuição de sítios de rDNA, foram propostos sete grupos cariotípicos para as espécies sul-americanas de *Hypochaeris*: Acaulis, Apargioides, Caespitosa, Chondrilloides, Patagônica, Sessiliflora e o grupo Tenuifolia (WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2003, 2007, 2008).

Os mecanismos de radiação adaptativa propostos para o gênero *Hypochaeris* na América do Sul produziram um grande número de espécies, em consequência, provavelmente, da grande diversidade de habitats disponíveis para ocupação do gênero nesta região (STUESSY et al., 2003; SAMUEL et al., 2003). Estudos realizados em sequências de DNA no gênero mostram a ocorrência de baixos níveis de divergência ao longo dos taxa sul-americanos, sendo consistente com um padrão rápido de especiação, em contraste com a maior divergência nos representantes mediterrâneos (CERBAH et al., 1998b; SAMUEL et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005, 2006). As espécies de *Hypochaeris* do mediterrâneo são basais em relação aos taxa sul-americanos, sugerindo que este grupo evoluiu a partir de uma única introdução de progenitores europeus. Estudos recentes identificaram características semelhantes às das espécies sul-americanas em *H. angustifolia*, (Litard. e Maire) Maire, endêmica do Marrocos. Esta espécie possui número cromossômico básico de $x = 4$, associado a um cariótipo bimodal e altamente assimétrico (TREMETSBERGER et al., 2005). Além disso, análises de sequências de DNA nuclear e de cloroplastos sugerem que *H. angustifolia* é co-irmã do grupo de *Hypochaeris* da América do Sul (TREMETSBERGER et al., 2005). Estes dados encontram suporte também em dados de AFLP que mostram *H. angustifolia* ocupando uma posição filogenética intermediária entre as espécies do mediterrâneo e as da América do Sul (TREMETSBERGER et al., 2006; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2008). Essas descobertas permitem que inferências sejam feitas sobre a possível origem das espécies de *Hypochaeris* na América do Sul, a partir de um ancestral do noroeste da África, além de sugerir uma possível ligação entre os números básicos de $x = 5$ e $x = 4$ (TREMETSBERGER et al., 2005, 2006).

No Brasil o gênero *Hypochaeris* é representado por cerca de dez espécies, dentre as quais encontramos *H. albiflora* , *H. chillensis* Hieron, *H.*

catharinensis, *H. lutea*, *H. megapotamica*, *H. microcephala*, *H. neopinnatifida*, *H. pampasica* e *H. variegata*. Algumas dessas espécies possuem características ecológicas específicas, como *H. catharinensis*, uma espécie endêmica do Sul do Brasil, que ocorre predominantemente em regiões altas (800-1400m) e frias nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, como nas colinas da região fisiográfica dos Campos de Cima da Serra (FORTES, 1959). Nestas colinas constata-se com frequência a coexistência entre exemplares de *H. chillensis*, *H. catharinensis*, *H. megapotamica* e *H. neopinnatifida*. *Hypochaeris lutea* é outra espécie com distribuição altamente restrita, ocorrendo no sul do Brasil e em algumas regiões da Argentina e do Paraguai (AZEVEDO-GONÇALVES e MATZENBACHER, 2007). Essa espécie é ecologicamente distinta, ocorrendo em ambientes de solos muito úmidos e em solos alagados, com presença significativa de água superficial (FORTES, 1959). As características ecológicas do ambiente ocupado por *H. lutea* são semelhantes àquelas das colinas do Marrocos onde é encontrada a espécie *H. angustifolia* (TERAB et al., 2009), ancestral do grupo sul-americano de *Hypochaeris* (TREMETSBERGER et al., 2005, 2006; WEISS-SCHNEEWEISS et al., 2008). Contrastando com o endemismo observado em *H. catharinensis* e *H. lutea*, a espécie *H. chillensis* se destaca por apresentar ampla distribuição geográfica, sendo uma das espécies mais comuns, que se caracteriza também por sua grande variabilidade morfológica (AZEVEDO-GONÇALVES, MATZENBACHER, 2007).

2.2 CARACTERÍSTICAS DE *HYPOCHAERIS CHILLENSIS*

Hypochaeris chillensis é uma erva perene com flores amarelas liguladas maiores ou iguais às suas brácteas involucrais (Figura 1). O período de florescimento e frutificação desta espécie ocorre nos meses de março, outubro novembro e dezembro (AZEVEDO-GONÇALVES; MATZENBACHER, 2007).



Figura 1 - Características morfológicas e ecológicas de *H. chillensis*. (A) folhas basais polimórficas, (B) folhas do ramo, (C) capitulo, visão lateral da flor (D), visão superior da flor (E), ambiente de ocorrência (F e G) em Londrina, Paraná.

Cabrera (1976) observou que características morfológicas como as brácteas involucrais, folhas ou capítulos podem variar dentro de uma população e até mesmo no próprio indivíduo. Plantas que apresentavam involúcros hirsutos ou glabros já foram consideradas espécies diferentes (CABRERA, 1976). Foi recentemente identificada em uma população de *H. chillensis* da região de Londrina, PR, a ocorrência de flores amarelas e flores brancas em ramos diferentes de um único indivíduo (Claudete F. Ruas, comunicação pessoal).

A co-ocorrência de *H. chillensis* com outras espécies facilita a formação de híbridos naturais, conforme já foi relatado entre *H. chillensis* x *H. megapotamica*, *H. chillensis* x *H. albiflora* e *H. chillensis* x *H. microcephala* (AZEVEDO-GONÇALVES; MATZENBACHER, 2005). Em geral os híbridos são identificados pela presença de frutos atrofiados e características morfológicas

intermediárias às dos parentais (AZEVEDO-GONÇALVES; MATZENBACHER, 2007), ou pela presença de flores de cores amarelas e brancas, sugerindo hibridação com *H. albiflora* (TREMETSBERGER et al., 2006). Deste modo, a hibridização pode ser responsável por grande parte da variabilidade morfológica identificada em *H. chillensis*.

Hypochaeris chillensis ocupa regiões de clima temperado e subtropical, sendo encontrada desde campos limpos ou ambientes antropizados, como em cultivos de lavoura, terrenos baldios, em cidades e em beira de estrada, podendo também ser encontrada em terrenos pedregosos e ambientes úmidos (AZEVEDO-GONÇALVEZ; MATZENBACHER, 2007). *Hypochaeris chillensis* apresenta como principal característica sua ampla distribuição na América do Sul (Figura 2), incluindo Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai, Peru, Bolívia, Equador e Colômbia, sendo a única representante sul-americana de distribuição cosmopolita (AZEVEDO-GONÇALVEZ; MATZENBACHER, 2007). No Brasil, *H. chillensis* pode ser encontrada desde o Rio Grande do Sul, passando por Santa Catarina e Paraná, com relatos de ocorrências também nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais (AZEVEDO-GONÇALVEZ; MATZENBACHER, 2007).

O epíteto específico de *H. chillensis* faz alusão à localidade onde foi coletado o holótipo, Chillo, no Equador. Esta espécie não é encontrada no Chile (AZEVEDO-GONÇALVEZ et al, 2007).

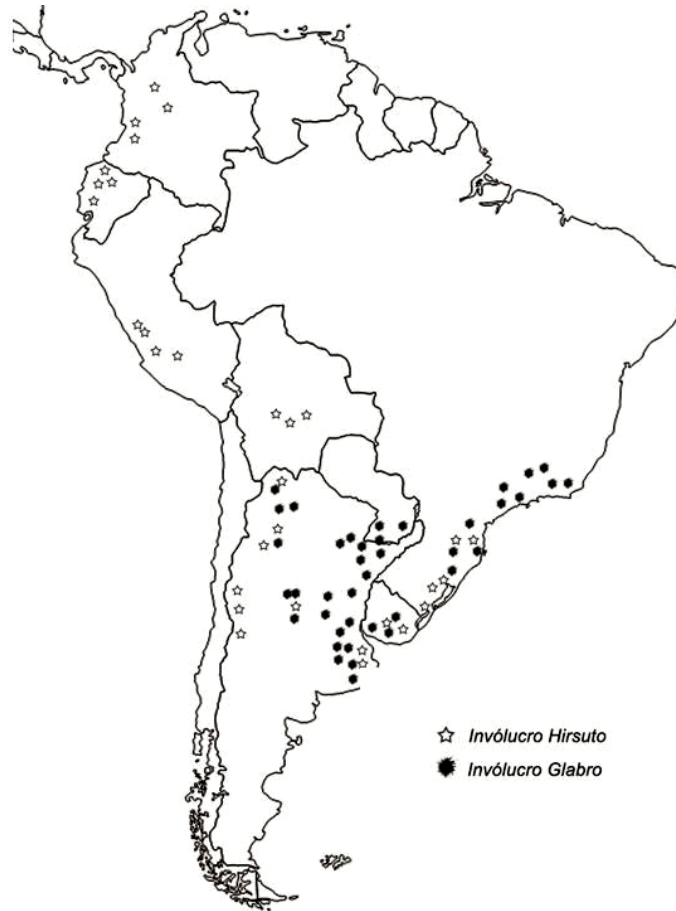


Figura 2 - Distribuição de *H. chillensis* na América do Sul indicando as diferentes formas de invólucros (adaptado de Cabrera, 1976).

2.3 VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES

A variabilidade genética é a matéria-prima da evolução, sobre a qual a seleção natural atua gerando novas formas adaptativas (DOBZHANSKY et al., 1977). Altos níveis de variabilidade são importantes para a viabilidade das populações visto que, quanto maior a variabilidade genética, maiores as possibilidades de atuação da seleção natural na fixação de características adaptativas, que influenciam a capacidade de sobrevivência das populações ao longo do tempo. Além disso, a variabilidade genética pode ser utilizada como instrumento para verificar as afinidades filogenéticas e os limites entre as espécies, detectar modos de reprodução, identificar estruturas familiares e definir a estrutura

populacional, estimando níveis de migração e dispersão nas populações (AVISE, 1994).

O padrão de variação genética entre e dentro de populações naturais nos dá o conceito de estrutura genética de populações (DIAS, 2006). Por várias razões evolutivas distintas, em uma população podem ocorrer diferentes estruturas ou subestruturas de variação genética (ROBINSON, 2006). Entre os fatores que influenciam a distribuição da variabilidade entre e dentro de populações naturais pode-se ressaltar o modo de reprodução, o tamanho da população, a distribuição geográfica e a intensidade do fluxo gênico (HAMRICK, 1994). A organização dos níveis de diversidade é decorrente de fatores que afetam o comportamento dos alelos na população tais como, seleção natural, migração, deriva genética e mutação, estando esta organização também fortemente associada aos aspectos ecológicos e demográficos das populações (HAMRICK, 1983; LOVELESS; HAMRICK, 1984).

Fatores biológicos e geográficos em populações naturais frequentemente não permitem a reprodução aleatória entre os indivíduos. Esta ausência de panmixia, geralmente impede que a variabilidade genética seja uniformemente distribuída ao longo de toda a área de ocorrência da espécie (WRIGHT, 1978). A endogamia gerada por autofecundação ou o cruzamento entre indivíduos aparentados também tenderá a alterar a frequência de certos genótipos em relação ao total da população. Além disso, o endocruzamento pode aumentar a frequência de genótipos homozigotos para alelos deletérios recessivos em homozigose, gerando impactos no valor adaptativo das espécies ou populações, com possível vantagem adaptativa dos heterozigotos sobre os homozigotos (KELLER; WALLER, 2002).

Um dos principais aspectos nos estudos de estruturas populacionais está relacionado com a determinação dos níveis de fluxo gênico entre as populações sendo este o maior componente da estrutura populacional, determinando a extensão na qual cada população local de uma espécie é uma unidade geneticamente diferenciada (SLATKIN, 1994).

Para Weir (1996), a frequência de heterozigotos pode ser considerada como um importante indicador da diversidade genética, uma vez que cada heterozigoto carrega alelos diferentes e, portanto, representa melhor a variação existente. Contudo, o autor considera que a heterozigosidade esperada, ou

diversidade gênica, como proposto por Nei (1973), é uma medida mais apropriada por representar a variação tanto em populações de espécies autógamas, como em alógamas. Além destas estatísticas, o índice de fixação (F_{IS}) de Wright (1965) tem sido utilizado como uma medida de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro de cada população.

Estudos das relações de parentesco, estruturas sociais e sistemas de acasalamento podem ser realizados pela análise de marcadores moleculares, os quais, frequentemente, geram informações preciosas sobre a biologia e história natural das espécies (AVISE, 1994), uma vez que envolvem questões básicas como verificar os níveis de variabilidade dentro das populações e caracterizar o nível de estruturação genética entre populações (HAMRICK, 1983).

Considerando os aspectos discutidos acima, pode-se inferir que informações obtidas a partir de marcadores moleculares possibilitam determinar como os alelos estão distribuídos nas populações, contribuindo para o entendimento de como os processos microevolutivos estão atuando na diferenciação das populações na natureza (AVISE, 2004).

Diferentes metodologias de análises estatísticas, aplicadas a dados moleculares, podem ser utilizadas para quantificar a variação genética dentro de populações. Dentre elas destacam-se a estimativa da proporção de locos polimórficos para o conjunto de populações (dentro da espécie) e dentro de cada população, além de diversas medidas de diversidade genética que estão disponíveis na literatura (ALFENAS et al., 2006). O número de alelos por loco e a percentagem de locos polimórficos têm sido empregados como índices de diversidade em populações naturais, no sentido de caracterizar e comparar os níveis de variação genética nas populações (ROBINSON, 1998).

A caracterização da estrutura genética entre populações, a partir de dados de marcadores genéticos codominantes, tem sido realizada por três metodologias básicas: (a) estatísticas F de Wright (WRIGHT, 1965; NEI, 1977); (b) análise da variância de freqüências gênicas (COCKERHAM, 1969; VENCOSKY, 1992; WEIR, 1996); e (c) análise da diversidade genética em populações subdivididas (NEI, 1973, 1977, 1987). As estatísticas F fornecem os índices de fixação de alelos para o total das populações, média dentro e entre populações, com base em medidas de probabilidade de identidade por descendência (WRIGHT, 1965; NEI, 1977). A análise da variância de freqüências gênicas fornece a distribuição da

variabilidade genética em diversos níveis hierárquicos, considerando o processo amostral nas estimativas (COCKERHAM, 1969). Já, a diversidade genética de Nei fornece, a partir de uma metodologia estatística simples, a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações e os níveis de heterozigosidade esperados para o total e média das populações (NEI, 1973). Conforme Reis (1996), mesmo com bases estatísticas diferentes, as três abordagens são complementares em relação ao significado biológico das estimativas.

2.4 MARCADORES MOLECULARES

Denomina-se um marcador molecular qualquer molécula (metabólitos, proteínas, sequências de DNA e RNA, etc) que apresente variações em quantidade ou em estrutura entre indivíduos. Pelas variações que apresentam, o fenótipo molecular oriundo destas moléculas será específico para um único indivíduo ou grupo de indivíduos (ROBINSON, 2006). Através da genética molecular, numerosas técnicas tem possibilitado o acesso à variabilidade dentro e entre populações, tanto através de polimorfismos de proteínas quanto de DNA (AVISE, 1994).

