



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUANA ALVES RODRIGUES

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Hypochaeris*  
*lutea* (ASTERACEAE)**

---

Londrina  
2010

LUANA ALVES RODRIGUES

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Hypochoeris*  
*lutea* (ASTERACEAE)**

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: Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas

Londrina  
2010

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

R696e Rodrigues, Luana Alves.  
Estrutura genética de populações de *Hypochoeris lutea* (Asteraceae) /  
Luana Alves Rodrigues. – Londrina, 2010.  
64 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, 2010.  
Inclui bibliografia.

1. Genética de populações – Teses. 2. Genética molecular – Teses.  
3. *Hypochoeris lutea* – Teses. 4. Polimorfismo (Genética) – 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. Título.

CDU 575.173

LUANA ALVES RODRIGUES

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *Hypochoeris lutea*  
(ASTERACEAE)**

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.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra Claudete de Fátima Ruas  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Danielle Cristina Gregório da Silva  
UENP – Jacarezinho - PR

---

Dro Eduardo Augusto Ruas  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2010.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação a todos que de alguma forma contribuíram na confecção deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A Deus, pela força concedida usada na superação dos obstáculos que foram sendo ultrapassados pouco a pouco na busca da finalização deste trabalho.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico, pelo apoio financeiro.

À UEL – Universidade Estadual de Londrina, pela estrutura e oportunidades.

À professora Claudete e ao professor Paulo, pela orientação e dedicação na confecção deste trabalho e pela paciência e amizade.

À Suely, secretária do programa, pela competência, paciência e amizade.

À funcionária Edna, pelos serviços prestados e pela amizade.

Aos meus pais, pela paciência, carinho e amor, por terem feito dos meus sonhos os seus sonhos e da minha luta a sua vida.

Aos meus irmãos Hyanna, Dayana e Mateus pelo companheirismo e compreensão, tendo paciência comigo nos meus momentos de mau humor e sempre me estimulando ir à busca dos meus objetivos.

Aos tios Osmar e Ivone e primos, pela hospitalidade e carinho, por terem feito desta minha estadia em Londrina mais agradável e por terem me feito sentir da família.

Aos meus familiares, pelo respeito e compreensão das minhas decisões.

Aos meus amigos Carina, Leonardo, André, Bruno, Juliana, Thiago, Eduardo e Laís, pelo respeito, pelos bons momentos vividos nestes três anos, pelas brincadeiras, pelo trabalho em grupo e por nossas superações.

Ao Eduardo pelo auxílio na estatística e pelas discussões calorosas sobre evolução.

À amiga Maikel em especial, pelo carinho, amizade, auxílio em momentos difíceis, e hospitalidade que sempre me ofereceu.

Às amigas Jamille e Mariana pelas histórias engraçadas, pelo companheirismo, conselhos e pela amizade.

Aos professores e Coordenação do programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela dedicação, atenção e respeito.

Muito obrigada!

RODRIGUES, Luana Alves. **Estrutura genética de populações de *Hypochoeris lutea* (Asteraceae)**: 2008-2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

*Hypochoeris lutea* (Vell.) Britton é uma espécie endêmica na América do Sul, de ocorrência frequente em regiões frias e úmidas no sul e sudeste do Brasil, assim como no Uruguai, Paraguai e Argentina. Neste trabalho 270 indivíduos de 11 populações de *H. lutea*, distribuídas nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, foram estudadas usando marcadores de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), a fim de elucidar a estrutura genética de populações desta espécie. A partir de seis combinações de *primers* seletivos AFLP foram obtidos 193 marcadores que foram utilizados para estimar a distância genética de Nei. As relações genéticas entre e dentro de populações foram calculadas a partir da Análise da Coordenada Principal e da Análise de Variância Molecular (AMOVA). A frequência de locos polimórficos e a diversidade gênica dentro de populações foram altas, variando de 83,42% a 91,66% e de 0,2588 a 0,3442, respectivamente. O teste de Mantel não revelou correlação positiva entre as distâncias genética e geográfica. A análise da coordenada principal mostrou pouca estruturação genética, havendo mistura de indivíduos de todas as populações, conforme sugerido pela ausência de fragmentos privados. A AMOVA utilizada para o cálculo de  $F_{ST}$  revelou uma maior variabilidade dentro 80,66% de populações do que entre 19,34% populações, provavelmente devido a uma dispersão a longa distância muito comum na família Asteraceae em um sistema de alogamia. A pouca estruturação genética observada em *H. lutea* é consistente com um processo de radiação rápida e recente que tem sido proposto para explicar a origem das espécies sul-americanas de *Hypochoeris*.