Os marcadores moleculares bioquímicos foram os primeiros a serem utilizados em estudos genéticos. Esses marcadores possibilitam a identificação de variações em proteínas e enzimas, permitindo uma grande revolução nos estudos genético-populacionais (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Dados moleculares, especialmente os de DNA, têm proporcionado uma estimativa mais precisa das relações entre grupos de plantas vasculares. Vários tipos de marcadores moleculares tem sido usados com eficácia em diferentes níveis taxonômicos, desde classificação em ordens e famílias até variação genética dentro e entre populações (Crawford, 2000). Informações contidas em fragmentos sequenciados de DNA, assim como diferentes tipos de *fingerprinting* de DNA, têm sido empregados para acessar os padrões de isolamento e especiação, o tempo e as mudanças na distribuição dos eventos de especiação, as rotas de migração e/ou dispersão, a divergência ao nível de populações e hibridação (STUESSY et al., 2003), bem como

para inferir sobre as relações filogenéticas interespecíficas e definir a estrutura genética de populações em plantas (PAGE; HOLMES, 1998). Bons exemplos destas aplicações podem ser vistos nos trabalhos realizados nos gêneros *Iris* (ARNOLD, 1997), *Helianthus* (RIESEBERG et al., 1995, 2001) e *Hypochaeris* (SAMUEL et al., 2003; STUESSY et al., 2003; TREMETSBERGER et al., 2005, 2006, ORTIZ et al., 2007, 2008).

Entre as técnicas moleculares, a denominada de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) explora o polimorfismo através dos tamanhos de fragmentos obtidos em função da variação na distribuição dos sítios de restrição ao longo da molécula de DNA (GRODZICKER et al., 1974). Um grande avanço nos estudos com marcadores moleculares de DNA foi o surgimento da reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), que envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (MULLIS; FALOONA, 1987). Esta reação acontece através do anelamento e extensão enzimática, iniciada por um par de oligonucleotídeos (*primers*) utilizados que delimita a sequência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. A partir da implantação da técnica de PCR, surgiram inúmeros marcadores moleculares, que podem diferir tanto quanto ao tipo de herança, como à abundância dentro do genoma, ao nível de polimorfismo e informação genética detectados, à especificidade dos locos, à reprodutibilidade, aos requerimentos técnicos e investimento financeiro (BUSO et al., 2003).

Uma técnica simples e eficiente, que surgiu depois do advento da PCR foi o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), que se destaca pela simplicidade e tem como base a amplificação de um segmento de DNA, delimitado por dois *primers* curtos, em geral com 10 pares de bases, complementares no DNA alvo (WELSH; MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990). O RAPD possui algumas limitações como a baixa reprodutibilidade dos resultados e sua natureza dominante (GARCIA et al., 2004).

O AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) é outra técnica que tem como base a PCR, na qual marcadores moleculares polimórficos são identificados por diferenças no comprimento de fragmentos de DNA, gerados pelo uso combinado de enzimas de restrição e da amplificação seletiva via PCR (ZABEAU, 1993; VOS et al., 1995). A técnica de AFLP tem como vantagem o grande número de marcadores analisados em um único gel, com alto poder de detecção de

variabilidade genética. A técnica não requer informação prévia da seqüência de DNA, possibilitando diferentes combinações entre primers e enzimas de restrição, além de proporcionar maior robustez dos resultados. Entretanto, a principal limitação dos marcadores AFLP é o baixo conteúdo de informação genética por loco, pois, assim como os marcadores RAPD, são de natureza dominante. Além disso, a técnica de AFLP envolve um maior número de etapas, necessitando de maior quantidade de reagentes e equipamentos, incrementando o custo inicial das análises (ZABEAU; VOS, 1993; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; ZHIVOTOVSKY, 1999; COSTA et al., 2000).

Marcadores AFLP tem sido usados com sucesso nas inferências sobre as relações intraespecíficas do complexo processo evolutivo que ocorre em *Hypochoeris* (STUESSY et al., 2003, TREMETSBERGER et al., 2005, 2006).

Estudos de diversidade genética e padrões biogeográficos em *Hypochoeris* foram realizados para três espécies andinas (*H. acaulis*, *H. tenuifolia*, e *H. palustris*) na América do Sul (TREMETSBERGER et al. 2003a; 2003b; MUELLNER et al., 2005), para as espécies da Península Ibérica tais como, *H. salzmanniana*, *H. radicata* e *H. glabra* (TREMETSBERGER et al., 2004; ORTIZ et al., 2007) e para espécie marroquina *H. angustifolia* (TERRAB et al., 2009).

Utilizando dados obtidos de marcadores AFLP, Tremetsberger (2006) classificou 32 espécies sul-americanas de *Hypochoeris* em seis grupos moleculares, sendo que a maioria destas espécies se mostrou monofilética. Os grupos formados foram: Apargioides, Chondrilloides, Pampasica, Sessiliflora, Tenuifolia e o grupo Microcephala, onde se encontra inserida *H. chillensis*, além das espécies *H. alba*, *H. albiflora*, *H. argentina*, *H. microcephala* e *H. parodii*.

Entre os marcadores de DNA com natureza codominante, se destacam os polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNPs ou *Single Nucleotide Polymorphisms*) (BROOKES, 1999) e os microssatélites (SSR ou *Simple Sequence Repeats*), ou conhecidos também como STR (*Short Tandem Repeat*). Este último pertencente à classe do DNA repetitivo, encontrado em maior ou menor abundância nos genomas de todos os organismos. O nome microssatélites foi apresentado por Litt e Luty (1989), remetendo ao termo minissatélite, e neste mesmo ano estes pesquisadores, além de Tautz (1989) e Weber e May (1989), propuseram a utilização destas seqüências como marcadores moleculares. Os microssatélites são representados por seqüências simples de 2 a 5 nucleotídeos repetidas *in tandem*.

Suas características encontram aplicações para o mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos e para estudos de genética de populações (FERREIRA; GRATTAPLAGLIA, 1998).

Os marcadores SNPs são variações pontuais no DNA primeiramente observadas com o sequenciamento do genoma humano (BROOKES, 1999). A genotipagem não se baseia no comprimento dos alelos, como em outros marcadores moleculares utilizados, e a distinção dos alelos é feita através de sequenciamento direto do DNA, de informações disponíveis em bancos de dados, ou através de métodos bioquímicos que investigam a presença de variantes (KWOK, 1999). Esses marcadores ocorrem em regiões codificantes e não codificantes nos genomas. A grande vantagem dos SNPs reside na abundância de polimorfismos entre alelos de um determinado gene, entretanto métodos menos custosos e mais rápidos ainda estão em desenvolvimento (GIORDANO et al., 1999).

2.5 MARCADORES MICROSSATÉLITES

Um aspecto geral a ser considerado sobre aplicação de marcadores moleculares em estudos genéticos é a pouca informação que pode ser obtida sobre a estrutura de populações, caso os marcadores empregados não sejam suficientemente polimórficos (CHASE et al., 1996). Neste aspecto, estimativas de parâmetros genéticos populacionais críticos, tais como a diferenciação genética e endogamia, as medidas diretas de fluxo gênico e tamanho efetivo populacional, foram beneficiadas com o advento dos marcadores moleculares altamente polimórficos (CHASE et al., 1996), como os microssatélites.

A técnica de obtenção de marcadores microssatélites se resume na amplificação das sequências repetidas, utilizando *primers*, ancorados nas regiões que flanqueiam as repetições. Desta forma, cada sequência, independente de seu elemento repetitivo (ex: CA, GC, TG, ATC), constitui-se de um *locus* gênico altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo em relação a uma espécie. Apesar da variação no número de motivos, a sequência de bases adjacente à região de repetição pode ser única no genoma e conservada entre os indivíduos

de uma mesma espécie, possibilitando o desenvolvimento de *primers*, usados das reações de PCR. As diferenças no número de repetições resultam em variações no comprimento dos produtos de amplificação os quais, podem ser visualizados após separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, corados com nitrato de prata, agentes intercalantes ou através de fluorescência (SCHLOTTERER; TAUTZ, 1992).

As diferentes repetições encontradas nos microssatélites são divididas em repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção; repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases não repetidas; e repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas em posições adjacentes (Caixeta et al., 2006). Como outras classes de DNA repetitivo, os microssatélites possuem altas taxas de mutação, numa faixa entre 10^{-3} e 10^{-4} por loco por gameta por geração, portanto, uma taxa de mutação superior em relação a outras regiões do genoma. Esta instabilidade surge através de um mecanismo específico de mutação chamado deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase (TAUTZ; SCHLÖTTERER, 1994). Além disso, o *crossing-over* desigual, que pode ser causado pelo pareamento errôneo das regiões que contém as repetições, também é um dos responsáveis pela maior taxa de mutação em locos com microssatélites (SCHLÖTTERER et al., 1998).

O modelo mais simples e popular proposto para explicar a evolução dos microssatélites é o modelo clássico *Stepwise Mutation Model* (SMM) de Ota e Kimura (1973), no qual, uma mutação consiste em uma unidade de repetição ganha, resultando em uma expansão, ou perdida, resultando em uma contração. Entretanto, mutações que alteram o tamanho das repetições em mais de uma unidade vêm sendo observadas (HUANG et al., 2002).

A importância dos microssatélites para estudos genéticos tem sido demonstrada desde o início de 1994 (SAGHAI MAROOF et al., 1994; BECKER; HEUN 1995; LIU et al., 1996; STRUSS; PLIESKE, 1998). Posteriormente, mapas enriquecidos em microssatélites passaram a ser contruídos para muitas espécies (RAMSAY et al., 2000; LI et al., 2003). Na maioria dos estudos, os marcadores SSRs foram desenvolvidos após o *screening* de pequenos insertos contidos em bibliotecas enriquecidas com motivos de microssatélites. Em espécies de interesse econômico, o uso de SSRs é facilitado devido à disponibilidade de grande volume de dados (*large expressed sequence tag* ou EST) e ao desenvolvimento de várias ferramentas

de bioinformática, que tornam possível identificar e desenvolver SSRs a partir dos ESTs (PILLEN et al., 2000; THIEL et al., 2003; RAMSAY et al., 2004; VARSHNEY et al., 2006).

Entre as vantagens do uso dos microssatélites na análise genética estão incluídas a alta reprodutibilidade, o alto nível de informação por loco, devido sua natureza codominante, e a praticidade em sistemas automatizados, como sequenciadores (ou semi-automatizados) que possibilitam o estudo de grande número de amostras (DUTECH et al., 2007). O maior problema na aplicação dos microssatélites é que eles necessitam ser isolados para cada espécie a ser estudada, e isto representa maior custo. Isso ocorre porque, a transferência de *primers* para espécies diferentes daquelas para as quais foram desenhados, é geralmente possível somente entre espécies próximas e, em alguns casos, a percentagem de amplificação é baixa, gerando alelos nulos e que podem influenciar na análise genética (DUTECH et al., 2007).

Recentemente, marcadores microssatélites têm sido construídos e amplamente aplicados para diferentes estudos em plantas, sendo muitos deles na família Asteraceae (MAO et al., 2009; NAKAGAWA E ITO, 2009; NOMURA et al., 2009). Em *Hypochaeris*, bibliotecas enriquecidas em microssatélites foram construídas para espécies do mediterrâneo *H. radicata* (Mix et al., 2004; 2006) e *H. salzmanniana* (Ruas et al., 2009), uma espécie da região mediterrânea em risco de extinção.

3 JUSTIFICATIVA

O gênero *Hypochaeris* possui características que o tornam um interessante modelo para estudos sobre processos evolutivos e mecanismos de especiação em plantas. As espécies de *Hypochaeris* encontram-se distribuídas em duas regiões distintas, a região mediterrânea e a sul-americana. Estudos sugerem que a região mediterrânea é o centro de origem, enquanto a América do Sul, com mais de 50 espécies conhecidas, é o centro diversificação do gênero. Acredita-se que a chegada do gênero no continente sul-americano ocorreu através de uma ou poucas introduções, a partir de um ancestral hipotético (possivelmente *H. angustifolia*) do Noroeste da África. Na América do Sul seguiu-se um processo rápido de radiação adaptativa, que representa um fenômeno raro em continentes. Neste contexto, o gênero é um importante modelo para estudos evolutivos e biogeográficos.

Pouco se sabe sobre os processos de radiação adaptativa que levaram a diversificação do gênero na América do Sul. No Brasil as espécies de *Hypochaeris* estão concentradas principalmente na região Sul, sendo *H. chillensis* a que apresenta maior distribuição geográfica entre as espécies do gênero. Deste modo, estudos realizados em amostras originadas de populações das diferentes áreas de ocorrência de *H. chillensis* podem auxiliar no esclarecimento dos processos de radiação adaptativa e modos de especiação do gênero na América do Sul.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Tendo em vista a característica cosmopolita de *H. chillensis* no Brasil pretende-se investigar a estrutura e variabilidade genética dentro e entre as populações desta espécie utilizando marcadores microssatélites.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenvolver bibliotecas enriquecidas com sequências contendo microssatélites para a espécie *H. chillensis* e selecionar pelo menos 10 pares *primers* para locos polimórficos;
2. aplicar os *primers* selecionados em um estudo piloto incluindo cerca de 50 indivíduos provenientes de três populações de *H. chillensis* com a finalidade de validar estes marcadores;
3. utilizar os mesmos pares de *primers* para estudos de populações de *H. chillensis*, representando os locais de distribuição da espécie no Brasil, a fim de investigar a distribuição da variabilidade genética populacional.

5 ARTIGOS

ARTIGO 1¹

CHARACTERIZATION OF 12 MICROSATELLITE LOCI FOR THE COSMOPOLITAN SPECIES *HYPOCHAERIS CHILLENSIS* (ASTERACEAE)¹ AND THEIR CROSS-AMPLIFICATION IN 11 RELATED SPECIES.

Carina C. F. Lucio², Eduardo A. Ruas², Luana A. Rodrigues², Paulo M. Ruas²,
Thiago Vidotto², Nelson I. Matzenbacher³, Claudete F. Ruas^{2,4}

Abstract

Premise of the study: The genus *Hypochaeris* is considered a biological model to understand the patterns and processes of speciation and biogeography of the vascular flora of South America, particularly from the temperate portion of the continent. Here we report the development and characterization of a set of 12 microsatellite markers for the species *H. chillensis* to assess the genetic variability and the patterns of population structure among the distribution areas of the species in Brazil. *Methods and Results:* Twelve microsatellite loci were isolated and characterized for the herbaceous species *H. chillensis*. PCR amplification detected 1-5 alleles, with an average of 2.91 alleles per locus. All primers pairs were tested for cross-amplification in ten additional species from South America and in the putative ancestor of the group, *H. angustifolia*. *Conclusions:* The microsatellites can be used to assess the genetic diversity and population structures of *H. chillensis*. The application in other species will focus on the elucidation of the evolutionary processes of adaptive radiation of the genus in South America.

Keywords: Codominant markers. Genetic diversity. Herbaceous species. SSR.

Introduction

The genus *Hypochaeris* has features that make it an interesting model for evolutionary and biogeographic studies in plants. The genus exhibits a

¹ Este artigo será submetido à revista **American Journal of Botany**

² Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil

³ Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁴ Present address: Center of Biological Sciences, State University of Londrina - 86051-990 Londrina, Paraná, Brazil - Telephone: 55- 43- 3371-4191

disjunct distribution, with more than 15 representatives in the Mediterranean region and around 50 in South America (Tremetsberger et al., 2005, 2006). Previous studies have suggested that the genus originated in the Mediterranean region and radiated into the South American continent after a long-distance dispersion event of an ancestral species from Northwestern Africa (Tremetsberger et al., 2005). Recent molecular and cytogenetic investigations identified characteristics that are similar to those found in the South American group of species in the Moroccan *H. angustifolia*, considered the closest relative of the South American *Hypochaeris* (Tremetsberger et al., 2005, 2006, Weiss-Schenneweiss, 2007).

Hypochaeris chillensis (Kunth) Britton, a perennial herb native to South America, exhibits extensive ecological and morphological diversity throughout its distribution range. Contrasting with the other South American species, *H. chillensis* is widespread, occurring from southeastern to south in Brazil as well as in Argentina, Uruguay, Paraguay, Peru, Bolivia, Ecuador and Colombia (Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher, 2007). The great morphological variability recognized in the specimens of *H. chillensis*, and its co-occurrence with other species facilitates interspecific hybridization (Cabrera, 1976; Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher, 2007). Hence, population studies on this species may help to understand the connection between long-distance dispersal and explosive radiation of the genus *Hypochaeris* into the South American continent.

Methods and Results

Genomic DNA was extracted from fresh leaves of a single individual using the cetyltrimethyl-ammonium bromide (CTAB) method (Doyle & Doyle 1987). An enriched microsatellite library was constructed using a hybridization-based capture method, following the protocol described by Billotte et al. (1999), with biotin-labeled (CT)₈ and (GT)₈ in the enrichment step. Approximately 5 µg of genomic DNA was digested with *Rsa*I and blunt-ended fragments were linked to adaptors (Rsa-21 and Rsa-25). Fragments containing repeats were selected by hybridization with the biotinylated oligonucleotides and recovered by streptavidin-coated magnetic beads (Invitrogen). Microsatellite-rich fragments were amplified by PCR with the Rsa-21 adapter as a primer, cloned into the pGEM[®]-T Easy (Promega) and then transformed

into *Escherichia coli* XL1 Blue MRF' supercompetent cells (Stratagene). After colony screening, the white-positive clones were checked for insert size by PCR (MJ Research PTC-200) using the M13 forward and reverse universal primers. Plasmids from 280 positive clones were sequenced using the BigDye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) with 5pM of the M13 forward and/or reverse primers, in a volume of 10µL reactions. Sequences were submitted to electrophoresis on the ABI 3130XL Automated Sequencer (Applied Biosystems). Of the 280 sequenced inserts, 40 (14.29%) clones contained perfect, compound and interrupted microsatellites, however, only 25 (8.93%) proved suitable for primer design. Primers were designed using the program PRIMER3 version 0.4.0 (Rozen and Skaletsky, 2000). PCR amplification and consistency of each primer pair were tested in a sample of five individuals from the same population, using the amplification in a touch down cycling according to Ruas et al. (2009). PCR was performed in a 10µL reaction mixture containing 3.5 µL of GoTaq Green Master Mix (Promega), 0.25µL (5 pmol) of each forward and the reverse locus-specific primer (Table1) and 2.0 µL (10ng) of genomic DNA, adjusting the volume with sterile water. The amplification products were resolved on a 7.0% polyacrylamide gel, sized by comparison with a 50-bp DNA ladder standard (Ludwig) and visualized after silver staining. Twelve primer pairs were selected for further analysis.

For characterization of the 12 microsatellite loci, genomic DNA was extracted from 50 individuals, representing three native populations of *H. chillensis* from Brazil, consisting of: 32 samples from Lages (LAG, 27° 31' S, 50° 53' W), road side between São José do Cerrito and Campos Novos, in Santa Catarina state; five samples from Sapopema (SAP, 23°53' S, 50°36' W), in Paraná state; and 13 samples from Itapetininga (ITA, 23°36' S 48°07' W), countryside of Raposo Tavares road, Km 189, in São Paulo state. Vouchers were deposited at the FUEL Herbarium on the State University of Londrina, under numbers: LAG: FUEL 48681, SAP: FUEL 48680, and ITA: FUEL 48810. For cross-amplification tests, DNA was extracted from 22 individuals representing 10 additional South American species (two samples each) and *H. angustifolia* (Table 2). Of the 12 selected primer pairs, 11 successfully amplified the target regions with 10 loci showing polymorphism, while one (Hchi211) was monomorphic and another (Hchi160) amplified unscorable product and was therefore, excluded from the analysis of *H. chillensis*. The characterizations of the 11

loci are summarized in Table 1. Standard population genetic statistics were calculated using Genepop version 1.2 (Raymond and Rousset, 1995).

The genotyping of 50 individuals of *H. chillensis* revealed moderate level of polymorphism, with a total number of 32 alleles. The number of alleles ranged from 1 (Hchi211) to 5 (Hchi274), with an average of 2.91 alleles per locus (Table 1). Polymorphic information content (*PIC*) was 0.323, in average, and observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity for each locus ranged from 0.023 to 1.000 and from 0.063 to 0.640, respectively, with mean values of 0.390 and 0.384 (Table 1). Five loci showed allelic frequencies that significantly deviated from expected Hardy–Weinberg proportions ($P \leq 0.001$), including two loci (Hchi36, Hchi159) with heterozygote deficit and three (Hchi105, Hchi108, Hchi233) with excess. Pairwise comparisons for multiple tests among the 11 loci showed significant linkage disequilibrium only between loci Hchi36/Hchi75, Hchi36/Hchi274 and Hchi75/Hchi274 ($P \leq 0.05$). The 12 selected SSR loci were also tested for cross-amplification in ten other South American species of *Hypochoeris* and in *H. angustifolia*, the presumed ancestor of this group. Seven loci amplified in all South American species tested, producing alleles of similar sizes to those observed in *H. chillensis*. Three loci (Hchi75, Hchi105, Hchi159) failed to amplify in one species each, one (Hchi15) failed in four species, and another (Hchi274) failed in two species (Table 2). The success of cross-amplification was predicted given the close genetic relationship among the South American species of *Hypochoeris* as a result of the recent divergence into the continent (Tremetsberger et al. 2006). Cross-amplification was also successful for five loci in *H. angustifolia*, indicating higher genetic distance compared to South American species of the genus (Table 2).

Conclusions

The 12 microsatellite primers herein described are the first set of molecular markers developed for *H. chillensis* and they have high potential for further investigation of genetic diversity and population genetic structure in this species. Applied to other related species, these markers are especially helpful in understanding the species relationships and the processes of adaptive radiation and speciation of the genus since it arrived in the South American continent.

Literature Cited

- AZEVEDO-GONÇALVES, C.F. AND N. I. MATZENBACHER. 2007. O Gênero *Hypochoeris* L. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia Série Botânica* 62: 55-87.
- BILLOTTE, N., LAGODA, P.J.R., A. M. RISTERUCCI, AND F. C. BAURENS. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54: 277–288.
- CABRERA, A. L. 1976. Materiales para una revisión, del género *Hypochoeris*. I. *Hypochoeris chillensis* (H.B.K.) Hieron. *Darwiniana* 20 (3-4): 312-322.
- DOYLE J. J., AND J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Photochemistry Bulletin* 19:11-15.
- RAYMOND, M. AND F. ROUSSET. 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- ROZEN, S., AND H. J. SKALETSKY. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In S. Krawetz And S. Misener [eds.], *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*, 365 – 386. Humana Press, Totowa, New York, USA.
- RUAS, E.A., CONSON, A.R.O., B. F. COSTA, J. O. DAMASCENO, L. A. RODRIGUES, M. RECK, A. O. S. VIEIRA, P. M. RUAS, AND C. F. RUAS. 2009. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) and intergeneric transferability. *Conservation Genetic Resources* 1:245–248.
- TREMETSBERGER, K., H. WEISS-SCHNEEWEISS, T. F. STUESSY, R. SAMUEL, G. KADLEC, M. A. ORTIZ, AND S. TALAVERA. 2005. Nuclear ribosomal DNA and karyotypes indicate a NW African origin of South American *Hypochoeris* (Asteraceae, Cichorieae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 102-116.
- TREMETSBERGER, K., T. F. STUESSY, G. KADLEC, E. URTUBEY, C. M. BAEZA, S. G. BECK, H. A. VALDEBENITO, C. F. RUAS, AND N. I. MATZENBACHER. 2006. AFLP Phylogeny of South American Species of *Hypochoeris* (Asteraceae, Lactuceae) *Systematic Botany* 3: 610-626.
- WEISS-SCHNEEWEISS H, T. F. STUESSY, K. TREMETSBERGER, E. URTUBEY, H. A. VALDEBENITO, S. G. BECK, AND C. M. BAEZA. 2007 Chromosome numbers and karyotypes of South American species and populations of *Hypochoeris* (Asteraceae) *Botanical Journal of the Linnean Society* 153:49-60.

Table 1 - Characteristics of 11 microsatellite loci isolated for *H. chillensis*.

Locus name (GenBank) ^a	Primer sequence 5' - 3'	Repeat motif	A	Allele size (bp)	PIC	H _O	H _E
Hchi15 JF715914	F:GGGGGTTAATTTGTAAATAGGG R:TTGTCTCTCGAAGGGTCTCG	(TG) ₄ ATA(TG) ₂ (GAAA)... ₆ (GAAA) _{3...12} (GT) ₂ A(TG) ₅	3	154-160	0.147	0.023	0.155
Hchi36 * JF715915	F:GCTACCAGCTCCACCTTCTG R:GTTGCCTCCTTCTGGTTCAG	(TC) ₈	3	175-200	0.529	0.041	0.607
Hchi75 JF715916	F:GCATTGTGCTTCATAATGTGAG R:GGAAAAAGGAGCACATTCCA	(CT) ₈ (AT) ₇ (CT) ₂	3	179-200	0.323	0.488	0.384
Hchi1105 * JF715917	F:TGTCCGGAAACCTACTCTGG R:TTGAATACCACGGCACACTC	(CT) ₃ T(TC) ₇ ATGTT(TC) ₃ C (CT) _{2...6} (CT) ₃	3	188-210	0.445	0.958	0.554
Hchi108 * JF715918	F:CCTGACGATTGCACAAGAAA R:GCGCAGTGTTCAGATTTTG	(TC) ₄	2	249-270	0.375	1.000	0.505
Hchi159 * JF715919	F:TGCAAATATCCCAAAGTGTG R:TTCTCGATCGCAACCTCTC	(GT) _{6...85} (AG) ₁₅	4	224-240	0.582	0.152	0.640
Hchi211 JF715920	F:CCCACAATACGCATAACACAA R:TGTCGCAAATCGCTAGAAGA	(TG) _{4...82} (CCA) ₂ G(CCA) ₃	1	231	0.000	0.000	0.000
Hchi233 * JF715921	F:GTTTGCGGGTGTTGAAGTTT R:CTAGAAGCACCCACCAAACA	(GT) ₆	2	152-160	0.375	1.000	0.505
Hchi254 JF715922	F:CCCTTGTTCTCTCCCTGAAA R:ACCACACCACCGAGAGACA	(GT) _{6...8} (TC) ₄	3	158-180	0.061	0.064	0.063
Hchi274 JF715923	F:CCCCAAGACCCTACACTA R:TGACAAATCTGTCTAAGAATT TTATGG	(GTT) ₄ GTC(GTT) ₁₃	5	120-152	0.310	0.133	0.342
Hchi279 JF715924	F:GGAACAGAGTGGCTGCTTTT R:TTCGCATCCTTCTCTGACACT	GA(GAA) ₃ (GAAAA) ₂ GAAGA	3	140-160	0.079	0.042	0.082
Avarage			2.91		0.323	0.390	0.384

^a GenBank accession number; * significant deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium ($P \leq 0.001$); F, forward and R, reverse primer sequence; A, number of alleles; PIC, polymorphic information content; H_O and H_E, observed and expected heterozygosity. The PCR profile consisted of 16 touch down cycles with annealing temperature of 65-50°C (-1°C/cycle) followed by 20 additional cycles with annealing temperature of 50°C.

Table 2 - Twelve microsatellite loci developed for *H. chillensis* and tested for cross amplification in 22 samples, representing 10 species of the South American group of *Hypochaeris* and the Moroccan species *H. angustifolia*.

	Hchi15	Hchi36	Hchi75	Hchi105	Hchi108	Hchi159	Hchi160	Hchi211	Hchi233	Hchi254	Hchi274	Hchi279	Useful loci
<i>H. pampasica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12
<i>H. petiolaris</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	11
<i>H. megapotamica</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	10
<i>H. variegata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12
<i>H. argentina</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12
<i>H. neopinnatifida</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12
<i>H. lutea</i>	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	10
<i>H. apargioides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
<i>H. albiflora</i>	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
<i>H. catharinensis</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	10
<i>H. angustifolia</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	5

(+) Successful amplification with expected allele size, (-) absence of amplification.

ARTIGO 2²**ESTRUTURA GENÉTICA DE OITO POPULAÇÕES DE *HYPOCHAERIS CHILLENSIS* (ASTERACEAE) DO BRASIL.²****GENETIC STRUCTURE IN EIGHT POPULATIONS OF *HYPOCHAERIS CHILLENSIS* (ASTERACEAE) FROM BRAZIL.**

Carina de Campos Ferreira Lucio¹, Eduardo Augusto Ruas¹, Claudete de Fátima Ruas^{1*}, Luana Alves Rodrigues¹, Paulo Mauricio Ruas¹

Resumo

Dez locos de microssatélites foram usados para investigar a estrutura genética de oito populações brasileiras de *H. chillensis*. Um total de 37 alelos foram detectados na totalidade dos locos, com 80% de polimorfismo e uma média de 3,7 alelos por loco. A estimativa do número médio de alelos e alelos efetivos por população foi de 2,3 and 1,72, respectivamente. Os índices de heterozigosidade observada variaram de 0,14 to 0,44 e de 0,25 a 0,41, respectivamente. O coeficiente de endogamia (F_{IS}) foi significativo para cinco populações, evidenciando nestas, um excesso de heterozigotos. Foi encontrado um alto grau de diferenciação genética ($F_{ST}=0,3363$), com maior parte da variação (66,37%) identificada dentro de populações, o que evidencia a ausência de estruturação genética das populações estudadas. Análise de distância genética entre pares de populações (F_{ST}), mostrou a ausência de correlação entre distância genética e geográfica. O teste de atribuição de indivíduos às populações mostrou uma pequena taxa de migração em apenas duas populações, evidenciando que a maioria dos indivíduos genotipados foram atribuídos às populações das quais foram amostrados. Os baixos índices de variabilidade encontrados provavelmente são decorrentes do modo aparentemente pioneiro que a espécie coloniza novos ambientes. Os resultados refletem um padrão característico de dispersão a longa distância sugerindo que, após colonização por poucos

¹ Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Biologia Geral, Londrina, PR, Brasil.

^{1*} Autor para correspondência: Claudete de Fátima Ruas, Departamento de Biologia Geral, Rodovia Celso Garcia Cid, s/n, Caixa Postal 6001, 86051-980 Londrina, PR, Brasil. E-mail: ruas@sercomtel.com.br. Telefone: 55- 43- 3371-4191

² Este artigo será submetido à Genetics and Molecular Biology. Estrutura genética de oito populações de *Hypochaeris chillensis* (Asteraceae) do Brasil.

indivíduos, as novas populações se estabeleceram sob ação de efeito fundador e endogamia.

Palavras-chave: Diversidade genética. Genética de populações. SSR.