**Palavras-chave:** Genética de populações. AFLP. Variabilidade genética. Herbácea.

RODRIGUES, Luana Alves. **Genetic structure of *Hypochoeris lutea* populations (Asteraceae)**: 2008-2010. 64 f. Dissertação (Master's degree in Genetics and e Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

### ABSTRACT

*Hypochoeris lutea* (Vell.) Britton, Asteraceae is an endemic species from South American, growing in cold and wet lands in the southern and southeastern of Brazil, as well as in Uruguay, Paraguay and Argentina. In the present study, 270 individuals representing 11 populations of *H. lutea*, distributed in the states of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul, were studied using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) markers, aiming to elucidate the population genetic structure of this species. Six AFLP primer combinations rendered 193 markers that were used to estimate the Nei's genetic distance. The relationships within and among populations were estimated by AMOVA (Analysis of Molecular Variance) and Principal Coordinate Analysis (PCoA). The frequency of polymorphic *loci* and the gene diversity were high, varying from 83,42% to 91,66% and from 0,2588 to 0,3442, respectively. As showed by the Mantel test there was no positive correlation between genetic and geographic distances. The PCA revealed that individuals of all populations are mixed, as suggested by absence of private alleles. AMOVA used to estimate  $F_{ST}$  indicated that most of the genetic variability was found within 80,66% than among 19,34% populations, possibly because a process of long distance dispersion, a common phenomenon in plants of the Asteraceae family with a system of allogamy. The pattern of genetic structure observed in *H. lutea* is consistent with a process of rapid and recent radiation that has been proposed to explain the origin of the South American species of *Hypochoeris*.

**Keywords:** Population genetics. AFLP. Genetic Variability. Herbaceous.

## LISTA DE TABELAS

### Artigo

- Tabela 1** – Origem geográfica de 11 populações de *H. lutea* na região sul do Brasil com respectivos coletores, números de coleta e coleção, (N) – número de indivíduos coletados ..... 30
- Tabela 2** – Comparação dos índices de diversidade dentro de cada população de *H. lutea* coletada na região Sul do Brasil, obtidos com marcadores AFLP. Pp - Porcentagem de locos polimórficos, (HS) - diversidade gênica de Nei (1973) ..... 35
- Tabela 3** – Distância genética de Nei (1978) abaixo da diagonal e distância geográfica (km) acima da diagonal em 11 populações de *H. lutea*..... 37
- Tabela 4** – Análise de variância para dados moleculares (AMOVA) em 11 populações de *H. lutea* a partir de marcadores AFLP..... 38

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ambiente de ocorrência de *Hypochaeris lutea*, Campina Grande do Sul, PR (A), corola de *H. lutea* (B), indivíduo em casa de vegetação de *H. lutea* (C), indivíduo com variação de cor da corola de *H. lutea* (D)..... 15

### Artigo

- Figura 1** – Áreas de coleta de 11 populações amostradas de *H. lutea* situadas nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil..... 31
- Figura 2** – Padrão de marcadores amplificados por AFLP em alguns indivíduos de *H. lutea* com a combinação de primers *EcoRI-AGC/MseI-CAG*, 1-20 - indivíduos da população SM – Saída do Pico Montenegro, M – marcador de peso molecular de 50pb..... 34
- Figura 3** – Coeficiente de variação aplicados em 193 marcadores moleculares AFLP em 11 populações de *H. lutea*..... 35
- Figura 4** – Análise da coordenada principal obtida a partir da matriz de distância genética de Nei entre 270 indivíduos de *H. lutea* provenientes da região sul do Brasil..... 40

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1	O GÊNERO <i>HYPOCHAERIS</i> .....	13
2.2	<i>HYPOCHAERIS LUTEA</i> .....	15
2.3	FATORES QUE ATUAM NA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES.....	16
2.3.1	Análise sobre a Estrutura Genética de Populações .....	19
2.4	MARCADORES MOLECULARES PARA ESTIMATIVA DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES.....	20
2.4.1	Marcadores AFLP .....	22
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	24
<b>4</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	25
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>5</b>	<b>ARTIGO: ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE <i>HYPOCHAERIS LUTEA</i> (ASTERACEAE)</b> .....	26
	Abstract.....	27
	Introdução.....	27
	Material e Métodos.....	29
	Resultados e Discussão.....	33
	Conclusão .....	44
	Agradecimentos .....	44
	Referências .....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	51
	<b>ANEXOS</b> .....	62
	ANEXO A – Gel de Poliacrilamida .....	63
	ANEXO B – Coloração com Nitrato de prata .....	64