Abstract

Ten microsatellite loci were used in the investigation of genetic structure of eight populations of *H. chillensis* from Brazil. A total of 37 alleles were detected across all loci, with 80% of polymorphism and average of 3.7 alleles per locus. The estimate number of alleles and effective alleles per population were 2.3 and 1.72, respectively. In terms of overall genetic diversity the observed (H_o) and expected heterozygosities ranged from 0.14 to 0.44 and 0.25 to 0.41, respectively. The rate of inbreeding coefficient (F_{IS}) was significant in five populations, showing an excess of heterozygotes. The level of genetic differentiation was high ($F_{ST}=0.3363$), with most of the genetic variation (66.37%) detected within population. These results are consistent with the lack of genetic structure of the populations studied. The assignment test revealed that most of the genotyped individuals were attributed to the population in which they were sampled, with migrants been detected only between two pairs of populations. There was no positive correlation between pairwise genetic distance (F_{ST}) and geographic distance. The overall results reflect a pattern of long-distance dispersion, suggesting that after colonization by few individuals, the establishment of new populations occurred under influence of founder effects and endogamy.

Key words: Genetic diversity. Genetic of population. SSR.

Introdução

O gênero *Hypochoeris* pertence à família Asteraceae e é representado por plantas herbáceas distribuídas em duas áreas distintas, a região Mediterrânea que possui cerca de 15 espécies, e a América do Sul com cerca de 50 espécies descritas (Lack, 1979). Estudos sugerem que a região mediterrânea é o centro primário de diversificação e que o gênero chegou à América do Sul através de uma ou poucas introduções de um ancestral do Noroeste da África (Tremetsberger *et al.*, 2005). A espécie *Hypochoeris angustifolia*, endêmica do Marrocos, possui características cariotípicas semelhantes às encontradas nas espécies sul-americanas (Tremetsberger *et al.*, 2005). *Hypochoeris angustifolia* ocupa também uma posição intermediária entre as espécies do Mediterrâneo e as

da América do Sul (Tremetsberger et al., 2006; Weiss-Schneeweiss et al., 2008). Tem sido proposto que a chegada do gênero no continente sul-americano ocorreu através de uma ou poucas introduções, provavelmente por mecanismos de dispersão a longa distância (Cerbah et al. 1998b; Stuessy et al. 2003 e Tremetsberger et al., 2005).

Após a chegada do gênero na América do Sul, a grande disponibilidade de ambientes possibilitou a ocorrência de eventos rápidos de radiação adaptativa e especiação, que permitiram às espécies de *Hypochoeris* a ocupação de uma grande variedade de habitats, refletindo um padrão típico de radiação adaptativa (Cabrera e Willink 1980, Stuessy et al., 2003; Tremetsberger et al., 2005).

As espécies sul-americanas de *Hypochoeris* são um excelente modelo para estudos de evolução cariotípica em plantas, pois possuem características interessantes como cariótipo bimodal com número pequeno de cromossomos de tamanhos relativamente grandes (Cerbah et al., 1995, 1998a, 1998b; Ruas et al., 1995, 2005; Weiss et al., 2003, Weiss-Schneeweiss et al., 2003, 2008).

No Brasil as espécies de *Hypochoeris* encontram-se em sua maioria na região Sul, neste contexto, a espécie *H. chillensis* (Kunth) Britton se diferencia das espécies do grupo por apresentar a maior distribuição geográfica (Cabrera, 1976). Esta é uma das espécies mais comumente encontrada e além de apresentar uma grande variabilidade morfológica, apresenta indivíduos intermediários em seus espécimes e hibridiza facilmente com espécies próximas (Cabrera, 1976).

A posição filogenética das espécies do grupo sul-americano, sua chegada até a América do Sul, assim como os mecanismos responsáveis pela diversificação rápida e recente no continente sul-americano, ainda não são completamente explicados. Portanto, o gênero é considerado também um importante modelo para estudos de biogeografia. Assim, espera-se o desenvolvimento de hipóteses biogeográficas específicas com análises de mais taxa das regiões da América do Sul (Stuessy et al., 2003; Tremetsberger et al., 2005). Deste modo, estudos realizados em populações de *H. chillensis* podem auxiliar no esclarecimento dos processos de radiação adaptativa e especiação do gênero na América do Sul.

A caracterização da estrutura genética de populações, a partir de dados de marcadores genéticos co-dominantes como os marcadores microssatélites, fornecem informações que aliadas às características morfológicas e ecológicas podem ser úteis para uma melhor compreensão da biologia da espécie e de suas interações (Telles *et al.*, 2001).

Estudos de diversidade genética e padrões biogeográficos em *Hypochaeris* foram realizados para três espécies andinas (*H. acaulis*, *H. tenuifolia*, e *H. palustris*) na América do Sul (Tremetsberger *et al.*, 2003a; 2003b; Muellner *et al.*, 2005), para as espécies da Península Ibérica, *H. salzmänniana*, *H. radicata* e *H. glabra* (Tremetsberger *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2007) e para espécie marroquina *H. angustifolia* (Terrab *et al.*, 2009) através de marcadores AFLP. Poucos trabalhos foram realizados através de marcadores microssatélites. Bibliotecas enriquecidas em microssatélites foram construídas para espécies do mediterrâneo *H. radicata* (Mix *et al.*, 2004; 2006) e *H. salzmänniana* (Ruas *et al.*, 2009), uma espécie em risco de extinção.

No Brasil são conhecidas cerca de dez espécies de *Hypochaeris*, sendo a maioria endêmica da região Sul. Dentre as espécies brasileiras, *H. chillensis* (Kunth) Britton se destaca por apresentar ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o Rio Grande do Sul até o Estado de São Paulo (Cabrera, 1976). Além do padrão de distribuição característico, *H. chillensis* também se destaca por sua grande variabilidade morfológica e pela capacidade de formar híbridos naturais (Azevedo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007). Neste estudo, foram utilizados dez locos de microssatélites a fim de investigar a variabilidade genética de oito populações brasileiras de *H. chillensis*.

Material e Métodos

Estratégia Amostral

Foram amostrados 184 indivíduos de *H. chillensis* em oito localidades ao longo de quatro Estados de ocorrência da espécie: São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Tabela 1). Para diminuir as chances de amostragem de indivíduos aparentados, foi tomada uma distância de pelo menos 5 metros entre plantas. A área de distribuição das populações

amostradas é apresentada na Figura 1. Folhas jovens foram coletadas em sílica gel para extração de DNA. Um representante de cada população foi depositado no herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL).

Tabela 1 - Locais de coleta de *H. chillensis* no Sudeste e Sul do Brasil.

Município/ Estado	Sigla	Coordenadas (S,O)	N
São Paulo			
Universidade Estadual de Campinas, Campinas ³ (FUEL 48675)	CAM-SP	22°49'47°04'	31
Zona Rural, Rodovia Raposo Tavares Km 189, Itapetininga ³ (FUEL 48810)	ITA-SP	23°36'48°07'	29
Paraná			
Universidade Estadual de Londrina, Londrina ³ (FUEL 48674)	UEL-PR	26°26'51°14'	19
Zona Rural, Rodovia PR-090, São Jerônimo da Serra ³ (FUEL 48682)	SJ-PR	24° 09'50°52'	21
Santa Catarina			
Rodovia entre São José do Cevito e Campos Novos, Lages ^{1,2} (FUEL 48681)	LAG-SC	27°31'50°53'	31
Área urbana, Balneário Cambúriu ^{1,2} (FUEL 48684)	BCA-SC	24°12'50°56'	29
Rio Grande do Sul			
Rodovia de São Francisco de Paula ^{1,2}	SFP-RS	29°26'50°34'	7
Fazenda São Maximiliano, Guaíba ^{1,2} (FUEL48683)	SM-RS	30°09'51°22'	17

Coletores: ¹ Ruas, CF; ² Ruas, PM; ³ Lucio, CCF. N, Número de indivíduos amostrados. FUEL – Herbário da Universidade Estadual de Londrina.

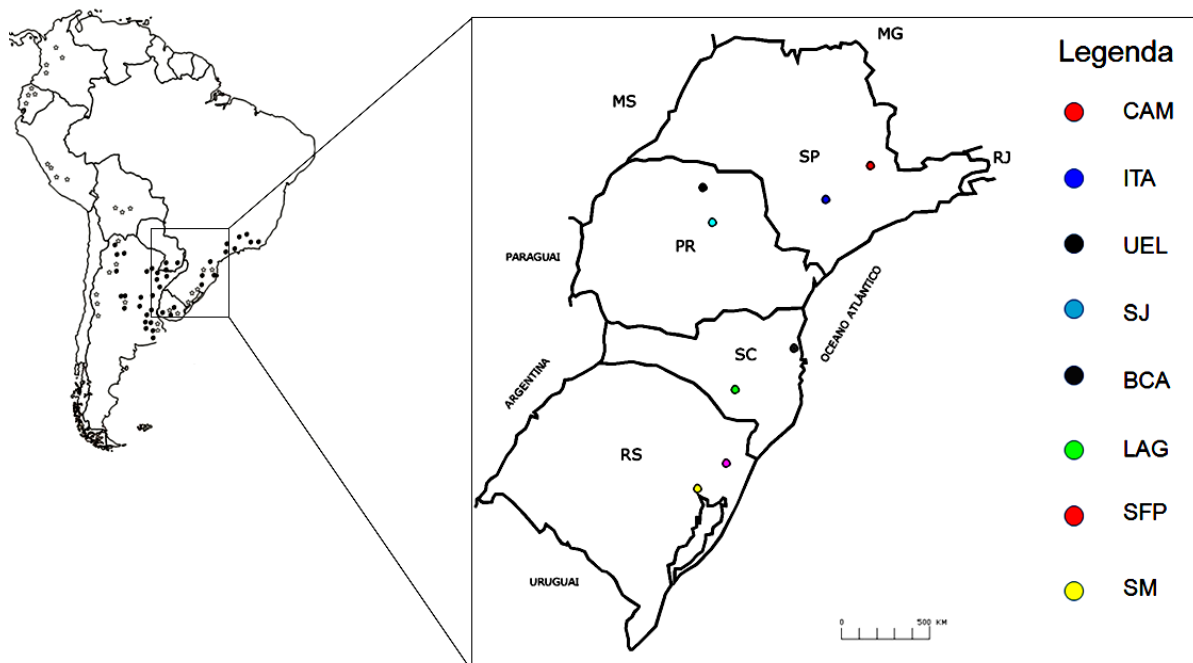


Figura 1 - Distribuição geral de *H. chillensis* na América no Sul (adaptado de Cabrera, 1976) e áreas de coleta de oito populações amostradas nos Estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. CAM - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP; ITA – Zona Rural, Rodovia Raposo Tavares Km 189, Itapetininga, SP; UEL – Campus da Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR; SJ - Zona Rural, Rodovia PR-090, São Jerônimo da Serra – PR; BCA - Área urbana, Balneário Camburiú, SC; LAG - Rodovia entre São José do Cerrito e Campos Novos, Lages – SC; SFP - Rodovia entre São Francisco de Paula e Rio Bonito, RS; SM - Fazenda São Maximiniano, Guaíba – RS

Extração de DNA e PCR

Foi extraído DNA genômico de cada indivíduo amostrado de acordo com o protocolo CTAB (cetyltrimethyl-ammonium bromide) conforme Doyle e Doyle (1987) com modificações (Tremetsmerger *et al.*, 2003b). Para testar a integridade do DNA, as amostras extraídas foram submetidas a uma eletroforese (100 V) por 45 minutos, coradas com brometo de etídeo (10 µg/mL) em gel de agarose a 1%. A concentração final de cada amostra foi determinada por quantificação em fluorímetro (DyNA Quant 200, Höfer-Pharmacia).

Para as reações de PCR foram utilizados 10 *primers* desenvolvidos para *H. chillensis* conforme descrito na Tabela 2. As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 10 µL contendo, 3,5 µL de *GoTaq Green Master Mix* (tampão 2x, pH 8,5, 1600µM dNTP e MgCl 3mM; Promega), 0,25µL de cada *primer*

(2,5pM), 1,5 μ L (0,5 ng/ μ L) de DNA, ajustando o volume final com água estéril. As reações de PCR foram realizadas em termociclador PTC200 (MJ Research), utilizando um programa *touch down* segundo Ruas (2009). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida:bis-acrilamida (29:1) a 7%, durante 2 horas e 30 minutos a 200V e corados com nitrato de prata. O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com o auxílio de um marcador de peso molecular padrão de 50 pb (Ludwig Biotecnologia).

Análise dos Dados

A porcentagem de locos polimórficos (P_P), número de alelos por loco (A), número de alelos efetivos por loco (A_e), heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) conforme Nei (1978), foram calculados através do programa POPGENE v. 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). A variabilidade genética total entre e dentro de populações, bem como o índice de fixação alélica (F_{ST}) foram estimados utilizando a análise de variância molecular (AMOVA) pelo programa ARLEQUIN v. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Os coeficientes de endogamia (F_{IS}) para cada população foram testados para o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando testes de probabilidade que foram calculados com o programa FSTAT (Goudet, 2002).

A ocorrência de migração entre as populações foi estimada por métodos de análises *bayesianas* utilizando o programa BAYESASS (Wilson e Rannala, 2003). Para verificar uma possível correlação entre distância geográfica e genética, foi realizado o teste correlação de Pearson, com base nos valores de F_{ST} entre pares de populações e as distâncias geográficas, Pearson com a aplicação do software BIOESTAT 5.0 (Ayres *et al.*, 2007). Para verificar se as populações estudadas passaram por um efeito de gargalo recente foi feito um teste de sinal utilizando o programa BOTTLENECK (Cornuet e Luikart, 1996; Piry *et al.*, 1999), a partir de três modelos: *Infinite Mutation Model* (IMM), *Two phase model* (TPM) e o *Stepwise Mutation Model* (SMM).

Resultados

Diversidade Genética

Os 10 locos polimórficos usados para investigar a diversidade e estrutura genética em oito populações de *H. chillensis* identificaram um total de 37 alelos com uma frequência de 3-5 alelos por loco, com uma média de 3,7 alelos por loco (Tabela 2). Foram identificados alelos população-específicos no loco Hchi105, presente em três dos 31 indivíduos da população de Lages (SC), no loco Hchi233, em dois indivíduos da população de Balneário Camboriú (SC) e no loco Hchi108, em 23 indivíduos da população de Campinas (SP).

Tabela 2 - Características de 10 pares de primers desenvolvidos por Lucio *et al.* (em análise para publicação, Am. J. Bot.) para *H. chillensis*.

Loco ^a (GenBank)	Sequência do <i>motif</i>	A	Amplitude alélica (pb)
Hchi15 JF715914	(TG) ₄ ATA(TG) ₂ (GAAA)... ₆ (GAAA) ₃ ... ₁₂ (GT) ₂ A(TG) ₅	4	150-170
Hchi36 JF715915	(TC) ₈	3	175-200
Hchi75 JF715916	(CT) ₈ (AT) ₇ (CT) ₂	5	160-190
Hchi105 JF715917	(CT) ₃ T(TC) ₇ ATGTT(TC) ₃ C(CT) ₂ ... ₆ (CT) ₃	3	180-210
Hchi108 JF715918	(TC) ₄	3	250-270
Hchi159 JF715919	(GT) ₆ ... ₈₅ (AG) ₁₅	4	210-240
Hchi211 JF715920	(TG) ₄ ... ₈₂ (CCA) ₂ G(CCA) ₃	3	220-250
Hchi233 JF715921	(GT) ₆	4	140-170
Hchi274 JF715923	(GTT) ₄ GTC(GTT) ₁₃	5	120-150
Hchi279 JF715924	GA(GAA) ₃ (GAAAA) ₂ GAAGA	3	140-160

(A), número de alelos por loco. ^aNúmero de acesso ao GenBank. As reações de PCR consistem em 16 ciclos *touch down* com uma temperatura de anelamento de 65-48°C (-1°C/ciclo), seguidos de 20 ciclos adicionais com uma temperatura de anelamento de 50°C.

A média de locos polimórficos para as oito populações analisadas foi de 80%, sendo a menor observada nas populações Londrina (PR) e de Balneário Camboriú (70%) e o maior valor observado na população de São Jerônimo da Serra (PR) (100%). O número de alelos por loco variou de 2,00, para as populações de Itapetininga (SP) e São Jerônimo da Serra (PR), a 2,70 para a população de Lages (SC), com uma média de 2,30 entre as populações. O número de alelos efetivos (A_e) variou de 1,49 (Balneário Camboriú) a 1,82 (São Francisco de Paula-RS) com um valor médio entre as populações de 1,72. A heterozigidade média para as oito populações estudadas foi de 0,35 com o menor valor observado na população de Balneário Camboriú (0,14) e o maior valor para a população de São Jerônimo da Serra (0,44). A heterozigidade esperada variou de 0,25, para a população de Balneário Camboriú, a 0,42 para a população de São Francisco de Paula, com um valor médio de 0,36 (Tabela 3). O coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) foi significativo para as populações de Itapetininga, Lages, Balneário Camboriú, São Francisco de Paula e Guaíba. As outras três populações, Campinas, Londrina e São Jerônimo da Serra tiveram um valor de F_{IS} não significativo ao nível de 5% (Tabela 3).

Tabela 3 - Estimativas de variação genética conforme Nei (1978) para 10 locos microssatélites em oito populações de *H. chillensis*.

Populações	N	P_P	A	A_E	H_O	H_E	F_{IS}
CAM-SP	31	80	2.40	1.53	0.29	0.27	-0.043
ITA-SP	29	80	2.00	1.72	0.28	0.36	0.234*
UEL-PR	19	70	2.10	1.53	0.28	0.27	0.007
SJ-PR	21	100	2.00	1.77	0.44	0.41	-0.033
LAG-SC	31	80	2.70	1.79	0.29	0.33	0.149*
BCA-SC	29	70	2.30	1.49	0.14	0.25	0.478*
SFP-RS	07	90	2.20	1.82	0.31	0.42	0.344*
SM-RS	17	80	2.30	1.67	0.28	0.33	0.194*
Médias		80	2.30	1.72	0.35	0.36	

N , número de indivíduos por população; P_P , porcentagem de locos polimórficos; A , número de alelos por loco; A_E , número de alelos efetivos por população; H_O , heterozigidade observada; H_E , heterozigidade esperada; F_{IS} , coeficiente de endogamia; * F_{IS} significativo a 5% de probabilidade.

As estimativas de Bottleneck, obtidas pelo teste de sinal (Cornuet e Luikart, 1996; Piry *et al.*, 1999) mostraram que as populações de Itapeninga, São Jerônimo da Serra e São Francisco de Paula apresentam significância para excesso de heterozigidade segundo os três modelos de mutação, *Infinite allele Model*, *Two-Phase Model* e *Stepwise Mutation Model* (Tabela 4).

Tabela 4 – Teste de sinal para excesso de heterozigidade para 10 locos microssatélites em oito populações de *H. chillensis*.

Populações	Número de indivíduos	IAM ^a		TPM ^b		SMM ^c	
		H _d /H _e	P	H _d /H _e	P	H _d /H _e	P
CAM	31	4/4	0,626	4/4	0.550	5/3	0.226
ITA	29	1/7	0.020*	1/7	0.030*	1/7	0.034*
UEL	19	3/4	0.478	3/4	0.591	3/4	0.619
SJ	21	2/8	0.020*	2/8	0.041*	2/8	0.051*
LAG	31	4/4	0.622	4/4	0.525	4/4	0.482
BCA	29	3/4	0.434	3/4	0.520	5/2	0.186
SFP	7	1/8	0.026*	1/8	0.028*	1/8	0.037*
SM	17	2/6	0.078	2/6	0.202	3/5	0.423

^a *Infinite allele model*; ^b *Two-phase model*; ^c *Stepwise mutation model*;

H_d/H_e representa a razão entre o número de locos com excesso de heterozigidade e o número de locos com deficiência de heterozigidade. A razão H_d/H_e é esperada em aproximadamente 1:1 para populações que não sofreram efeito gargalo de garrafa. H_e é esperado ser maior do que H_d para populações que recentemente sofreram um gargalo de garrafa (Luikart e Cornuet, 1998). P ≤ 0,05 significância para excesso de heterozigidade.

A partir de métodos de análises *bayesianas* (Wilson e Rannala, 2003) verificou-se que somente as populações de Itapetinga e Balneário Camboriú tiveram a sua variabilidade genética alterada pela migração. Entretanto, a taxa de migração foi pequena, variando entre 0,3% a 6,61%, na população de Balneário Camboriú, enquanto na população de Itapetinga a porcentagem de migrantes ficou entre 6,5% e 18,6% (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias e intervalo de confiança a 95% (IC) das distribuições *a posteriori* das proporções de indivíduos não-migrantes e migrantes para as oito populações de *H. chillensis*, com base no método de atribuição bayesiana de Wilson e Rannala (2003) em BAYESASS.

Populações	Não-migrantes (95% IC)	*Migrantes (95% IC)
CAM-SP	0.988 (0.956, 1.000)	N/M
ITA-SP	0.852 (0.789, 0.911)	LAG 0.124 (0.065, 0.186)
UEL-PR	0.982 (0.940, 1.000)	N/M
SJ-PR	0.979 (0.917, 0.999)	N/M
LAG-SC	0.986 (0.957, 1.000)	N/M
BCA-SC	0.957 (0.914, 0.988)	ITA 0.023 (0.003, 0.061)
SFP-RS	0.900 (0.766, 0.995)	N/M
SM-RS	0.981 (0.932, 0.999)	N/M

*Migrantes são indicados pela população de origem e pelas taxas de migração. N/M: ausência de migrantes.

Estrutura Genética das Populações de *Hypochoeris chillensis*

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou uma alta diferenciação ($F_{ST} = 0,336$, $P \leq 0,05$) entre oito populações estudadas. Nosso estudo mostrou que 66,37% da variabilidade genética foi observada dentro de populações e 33.63% entre populações (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de variância molecular (AMOVA) de oito populações de *H. chillensis* utilizando 10 locos microssatélites.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de Variância	% de Variação
Entre Populações	7	113.390	0.3433	33.63**
Dentro Populações	360	243.931	0.6776	66.37
Total	367	357.321	1.0209	

Índice de Fixação (F_{ST}) = 0.3363

** $P \leq 0.01$ (significância dada pelo teste com 10.100 permutações).

Os valores de F_{ST} par a par entre as populações variou de 0.029, entre as populações de São Jerônimo da Serra e de Guaíba, a 0.62, entre as populações de Londrina e Balneário Camboriú. Valores das distâncias genéticas entre as populações (F_{ST} par a par) assim como as distâncias geográficas entre as

populações são apresentados na Tabela 7. O teste de Pearson, não mostrou correlação significativa ($r = 0,0791$, $P = 0,6892$) entre distâncias genética e geográfica (Figura 2).

Tabela 7 – Matriz de distâncias geográficas e genéticas. Acima da diagonal estão as distâncias geográficas, em km, entre as populações de *H. chillensis*. Abaixo da diagonal, valores de F_{ST} entre pares de populações.

Populações	CAM	ITA	UEL	SJ	LAG	BCA	SFP	SM
Estado	SP	SP	PR	PR	SC	SC	RS	RS
CAM-SP	----	132	453	416	650	482	818	923
ITA-SP	0.131	----	344	296	528	380	702	804
UEL-PR	0.076	0.079	----	65	504	491	679	750
SJ-PR	0.206	0.120	0.125	----	453	427	630	706
LAG-SC	0.310	0.104	0.298	0.185	----	207	182	276
BCA-SC	0.623	0.570	0.629	0.421	0.517	----	346	454
SFP-RS	0.349	0.238	0.320	0.092	0.212	0.291	----	110
SM-RS	0.323	0.212	0.253	0.029	0.246	0.474	0.158	----

$P \leq 0.01$, significância dada pelo teste com 10.100 permutações.

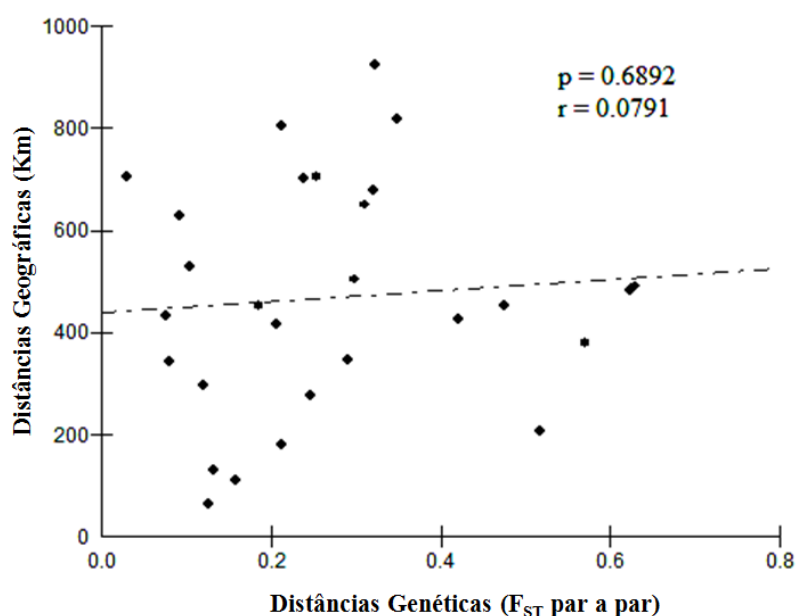


Figura 2 - Correlação de Pearson entre o F_{ST} par a par e as distâncias geográficas para 10 locos microssatélites em oito populações de *H. chillensis*. ($P \leq 0.05$)

Discussão

Diversidade Genética

No presente estudo, a variabilidade genética de oito populações de *H. chillensis*, distribuídas desde o estado do Rio Grande do Sul até o estado de São Paulo, foi investigada usando marcadores de microssatélites.

Foram observados baixos níveis de variabilidade genética em todas as populações, quando comparadas com populações da espécie européia *H. radicata* (Mix *et al.*, 2006). Os valores médios das estimativas de alelos e alelos efetivos por população foram de 2,30 e 1,72, respectivamente, enquanto que Mix *et al.* (2006) encontraram 12,0 e 3,36 em *H. radicata*. As médias de heterozigosidade observada e esperada entre as populações foram de 0,35 e 0,36, respectivamente, enquanto Mix *et al.* (2006) encontraram 0,82 e 0,88 para *H. radicata*. Possivelmente, os valores dos parâmetros que medem a variabilidade genética de *H. chillensis* foram tão baixos, pelo fato de que em algumas populações foi observado um forte efeito de endocruzamento (F_{IS}), tendo como consequência a redução na quantidade de heterozigotos, enquanto outras populações sofreram um efeito de deriva genética recente. Na população de Balneário Camboriú observou-se, valores de heterozigosidade observada e esperada de 0,14, e 0,25, respectivamente. Estes valores estão associados a um valor de F_{IS} superior àqueles observados nas outras populações, indicando uma grande deficiência de heterozigotos em relação às demais populações em que o F_{IS} foi significativo. Assim, nas populações de Itapetininga, São Jerônimo da Serra e São Francisco de Paula, em que se observa um menor valor de F_{IS} , embora ainda significativo, vê-se que a variabilidade genética foi também comprometida pela ação do endocruzamento, embora em menor grau. De acordo com Piry *et al.* (1999), populações que tenham experimentado uma redução recente em seu tamanho efetivo mostram uma correlação entre redução no número de alelos e a heterozigosidade em locos polimórficos. Porém, neste caso, o número de alelos é reduzido mais rapidamente que a heterozigosidade. Este efeito de deriva genética foi observado nas populações de Itapetininga, São Jerônimo da Serra e São Francisco de Paula. Observa-se que a variabilidade genética das populações de Itapetininga e São Francisco de Paula foi afetada tanto pelo efeito de

deriva genética como pelo efeito de endocruzamento (F_{IS}). Além disso, a análise Bayesiana (Wilson e Ranala, 2003), mostrou ausência de migrantes em seis das oito populações investigadas. As duas populações restantes apresentaram uma pequena taxa de migração, entre 0,3% a 6,61%, da população de Itapetininga para Balneário Camboriú, e entre 6,5 e 18,6% da população de Lages para Itapetininga. Em função de seus baixos valores, as taxas de migração observadas não anularam os efeitos de endocruzamentos, evidenciados pelos valores de F_{IS} nestas duas populações.

Hypochoeris chillensis tem como centro de origem a região de Chillo, no Equador (Cabrera, 1976), de onde, supõe-se, se deu a dispersão por grande parte da América do Sul. Esta espécie apresenta características comuns na família Asteraceae, tais como a alta capacidade de colonizar novos ambientes, principalmente devido ao desenvolvimento de estruturas especializadas na dispersão (Pyšek, 1997). Por exemplo, a presença de páppus nas sementes facilita a dispersão e o estabelecimento em ambientes propícios às suas características aparentemente pioneiras, tal como observado por Maraschin-Silva *et al.* (2009). Estes autores observaram nos primeiros cinco anos de regeneração florestal a presença de *H. chillensis* que, entretanto, passados 15 anos não foi mais encontrada, evidenciando a característica heliófita e de planta pioneira em ambientes abertos diversos (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007).

As populações de *H. chillensis* coletadas nas regiões de Londrina, São Jerônimo da Serra, Itapetininga e Balneário Camboriú, se estabeleceram em áreas que, em um passado recente, tinham uma cobertura florestal característica de mata atlântica e que hoje deram lugar às áreas abertas, próprias para o estabelecimento da espécie. Entretanto, apesar da grande capacidade de colonização, possivelmente por mecanismos de dispersão a longa distância, a baixa variabilidade genética identificada em *H. chillensis* evidencia que as sucessivas colonizações ocorreram através de poucas sementes, que não representavam todo o *pool* genético da espécie. Assim, conclui-se que essas populações passaram por um efeito fundador, onde eventos de dispersão e nova colonização a partir de poucos indivíduos levaram a perda da variabilidade genética, o que explica em parte os baixos índices de diversidade genética encontrados nas populações estudadas.

Estrutura Genética das Populações de *Hypochaeris chillensis*

A análise de variância molecular (AMOVA) mostra uma maior diversidade genética dentro (66,63%) do que entre (33,37%) as populações. O índice de fixação (F_{ST}) foi de 0,336, um valor considerado alto, segundo parâmetros estabelecidos por Hartl e Clark (2007), onde valores de F_{ST} superiores a 25% representam níveis elevados de diversidade genética entre populações. Altos valores de diversidade gênica foram identificados dentro de populações, em espécies alógamas de *Hypochaeris* (Tremetsberger *et al.* 2003b), enquanto os menores níveis de variância interpopulacional foram encontrados em espécies autógamias restritas ou com sistema de cruzamento misto (Tremetsberger *et al.*, 2003a; Muellner *et al.*, 2005).

Embora não existam estudos específicos sobre o sistema de cruzamento em *H. chillensis*, os valores de diversidade gênica descritos acima sugerem esta é uma espécie de fecundação cruzada. Entretanto, Torres e Galetto (2008) constataram a ocorrência de auto-fecundação espontânea em *H. chillensis*, o que é consistente com o nível de diversidade genética identificado entre populações. Assim, apesar de aparentemente *H. chillensis* apresentar um sistema de reprodução preferencial por fertilização cruzada, a capacidade de auto-fecundação oferece à espécie uma grande vantagem como planta pioneira, pois possibilita a colonização a partir de poucos indivíduos, com a população sendo estabelecida por auto-fecundação.

A análise de F_{ST} entre pares de populações mostrou distâncias genéticas variadas e ausência de correlação entre distância genética e geográfica. Embora os mecanismos de dispersão não sejam conhecidos, os resultados refletem um padrão característico de dispersão a longa distância sugerindo que, após colonização por poucos indivíduos, as novas populações se estabeleceram sob ação de efeito fundador e endogamia. Estudos posteriores, incluindo representantes do centro de origem serão feitos para confirmar os resultados do presente trabalho.

Conclusões

1. As populações de *H. chillensis* estudadas neste trabalho mostraram baixos índices de variabilidade genética devido ao efeito de endocruzamento e efeito fundador.
2. O efeito fundador é decorrente do modo o qual as regiões estudadas foram colonizadas.
3. Devido ao efeito fundador, essas populações não obedecem a uma correlação entre distâncias genéticas e geográficas.

Agradecimentos

C. C. F. Lucio agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de mestrado. C. F. Ruas agradece à CAPES pelo apoio financeiro.

Referências

Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DI, Santos As (2007) Bioestat: 2.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológica e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém.

Azevêdo-Gonçalves CF, Matzenbacher NI (2007) O Gênero *Hypochoeris* L. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia. Ser. Bot. 62: 55-87.

Cabrera, AL (1976) Materiales para una revisión, del género *Hypochoeris*. I. *Hypochoeris chillensis* (H.B.K.) Hieron. Darwiniana, v. 20, n. 3-4, pp 312-322.

Cabrera AL, Willink A (1980) Biogeografía de América Latina. O.E.A., Washington, DC.

Cerbah MJ, Coulaud B, Godelle S, Siljak-Yakovlev S (1995.) Genome size fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. Genome, 38:689-695.

Cerbah M, Coulaud J, Siljak-Yakovlev S (1998a) rDNA organization and evolutionary relationship in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). The J Heredity 89:312-318.

Cerbah M, Souza-Chies T, Jubier M F, Lejeune B, Siljak-Yakovlev S (1998b) Molecular phylogeny of the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). *Mol Biol Evol* 15:345-354.

Cornuet JM e Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.

Doyle JJ e Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Photochemistry Bulletin* 19:11-15.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1:47-50.

Goudet J (2002) FSTAT: a program to estimate and test diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>. Acesso: mar. 2011.

Hartl DL, Clark AG (2007) Principles of population genetics. 4 ed. Sunderland: Sinauer Associates, 652 pp.

Lack H W (1979). The subtribe Hypochoeridinae (Asteraceae, Lactuceae) in the tropics and the Southern Hemisphere. In: Tropical botany—Larsen K, Holm-Nielsen LB, eds. Academic Press pp 265-276.

Maraschin-Silva F, Scherer A, Baptista LRM (2009) Diversidade e estrutura do componente herbáceo-subarbustivo em vegetação secundária de Floresta Atlântica no Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, Vol. 7, No 1.

Lucio CCF (2010) Estudos genéticos em populações da espécie *Hypochoeris chillensis* (Asteraceae) usando marcadores microssatélites. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina.

Luikart G e Cornuet J M (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv Genet* 12:228-237.

Mix C, Arens PFP, Ouborg NJ, Smulders MJM (2004) Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite markers in *Hypochoeris radicata* (Asteraceae). *Molecular ecology notes* 4: 656-658.

Mix C, Arens FP, Rengelink R, Smulders MJM, van Groenendael JM, Ouborg NJ (2006) Regional gene flow and population structure of the wind-dispersed plant species *Hypochoeris radicata* (Asteraceae) in an agricultural landscape. *Molecular Ecology* 15: 1749-1758.

Muellner AN, Tremetsberger K, Stuessy T, Baeza CM (2005) Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochoeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). *Mol. Ecol.* 14:203-212.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.

Ortiz MA, Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy TF, Garcia-Castano JL (2007) Population structure of *Hypochoeris salzmanniana* DC. (Asteraceae), an endemic species to the Atlantic coast on both sides of the Strait of Gibraltar, in relation to Quaternary sea level changes. *Molecular Ecology* 16:541–552.

Piry S, Luikart G e Cornuet JM (1999) Bootleneck: A program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data. *Journal of Heredity* 90(4):502-503. 90:502-50.

Pyšek P (1997) Compositae as invaders: better than the others. *Preslia* 69: 9–22.

Ruas CF, Ruas PM, Matzenbacher N I, Ross G, Bernini C, Vanzela ALL (1995) Cytogenetic studies of some *Hypochoeris* species (Compositae) from Brazil. *Amer J Bot* 82: 369-375.

Ruas CF, Vanzela ALL, Santos MO, Fregonezi JN, Ruas PM, Matzenbacher N, Aguiar-Perecin MLR (2005) Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochoeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 28:129-13.

Ruas CF, Nakayama TJ, Ortiz MA, Kuroki MA, Stuessy TF, Tremetsberger K, Ruas EA, Santos MD, Talavera S, Ruas PM (2009) Isolation and characterization of eight microsatellite loci from the endangered plant species *Hypochoeris salzmanniana* (Asteraceae). *Conserv Genet* 10(5): 1413-1416.

Ruas EA, Conson ARO, Costa BF, Damasceno JO, Rodrigues LA, Reck M, Vieira AOS, Ruas PM, Ruas CF (2009) Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) and intergeneric transferability. *Conservation Genet Resource* 1:245–248.

Stuessy TF, Tremetsberger K, Mullner AN, Jankowicz J, Guo Y-P, Baeza CM, Samuel RM. (2003) The melding of systematics and biogeography through investigations at the populational level: examples from the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). *Basic. Appl. Ecol.* 4:287–296.

Telles M, Diniz-Filho J, Coelho A, Chaves L (2001) Autocorrelação espacial das frequências alélicas em subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC *Myrtaceae*) no Sudeste de Goiás. *Revista Brasileira de Botânica.* 24 (2):145-154.

Terrab A, Ortiz MA, Talavera M, Ariza MJ, Moriana MC, Garrcía-Cataño JL, Tremetsberger K, Stuessy TF, Baeza M, Urtubey E, Ruas CF, Casimiro-Soringuer R, Balao F, Gibbs PE, Talavera S (2009) AFLP and breeding system studies indicate vicariance origin for scattered populations and enigmatic low fecundity in the Moroccan endemic *Hypochoeris angustifolia* (Asteraceae), sister taxon to all of the South American *Hypochoeris* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53:13-22.

Maraschin-Silva F, Scherer A, Baptista L (2009) Diversidade e estrutura do componente herbáceo-subarbuscivo em vegetação secundária de Floresta Atlântica no Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biociências, América do Norte,* 716 03.

Torres C e Galetto L (2008) Importancia de los polinizadores en la reproducción de asteraceae de argentina central. Acta Bot. Venez., dic. vol.31, no.2, PP 473-494.

Tremetsberger K, Stuessy TF, Guo YP, Baeza CM, Weiss H, Samuel RM (2003a) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. Taxon 52:237–245.

Tremetsberger K, Stuessy TF, Samuel RM, Baeza CM, Fay MF (2003b) Genetics of colonization in *Hypochaeris tenuifolia* (Asteraceae, Lactuceae) on Volcán Lonquimay, Chile. Molecular Ecology 12:2649–2659.

Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy TF, Ortiz MA, Weiss-Schneeweiss H, Kadlec G (2004) Relationship of *Hypochaeris salzmanniana* (Asteraceae, Lactuceae), an endangered species of the Iberian Peninsula, to *H. radicata* and *H. glabra* and biogeographical implications. Botanical Journal of the Linnean Society 146:79–95.

Tremetsberger K, Weiss-Schneeweiss H, Stuessy T, Samuel R, Kadlec G, Ortiz MA, Talavera S (2005) Nuclear ribosomal DNA and karyotypes indicate a NW African origin of South American *Hypochaeris* (Asteraceae, Cichorieae). Mol. Phylogenet. Evol. 36:102-116.

Tremetsberger K, Stuessy TF, Kadlec G, Urtubey E, Baeza CM, Beck SG, Valdebenito HÁ, Ruas CF, Matzenbacher NI (2006) AFLP phylogeny of South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). Syst. Bot. 31:610–626.

Weiss H, Stuessy TF, Grau J, Baeza CM (2003) Chromosome reports from South American *Hypochaeris* (Asteraceae). Ann. Missouri. Bot. Gard. 90:53-63.

Weiss-Schneeweiss H, Stuessy TF, Siljak-Yakovlev S, Baeza CM, Parker J (2003) Karyotype evolution in South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). Plant Syst. Evol. 241: 171-184.

Weiss-Schneeweiss H, Tremetsberger K, Schneeweiss GM, Parker JS, Stuessy TF (2008) Karyotype Diversifications and Evolution in Diploid and Polyploid South American *Hypochaeris* (Asteraceae) Inferred from rDNA Localization and Genetic Fingerprint Data. Ann Bot. 101:909-918.

Wilson GA e Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. Genetics 163:1177-1191.

Yeh FC, Boyle T, Rongcai Y, Ye Z, Xizyan JM (1997) Popgene 1.31, a software for the analysis of genetic variation among and within populations using co-dominant and dominant markers.

CONCLUSÃO

Todos os 12 pares de *primers* confeccionados para *Hypochoeris chillensis* tiveram transferibilidade para a maioria das espécies sul-americanas e alguns deles para *H. angustifolia*, esses marcadores, portanto, podem ser úteis para auxiliar na elucidação dos processos evolutivos acontecidos entre as espécies sul-americanas. Dentre esses *primers*, 10 foram aplicados para investigar a estrutura genética de populações em *H. chillensis*. Os resultados obtidos mostram que a espécie possui um padrão característico de dispersão a longa distância sugerindo que, após colonização por poucos indivíduos, as novas populações se estabeleceram sob ação de efeito fundador e endogamia.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A.C. (Ed.) **Eletoforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p. 329-380.

ARNOLD, M.L. Natural Hybridization and Evolution. In: _____ **Ecology and Evolution**, London: Oxford University Press, 1997.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2.ed. Sunderland: Sinauer, 2004.

AYRES, M.; AYRES, J.R. M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **Bioestat: 2.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológica e médicas**. Belém: Sociedade Civil, 2005.

AZEVÊDO-GONÇALVES, C. F.; MATZENBACHER, N. I. Três híbridos naturais no gênero *Hypochoeris* L. (Asteraceae) no Sul do Brasil. **Hoehnea** 32: 361-368, 2005.

AZEVÊDO-GONÇALVES, C.F.; MATZENBACHER, N.I. O Gênero *Hypochoeris* L. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia. Ser. Bot.** 62: 55-87, 2007.

BECKER, J.; HEUN, M. Barley microsatellites: allele variation and mapping. **Plant Mol Biol** 27:835-845, 1995.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.R.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v. 54, p. 277–288, 1999.

BORTIRI, E. Asteraceae, parte 14. Tribu XIII. Lactuceae: *Hypochoeris*. **Flora Fanerogâmica Argentina**, 63: 1-25, 1999.

BREMER, K. **Asteraceae: cladistics & classification**. Portland: Timber Press, 1994,

BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene** 234(2):177-186, 1999

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microsatélites. **Circular Técnica**. n. 20, p. 1-11, 2003.

CABRERA, A.L. Estudios sobre o gênero *Hypochoeris*. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v. 10, n. 2-3, p. 166- 195, 1963.

CABRERA, A. L. Materiales para una revision del género *Hypochoeris* I. *Hypochoeris chillensis* (H.B.K.) Hieron. **Darwiniana** 22: 312-322, 1963.

CABRERA, A.L. Materiales para una revisión, del gênero *Hypochoeris*. I. *Hypochoeris chillensis* (H.B.K.) Hieron. **Darwiniana**, v. 20, n. 3-4, p. 312-322, 1976.

- CABRERA, A.L.; WILLINK, A. **Biogeografía de América Latina**. O.E.A., Washington, DC, Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, 1980.
- CAIXETA, E.T.; BORÉM, A. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2006. cap. 1, p. 23-24,
- CARLQUIST, S. Wood anatomy of the endemic woody Asteraceae of St Helena I: phyletic and ecological aspects. **Bot. J. Linn. Soc.** 137, 197–210, 2001.
- CERBAH, M.J.; COULAUD. B.; GODELLE, S.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Genome size fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. **Genome**, 38:689-695, 1995.
- CERBAH, M.; COULAUD, J.; SILJAK-YAKOVLEV, S. rDNA organization and evolutionary relationship in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). **The J Heredity** 89:312-318, 1998a.
- CERBAH, M.; SOUZA-CHIES, T.; JUBIER, M. F.; LEJEUNE, B.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Molecular phylogeny of the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). **Mol Biol Evol** 15:345-354, 1998b.
- CHASE, M.; KESSELY, R.; BAWA, K. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. **American Journal of Botany**, v.83, n.1, p.51-57, 1996.
- COCKERHAM, C.C. Variance of gene frequencies. In _____ Evolution. **Lancaster**, v.23, p.72-84, 1969.
- COSTA, P.; POT, D.; DUBOS, C.; FRIGERIO, J.M.; PIONNEAU, C.; ODENES, C.; BERTOCCHI, E.; CERVERA, M.T.; RMINGTON, D.L.; PLOMION, C.A. Genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. **Theoretical and Applied Genetics** 100:39-48, 2000).
- CORNUET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics** 144:2001-2014, 1996.
- CRAWFORD, D. J. **Plant molecular systematics**. New York: John Wiley, 1990.
- CRAWFORD, D. J. Plant macromolecular systematics in the past 50 years: one view. **Taxon**, 49: 479-502, 2000.
- DIAS, L. Análises Multidimensionais. In: **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2.ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. p.405-475.
- DOBZHANSKY, T.; AYALA, F.J.; STEBBINS, G.L.; VALENTINE, J.W. **Evolution**. San Francisco, California: W.H. Freeman and Company, 1977.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.** 19:11-15, 1987.

DUTECH, C.; ENJALBERT, J.; FOURNIER, E.; FRANÇOIS, D.; BARRES, B.; CARLIER, J.; THARREAU, D.; GIRAUD, T. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Science Direct. Fungal Genetics and Biology*, v.44, p.933-949, 2007.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin vers. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics Online* 1:47-50, 2005.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998.

FIORIN, F.G. **Estrutura cariotípica de duas espécies de *Hypochoeris* (*H. catharinensis* e *H. lutea*), asteraceae endêmicas do Sul do Brasil**. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina, 2008.

FORTES, A.B. **Geografia física do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Livraria do Globo, 1959.

GARCIA, A.A.F.; BENCHIMOL, L.L.; BARBOSA, A.M.M.; GERALDI, I.O.; SOUZA, J.R.C.L.; SOUZA, A.P. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genet. Mol. Biol.* v.27 no.4 p.579-588, 2004.

GIORDANO, M.; OEFNER, P.J.; UNDERHILL, P.A.; SFORZA, L.L.C.; TOSI, R., RICHIARDI, P.M. Identification by denaturing high-performance liquid chromatography of numerous polymorphisms in a candidate region for multiple sclerosis susceptibility. *Genomics*, 56:1069-1076, 1999.

GOUDET, J. FSTAT: a program to estimate and test diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>. Acesso: mar. 2011.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, v.39, p. 439-446, 1974.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W.L. (Ed.) **Genetic and conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, p. 335-348, 1983.

HAMRICK, J.L. Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P., (Ed.) **Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations**. New York: Chapman and Hall, p. 87-105, 1989.

HAMRICK, J. L. **Distribution of genetic diversity in tropical tree populations: Implications for the conservation of genetic resources**, p. 74-82, 1994.

HARRIMAN, N. A. *Leontodon* and *Hypochoeris* (Compositae) in Wisconsin. *Michigan Botany*, 19: 93-95, 1980.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. 4 ed. Sunderland: Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2007.

HOFMANN, O. *Hypochoeris* L. In: ENGLER, A.; PRANTL, K. (Eds.), **Die Natürlichen Pflanzenfamilien Nebst Ihren Gattungen Und Wichtigeren Arten, Insbesondere Den Nutzpflanzen**, IV. Teil, 5. Abteilung. Wilhelm Engelmann, Leipzig: p. 361–363, 1893.

HOFFMANN, O. Compositae. In: ENGLER, A.; PRANTL, E. (Eds.). Die natürlichen Pflanzenfamilien, **Hypochoeris**, vol.4 (5): 87-391. p.361-362, 1890.

HUANG, Q.Y.; XU, F.H.; SHEN, H.; DENG, H.Y.; LIU, Y.J.; LIU, Y.Z.; LI, J.L.; RECKER, R.R.; DENG, H.W. **Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans**. *Am. J. Hum Genet* 70:625-634, 2002.

KELLER, L.F.; WALLER, D.M. Inbreeding effects in wild populations **Trends in Ecology and Evolution**, 17 (5), p. 230-241, 2002.

KWOK, P.Y.; GU, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? **Molecular Medicine Today**, 12:538-543.

LACK, H. W. The subtribe Hypochoeridinae (Asteraceae, Lactuceae) in the tropics and the Southern Hemisphere. In: Larsen K, Holm-Nielsen LB, eds. **Tropical botany**. London: Academic Press. 265–276, 1979.

LI, J.Z.; SJAKSTE, T.G.; RÖDER, M.S.; GANAL, M.W. Development and genetic mapping of 127 new microsatellite markers in barley. **Theor. Appl. Genet.** 107:1021-1027, 2003.

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

LIU, Z.W.; BIYASHEV, R.M.; SAGHAI-MAROOF, M.A. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. **Theor. Appl. Genet.** 93:869-876, 1996.

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

LUCIO, C.C.F. **Estudos genéticos em populações da espécie *Hypochoeris chilensis* (Asteraceae) usando marcadores microssatélites**. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina, 2010.

LUIKART, G.E.; CORNUET, J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conserv Genet** 12:228-237, 1998.

MAO, C.; PAN, Y., WANG, J.; GONG, X. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Ligularia hodgsonii* Hook. (Asteraceae). **Conserv Genet** 10:1853–1855, 2009.

MARASCHIN-SILVA, F.; SCHERER, A.; BAPTISTA, L.R.M. Diversidade e estrutura do componente herbáceo-subarbuscivo em vegetação secundária de Floresta Atlântica no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências.**, 7:1, 2009.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUIK, L.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, 7, p. 639–655, 1998.

MIX, C.; ARENS, P.F.P.; OUBORG, N.J.; SMULDERS, M.J.M. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite markers in *Hypochoeris radicata* (Asteraceae). **Molecular ecology notes** 4: 656-658, 2004.

MIX, C.; ARENS, F.P.; RENGELINK, R.; SMULDERS, M.J.M.; VAN GROENENDAEL, J.M.; OUBORG, N.J. Regional gene flow and population structure of the wind-dispersed plant species *Hypochoeris radicata*(Asteraceae) in an agricultural landscape. **Molecular Ecology** 15: 1749-1758, 2006.

MOORE, M.J.; FRANCISCO-ORTEGA, J.; SANTOS-GUERRA, A.; JANSEN, R.K.; Chloroplast DNA evidence for the roles of island colonization and extinction in *Tolpis* (Asteraceae: Lactuceae). **Am. J. Bot.** 89: 518–526, 2002.

MUELLNER, A. N.; TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.; BAEZA, C. M. Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochoeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). **Molecular Ecology**, 14: 203–212, 2005.

MUGNIER, C.; SILJAK-YAKOVLEV, S. Karyological study in some Yugoslavian populations of *Hypochoeris* (Compositae). **Caryologia** 40: 319–325, 1987.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology** 55: 335-350, 1987.

NAKAGAWA, S.; ITO, M. Development and characterization of microsatellite loci in *Ixeridium dentatum* (Asteraceae, Lactuceae). **J Plant Res** 122: 581–584, 2009.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.70, n.12, p.3321-3323, 1973.

NEI, M.; CHAKRABORTY, R. Bottleneck Effects on Average Heterozygosity and Genetic Distance with the Stepwise Mutation Model. **Evolution** 31:2, p. 347-356, 1977

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89: 583-590, 1978.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987.

NOMURA, N.; FUJIWARA, K.; TAKASO, T.; ITO, M.; UEHARA, K.; SETOGUCHI, H. Development and characterisation of microsatellite loci in *Farfugium japonicum* (Asteraceae). **Conserv Genet** 10: 1093–1095, 2009.

OTA, T.E.; KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. **Genet Res** 22:201-204, 1973.

ORTIZ, M.A.; TREMETSBERGER, K.; TALAVERA, S.; STUESSY, T.F.; GARCIA-CASTANO, J.L. Population structure of *Hypochaeris salzmanniana* DC. (Asteraceae), an endemic species to the Atlantic coast on both sides of the Strait of Gibraltar, in relation to Quaternary sea level changes. **Molecular Ecology** 16:541–552, 2007.

ORTIZ, M.A.; TREMETSBERGER, K.; TERRAB, A.; STUESSY, T.F.; GARCÍA-CASTAÑO, J.L.; URTUBEY, E.; BAEZA, M.; RUAS, C.F.; GIBBS, P.E.; TALAVERA, S. Phylogeography of the invasive weed *Hypochaeris radicata* (Asteraceae): from Moroccan origin to world-wide introduced populations. **Molecular Ecology**, 17: 3654-3667, 2008.

PAGE, R.D.M.; HOLMES, E.C. **Molecular evolution: a phylogenetic approach**. Blackwell, 1998.

PILLEN, K.; BINDER, A.; KREUZKAM, B.; RAMSAY, L.; WAUGH, R.; FORSTER, J.; LEON, J. Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars. **Theor. Appl. Genet.** 101:652-660, 2000.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Bottleneck: a program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data. **Journal of Heredity** 90(4):502-503, 1999.

PYŠEK, P. **Compositae as invaders: better than the others**. *Preslia* 69: 9–22, 1997.

RAMSAY, J.O. Differential equation models for statistical functions. **Canadian Journal of Statistics**, 28:225–240, 2000.

RAYMOND, M.; E. F. ROUSSET. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity** 86: 248–249, 1995.

REIS, A.; KAGEYAMA, P.; REIS, M.S.dos.; FANTINI, A.C. Demografia de *Euterpe Edulis* Martius (Arecaceae) em uma Floresta Ombrófila Densa Montana, em Blumenau (SC). **Sellowia**, v.45-48, p.13-45, 1996.

RIESEBERG, L.H.; VAN FOSSEN, C.; DESROCHERS, A.M. Hybrid speciation accompanied by genomic reorganization in wild sunflowers. **Nature** 375: 313-316, 1995.

RIESEBERG, L.H. Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends Ecol. Evol.** 16: 351-358, 2001.

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na Genética de Populações de Plantas. In: ALFENAS, A.C. (Ed). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2.ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. p.329-380.

ROZEN, S.; SKALETZKY, H.J. PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: S. KRAWETZ S. MISENER [eds.] MISENER, S.; KRAWETZ, S.A (Eds). **Bioinformatics Methods and Protocols**. Totowa: Human Press, 2000.

RUAS, C.F.; RUAS, P.M.; MATZENBACHER, N. I.; ROSS, G.; BERNINI, C.; VANZELA, A.L.L. Cytogenetic studies of some *Hypochaeris* species (Compositae) from Brazil. **Amer J Bot** 82: 369-375, 1995.

RUAS, C.F.; VANZELA, A.L.L.; SANTOS, M.O.; FREGONEZI, J.N.; RUAS, P.M.; MATZENBACHER, N.I.; AGUIAR-PERECIN, M.L.R. Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. **Gen. Mol. Biology** 28:129-139, 2005.

RUAS, C.F.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; STUESSY, T.F.; SAMUEL, R.; PEDROSA-HARAND, A.; TREMETSBERGER, K.; RUAS, P.M.; SCHLÜTER, P.M.; ORTIZ, M.A.; KÖNIG, C.; MATZENBACHER, N.I. Characterization, genomic organization and chromosome distribution of Ty1-*copia* retrotransposons in species of *Hypochaeris* (Asteraceae). **Gene** 412: 39 – 49, 2008.

RUAS, C.F.; NAKAYAMA, T.J.; ORTIZ, M.A.; KUROKI, M.A.; STUESSY, T.F.; TREMETSBERGER, K.; RUAS, E.A.; SANTOS, M.D.; TALAVERA, S.; RUAS, PM. Isolation and characterization of eight microsatellite loci from the endangered plant species *Hypochaeris salzmanniana* (Asteraceae). **Conserv. Genet.** 10(5): 1413-1416, 2009.

RUAS, E.A.; CONSON, A.R.O.; COSTA, B.F.; DAMASCENO, J.O.; RODRIGUES, L.A.; RECK, M.; VIEIRA, A.O.S.; RUAS, P.M.; RUAS, C.F. Isolation and characterization of ten microsatellite loci for the tree species *Luehea divaricata* Mart. (Malvaceae) and intergeneric transferability. **Conservation Genet Resour** 1:245–248, 2009.

SAGHAI MAROOF, M.A.; BIYASHEV, R.M.; YANG, G.P.; ZHANG, Q.; ALLARD, R.W. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. **Proc Natl Acad Sci USA** 91:5466-5470, 1994.

SAMUEL, R.; STUESSY, T.F.; TREMETSBERGER, K.; BAEZA, C.M.; SILJAKYAKOVLEV, S. Phylogenetic relationships among species of *Hypochaeris*(Asteraceae, Lactuceae) based on ITS, plastid *trnL* intron, *trnL-F* spacer and *matK* sequences. **Am. J. Bot.** 90: 496-507, 2003.

SANG, T.D.J.; CRAWFORD, S.; KIM, S.; STUESSY, T.F. Radiation of the endemic genus *Dendroseris* (Asteraceae) on the Juan Fernandez Islands: evidence from sequences of the ITS regions of nuclear ribosomal DNA. **Am. J. Bot.** 81: 1494–1501, 1994.

SCHLÖTTERER, C. E.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids. Res** 20: 211-215, 1992.

SCHLÖTTERER, C.; RITTER, R.; HARR, B.; BREM, G. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific

mutation rates. **Molecular and Biology Evolution**, v.15, n.10, p.1269-1274, 1998.

SLATKIN, M. Gene flow and population structure. In: REAL, L.A. (Ed). **Ecological Genetics**. Princeton University Press, 1994.

SPRUYT, M.; BUQUICCHIO, F. **Gene Runner Version 3.05**, 1994.

STEBBINS, G.L. **Chromosomal evolution in higher plants**. California: Addison-Wesley publishing Company, 1971.

STRUSS, P.; PLIESKE, J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. **Theor. Appl. Genet.** 97:308-315, 1998.

STUESSY, T. F.; TAYLOR, C. Evolución de la flora chilena. In: MARTICORENA, C.; RODRÍGUEZ, R. (eds.). **Flora de Chile**. vol. 1. 1995. pp. 85-118.

STUESSY, T.F.; TREMETSBERGER, K.; MULLNER, A.N.; JANKOWICZ, J.; GUO, Y-P.; BAEZA, C.M.; SAMUEL, R.M. The melding of systematics and biogeography through investigations at the populational level: examples from the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). **Basic. Appl. Ecol.** 4:287–296, 2003.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res** 17:6463-6471, 1989.

TAUTZ, D.; SCHLÖTTERER, C. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.4, p.832-837, 1994.

TELLES, M.P.C.; DINIZ-FILHO, J.A.F.; COELHO, A.S.; CHAVES, L.J. Autocorrelação espacial das frequências alélicas em subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC Mytaceae) no Sudeste de Goiás. **Revista Brasileira de Botânica**. 24:2, 145-154, 2001.

TERRAB, A.; ORTIZ, M.A.; TALAVERA, M.; ARIZA, M.J.; MORIANA, M.C.; GARRCÍA-CATAÑO, J.L.; TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.F.; BAEZA, M.; URTUBEY, E.; RUAS, C.F.; CASIMIRO-SORINGUER, R.; BALAO, F.; GIBBS, P.E.; TALAVERA, S. AFLP and breeding system studies indicate vicariance origin for scattered populations and enigmatic low fecundity in the Moroccan endemic *Hypochoeris angustifolia* (Asteraceae), sister taxon to all of the South American *Hypochoeris* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 53:13-22, 2009.

THIEL, T.; MICHALEK, W.; VARSHNEY, R.K.; GRANER, A. Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Theor. Appl. Genet.** 106:411-422, 2003.

TORRES, C.; GALETTO, L. Importancia de los polinizadores en la reproducción de asteraceae de argentina central. **Acta Bot. Venez.**, 31:2, p. 473-494, 2008.

TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.F.; GUO, Y.P.; BAEZA, C.M.; WEISS, H.; SAMUEL, R.M. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochoeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. **Taxon** 52: 237–245, 2003a.

TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.F.; SAMUEL, R.M.; BAEZA, C.M.; FAY, M.F. Genetics of colonization in *Hypochaeris tenuifolia* (Asteraceae, Lactuceae) on Volcán Lonquimay, Chile. **Molecular Ecology** 12: 2649–2659, 2003b.

TREMETSBERGER, K.; TALAVERA, S.; STUESSY, T.F.; ORTIZ, M.A.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; KADLEC, G. Relationship of *Hypochaeris salzmanniana* (Asteraceae, Lactuceae), an endangered species of the Iberian Peninsula, to *H. radicata* and *H. glabra* and biogeographical implications. **Botanical Journal of the Linnean Society** 146: 79–95, 2004.

TREMETSBERGER, K.; WEISS-SCHNEEWEISS, H.; STUESSY, T.F.; SAMUEL, R.; KADLEC, G.; ORTIZ, M.Á.; TALAVERA, S. Nuclear ribosomal DNA and karyotypes indicate a NW African origin of South American *Hypochaeris* (Asteraceae, Cichorieae). **Mol. Phyl. Evol.** 35: 102-116, 2005.

TREMETSBERGER, K.; STUESSY, T.F.; KADLEC, G.; URTUBEY, E.; BAEZA, C.M.; BECK, S.G.; VALDEBENITO, H.A.; RUAS, C.F.; MATZENBACHER, N.I. AFLP Phylogeny of South American Species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). **Syst. Bot.** 3: 610-626, 2006.

VARSHNEY, R.K.; GROSSE, I.; HAHNEL, U.; SIEFKEN, R.; PRASAD, M.; STEIN, N.; LANGRIDGE, P.; ALTSCHMIED, L.; GRANER, A. Genetic mapping and BAC assignment of EST-derived SSR markers proves non-uniform distribution of genes in the barley genome. **Theor. Appl. Genet.** 113: 239-250, 2006.

VENCOVSKY, R. Análise de variância de frequências alélicas. **Brazilian Journal of Genetics**, v.15, p.53-60, 1992.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**. 23:21, 4.407-4.414, 1995.

WARE, D.; JAISWAL, P.; NI, J.; PAN, X.; CHANG, K.; CLARK, K.; TEYTELMAN, L.; SCHMIDT, S.; ZHAO, W.; CARTINHOUR, S.; MCCOUCH AND S.; STEIN, L. Gramene: a resource for comparative grass genomics. **Nucleic Acids Resources**, v. 30, p. 103–105, 2002.

WEBER, J.L.E.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am J Hum Genet** 44:388-396, 1989.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.

WEIR, B.S. **Genetic Data Analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, 445p, 1996.

WEISS, H.; STUESSY, T.F.; GRAU, J.; BAEZA, C.M. Chromosome reports from South American *Hypochaeris* (Asteraceae). **Ann. Missouri. Bot. Gard.** 90:53-63, 2003.

- WEISS-SCHNEEWEISS, H.; STUESSY, T.F.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BAEZA, C.M.; PARKER, J. Karyotype evolution in South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). **Plant Syst. Evol.** 241: 171-184, 2003.
- WEISS-SCHNEEWEISS, H.; STUESSY, T.F.; TREMETSBERGER, K.; URTUBEY, E.; VALDEBENITO, H.A.; BECK, S.G.; BAEZA, C.M. Chromosome numbers and karyotypes of South American species and populations of *Hypochaeris* (Asteraceae). **Bot. J. Linn. Soc.** 153:49-60, 2007.
- WEISS-SCHNEEWEISS, H.; TREMETSBERGER, K.; SCHNEEWEISS, G.M.; PARKER, J.S.; STUESSY, T.F. Karyotype Diversifications and Evolution in Diploid and Polyploid South American *Hypochaeris* (Asteraceae) Inferred from rDNA Localization and Genetic Fingerprint Data. **Ann. Botany.** 101: 909-918, 2008.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WILSON, G.A.; RANNALA, B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. **Genetics** 163:1177-1191, 2003.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v.16, p.97-159, 1931.
- WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, p.395-420, 1965.
- WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations: Variability within and among Natural Populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. v.4.
- YEH, F.C.; BOYLE, T.; RONGCAI, Y.; YE, Z.; XIZYAN, J.M. **Popgene 1.31, a software for the analysis of genetic variation among and within populations using co-dominant and dominant markers**, 1997.
- ZABEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application** N° 0534858 A1, 1993
- ZHIVOTOVSKY, L.A. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. **Molecular Ecology** 8:907-913, 1999.

ANEXOS

ANEXO A

Construção de bibliotecas enriquecidas com microssatélites para *Hypochoeris chillensis*

A - EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico de um indivíduo de *H. chillensis* foi extraído de acordo com o protocolo CTAB (DOYLE e DOYLE, 1987) com algumas modificações. O teste de integridade foi feito através de eletroforese (100 V) por 45 minutos, corado com brometo de etídeo (10 µg/mL) em gel de agarose a 1%. A concentração final da amostra foi determinada por quantificação em fluorímetro (DyNA Quant 200, Höfer-Pharmacia).

B - RESTRIÇÃO DO DNA

Foram digeridos 5 µg de DNA genômico total através de hidrólise enzimática para a geração de fragmentos de tamanhos adequados, em uma reação de 10 µL de tampão de reação 10X, 5 µL da enzima de restrição *RsaI* (10 u/mL), 10 µL de espermidina 40 mM e água Mili-Q para completar um total de 100 µL. O material foi incubado a 37 °C *overnight*.

C - LIGAÇÃO DOS ADAPTADORES

Os fragmentos obtidos foram ligados a adaptadores específicos através da enzima T4 DNA ligase. Os adaptadores *Rsa21* (5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3') e *Rsa25* (5' TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA 3') se ligaram aos fragmentos digeridos de extremidade abrupta, para garantir que todos os fragmentos digeridos tivessem uma terminação comum e conhecida, o que possibilitou a pré-seleção de sequências. Foram utilizados 2 µL do adaptador *Rsa-21* (10 µM), 2 µL do adaptador *Rsa-25* (10 µM), 6 µL do DNA genômico digerido no

passo anterior, 5 μ L do tampão 10X, 4 μ L de T4 DNA ligase (1 u/ μ L) e água Mili-Q para completar o volume final de 50 μ L. A reação foi incubada a 20 °C por 2 horas.

D - PRÉ-AMPLIFICAÇÃO VIA PCR

Para gerar uma maior quantidade de DNA e garantir que a ligação tenha ocorrido, os fragmentos foram submetidos a uma reação de PCR utilizando como *primer* o adaptador *Rsa*-21. A reação, contendo 5 μ L do produto da ligação, 2 μ L do *primer Rsa21* (10 mM), 25 μ L de *Go Taq[®] qPCR Master Mix* (Promega) e água Mili-Q para completar 50 μ L, foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 4 minutos, seguida de 20 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, e então um passo de extensão a 72 °C por 8 minutos. Em seguida, utilizou-se o kit *PureLink PCR Purification Kit* (Invitrogen) para purificação dos produtos de pré-amplificação para seleção de fragmentos com tamanhos de 300 a 600 pb.

E - SELEÇÃO DE FRAGMENTOS CONTENDO MICROSSATÉLITES

O processo de enriquecimento foi realizado através da hibridização de oligonucleotídeos conjugados à biotinas, biotinaI(CT)₈ e biotinaI(GT)₈, complementares às sequências repetitivas GA e CA. O kit *Dynabeads[®] M-280 Streptavidin* (Invitrogen), composto por uma coluna imantada e por um tubo contendo esferas magnéticas ligadas à estreptavidina, foi utilizado para recuperar os fragmentos biotinizados contendo tais repetições.

Como as esferas magnéticas marcadas com estreptavidina precisam de uma preparação prévia, o produto do tubo foi homogeneizado usando o vórtex e em seguida foi feita a magnetização do mesmo na coluna imantada durante 30

segundos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 300 μL de SSC 0,5X para lavar as microesferas, sendo este procedimento repetido três vezes. Ao final da lavagem, adicionou-se 100 μL de SSC 0,5X.

Para o preparo do DNA, adicionou-se 400 μL de água Mili-Q aos 100 μL de DNA purificado. Esta solução foi incubada a 95 °C por 15 minutos para a desnaturação da fita dupla. Ao DNA desnaturado foram adicionados 13 μL de SSC 20X e 3 μL de cada oligonucleotídeo marcado com as biotinas (50 μM). Esta solução de hibridização foi incubada à temperatura ambiente sob constante agitação e após 20 minutos foi adicionada às esferas magnetizadas previamente lavadas. A suspensão contendo as esferas magnetizadas e o complexo DNA-sonda foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente sob suave agitação. Após a incubação, a solução foi magnetizada por 30 segundos, descartando-se o sobrenadante e, em seguida, ressuspensão a solução em 300 μL de SSC 0,1X. Esta última etapa foi repetida três vezes.

Em seguida, a solução foi ressuspensão em 100 μL de água Mili-Q e magnetizada por 30 segundos, sendo o sobrenadante transferido para um microtubo e reservado. A solução foi novamente ressuspensão e magnetizada com 150 μL de água, o sobrenadante foi retirado e misturado à solução reservada anteriormente. O volume final (250 μL) foi conservado a -20 °C.

F - AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS SELECIONADOS VIA PCR

Após a seleção dos fragmentos enriquecidos, estes foram submetidos a uma PCR utilizando como *primer* o adaptador *Rsa21*, para geração de uma grande quantidade de fragmentos. A reação de amplificação consistiu de 20 μL do produto selecionado, 4 μL do *primer Rsa21* (10 μM), 50 μL de *Go Taq[®] qPCR Master Mix*

(Promega) e água Mili-Q para completar 100 μL . Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 94 $^{\circ}\text{C}$ por 40 segundos, 60 $^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto e 72 $^{\circ}\text{C}$ por 2 minutos, e então um último passo de 72 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos para extensão.

G - CLONAGEM

Após a amplificação, 1,5 μL do produto da PCR foram adicionados a 1 μL do vetor plasmidial *pGEM[®]-T Easy* (Promega), 5 μL de tampão 2X, 1 μL de T4 DNA ligase e 1,5 μL de água Mili-Q. A reação foi incubada *overnight* a 4 $^{\circ}\text{C}$ em banho-maria. Assim, os fragmentos amplificados via PCR foram ligados a um vetor de clonagem para a transformação de células *XL1-Blue* competentes via choque térmico.

H - TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS COMPETENTES

O protocolo de transformação foi realizado de acordo com Avi Levy (1991), com algumas modificações. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 mg/mL), 60 μL de IPTG (24 mg/mL) e 60 μL de X-Gal (20 mg/mL). As placas foram incubadas invertidas em estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ *overnight* para o crescimento das colônias.

I - MANUTENÇÃO E SELEÇÃO DOS CLONES

As colônias brancas, que contém os insertos de DNA de *H. chillensis* foram replicadas com a ajuda de palitos estéreis, e as placas, já seladas com adesivo perfurado para aeração, foram incubadas em estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ *overnight* para o crescimento das colônias. Após esse período, as placas foram armazenadas em freezer -20 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos e, em seguida, armazenadas em freezer -80 $^{\circ}\text{C}$.

Para garantir que cada construção (vetor + fragmento) fosse mantida em condições apropriadas para análise posterior, foram utilizadas placas ELISA com fundo em U com 200 μL de meio 2YT-HMFM contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por poço.

J - INOCULAÇÃO E EXTRAÇÃO PLASMIDIAL

Com o objetivo de isolar o DNA plasmidial das colônias recombinantes para posterior sequenciamento, foram repassados 5 μL do material de cada pocinho para microtubos de 2 mL contendo 1,5 mL de meio *Circle Grow* com 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ampicilina e depois incubados a 37 °C (*shaker*) a 300 rpm durante cerca de 18 horas. Após esse tempo, a extração plasmidial foi realizada com o kit *Purelink™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen).

K - AMPLIFICAÇÃO DOS INSERTOS CLONADOS

Para identificar os clones contendo os insertos e verificar a eficiência do procedimento de enriquecimento e clonagem, foi realizada uma amplificação dos insertos diretamente das colônias obtidas na etapa anterior. Para isso, 2 μL do DNA clone foram transferidos para o tubo de PCR contendo 18,5 μL de água Mili-Q, 25 μL de *Go Taq® qPCR Master Mix* e 2,5 μL do *primer Rsa21* (10 mM). Esta reação foi submetida a um passo inicial de desnaturação a 95 °C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos (94 °C por 30 segundos, 52 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto e 30 segundos) e um passo final de extensão a 72 °C por 8 minutos.

L - SELEÇÃO DOS INSERTOS E SEQUENCIAMENTO

Para a verificação da presença do inserto foi feita a amplificação dos insertos nos plasmídeos utilizando-se um par de *primers* M13. As reações de sequenciamento foram realizadas em um volume final de 10 µL contendo 1,5 µL de tampão *Save Money* (2,5 µL de MgCl₂ 2 M, 200 µL de Tris-HCl 1 M pH 9,0), 0,3 µL do *primer* M13 (10 pMol/µL), 0,5 µL de *Big Dye* (vs. 3.1) e 7 µL de DNA plasmidial.

Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos (95 °C por 30 segundos, 55 °C por 15 segundos, 60 °C por 4 minutos) e um passo final a 4 °C até a reação ser retirada do termociclador.

Para eliminar possíveis interferentes ou excessos de reagentes da reação de sequenciamento e deixar as amostras prontas para a eletroforese, as amostras foram purificadas, sendo adicionados às mesmas 80 µL de isopropanol a 80 % e agitadas no vórtex por 10 segundos. Após 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a placa foi centrifugada a 4000 rpm por 40 minutos, descartando o sobrenadante e, em seguida, mantendo-a invertida por 1 minuto em papel absorvente para secar. Foram adicionados 100 µL de etanol a 70%, centrifugando a placa a 4000 rpm por 40 minutos, novamente descartando o sobrenadante e mantendo-a invertida por 1 minuto em papel absorvente. A placa invertida foi levada à centrífuga sobre o papel toalha para um *spin* e, em seguida ao termociclador, onde permaneceu por 30 segundos a 95 °C para secar. Os insertos clonados foram sequenciados utilizando o sistema do sequenciador automático, modelo ABI 3130XL (*Life Technologies* Brasil, Com. Ind Prod. Bio Ltda).

M - ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS E DESENHOS DOS PRIMERS

Os arquivos contendo os cromatogramas, provenientes do sequenciamento, foram primeiramente convertidos em extensão FASTA através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* v. 5.0.9. Após a conversão, cada arquivo contendo as sequências foi submetido ao programa *Gramene* (<http://www.gramene.org>) (WARE *et al.*, 2002) para a identificação dos microssatélites. Os parâmetros para número de repetições por motivo foram de no mínimo quatro repetições de dinucleotídeos, e três repetições para trinucleotídeos, sendo selecionados motivos de no máximo seis nucleotídeos. Após a identificação dos microssatélites, as sequências foram submetidas ao programa *Primer3 Input* (<http://frodo.wi.mit.edu>) (ROZEN e SKALETSKY, 2000) para o desenho dos *primers*. A verificação da viabilidade dos *primers* foi feita *in silico* pelo programa *Gene Runner V 3.05* (SPRUYT e BUQUICCHIO 1994).

N - OTIMIZAÇÃO DOS PRIMERS OBTIDOS

A reação para a amplificação com *primers* obtidos foi otimizada com o uso de 3,5 µL (tampão 2x, pH 8,5, 1600µM dNTP e MgCl 3mM) GoTaq Green Master Mix (Promega), 0,25µL de cada *primer*, 1,5 µL de DNA diluído a uma concentração de 0,5 ng/µL e água pura, ajustando o volume para 10 µL de reação. As reações de PCR foram feitas em termociclador PTC200 (MJ Research), usando o programa touch down, sendo iniciado com um ciclo de 94°C por 4 minutos para a desnaturação inicial, seguido por 16 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, com um decréscimo de 1° C por ciclo de anelamento até a temperatura de 50°C, depois 72°C por 30 segundos, seguido de 20 ciclos adicionais de 94° C por 30 segundos, 50° C por 30 segundos, 72° C por 30 segundos, e uma extensão

final de 7 minutos à 72°C, conforme protocolo estabelecido por Ruas *et al.* (2009). Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de acrilamida:bis-acrilamidada (29:1) a 7%, durante 3 horas a 200V e corados com nitrato de prata 20%. O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com marcador de peso molecular padrão de 50 pb (Ludwig Biotecnologia). Fragmentos amplificados de diferentes tamanhos foram considerados alelos diferentes.