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Hypochaeris* L. (Asteraceae) compreende um grupo de espécies herbáceas cosmopolitas, com maior ocorrência nas regiões subtropicais e temperadas (Barroso 1991). *Hypochaeris* apresenta dois centros distintos de distribuição, a região mediterrânea, com cerca de 15 espécies (DeFillips 1976; Oberprieler 2002) e cerca de 50 espécies na América do Sul (Bortiri 1999). Estudos realizados com sequências de DNA (Tremetsberger et al. 2005, 2006) têm mostrado que *Hypochaeris angustifolia*, (Litard. & Maire) uma espécie endêmica do Marrocos, é co-irmã do grupo sul-americano de *Hypochaeris*, sugerindo que um centro secundário de diversidade tenha surgido no Novo Mundo após dispersão a longa distância, a partir de um ancestral hipotético oriundo do noroeste da África (Tremetsberger et al. 2005).

Estudos filogenéticos realizados a partir de marcadores de DNA sugerem que o gênero *Hypochaeris* tem passado por processos de especiação de forma rápida e recente na América do Sul. A partir de um ancestral hipotético, que pode ter surgido há cerca de 3,5 milhões de anos durante o Plioceno ou Pleistoceno, a espécie ancestral evoluiu rapidamente, entre 0,25 a um milhão de anos no Pleistoceno (Samuel et al. 2003; Tremetsberger et al. 2005). Radiações rápidas e entre continentes, tais como observado em *Hypochaeris* na América do Sul e na região Mediterrânea, representam importantes fenômenos evolutivos, que muitas vezes derivam de um único evento de colonização seguido de radiação adaptativa. Embora poucos exemplos sejam conhecidos em continentes, tais mecanismos são comumente encontrados em espécies de plantas que evoluem de grupos em ilhas ou em cenários como se fossem ilhas, como observado em plantas do complexo Macaronesian, que inclui espécies das ilhas do Açores, Salvage, ilhas Canárias, Madeira e Cabo Verde (Kim et al. 2008).

*Hypochaeris lutea* (Vell.) Britton, pertencente ao grupo sul-americano é uma espécie que ocorre preferencialmente no sul do Brasil, com alguns relatos de ocorrência na Argentina, Paraguai e Uruguai (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007). Devido às semelhanças em características morfológicas e ecológicas entre *H. lutea* e a espécie co-irmã, *H. angustifolia*, suposta ancestral do grupo sul-americano (Tremetsberger et al. 2005), existe grande interesse em estudos genéticos com esta espécie.

Os estudos genéticos são importantes por fornecerem subsídios para estudos evolutivos. O conhecimento de uma determinada estrutura de população de plantas oferece uma perspectiva histórica sobre as mudanças evolutivas que caracterizam uma espécie e

permite aos investigadores preverem com mais precisão como essas populações vão reagir a futuros eventos de origem natural e artificial (Ridley 2006). Embora estudos citogenéticos detalhados já tenham sido realizados em *H. lutea* (Ruas et al. 2005), nenhum trabalho envolvendo técnicas moleculares foi feito até o momento para entender a estrutura genética das populações desta espécie.

Os marcadores genéticos são a principal ferramenta para descrever os padrões da variabilidade genética de uma população natural e, com o seu uso, é possível avaliar como esta variabilidade encontra-se distribuída dentro e entre as populações (Sebbenn 2001; Telles et al. 2003). Dentre as técnicas de marcadores moleculares, o AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*) destaca-se pelo grande número de marcadores gerados por ensaio, grande poder de detecção de variabilidade genética e maior repetibilidade (Vos et al. 1995). Os AFLPs são marcadores dominantes, isto é, não permitem a identificação de heterozigotos, sendo portanto, pouco informativos por loco. Entretanto, estudos de simulação mostram que o grande número de marcadores que podem ser obtidos em um ensaio com AFLP, compensa o baixo conteúdo de informação genética por loco (Mariette et al. 2002).

Marcadores AFLP estão sendo frequentemente utilizados nos estudos de diversidade genética no gênero *Hypochoeris*, tanto nos grupos do Velho Mundo quanto no grupo sul-americano (Tremetsberger et al. 2003a, 2003b, 2004; Ortiz et al. 2007; Terrab et al. 2009). Os resultados destes estudos sugerem que o uso destes marcadores é adequado para a determinação da estrutura genética das populações do gênero *Hypochoeris*.

Neste trabalho utilizamos o método de AFLP com o objetivo de investigar a estrutura genética de 11 populações de *H. lutea*, distribuídas nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e também fornecer informações relevantes que auxiliem nos estudos de biogeografia do gênero *Hypochoeris*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O GÊNERO *HYPOCHAERIS*

O gênero *Hypochaeris* pertence à subfamília Cichorioideae K. Tam., tribo Lactuceae Cass. da subtribo Hypochaerinidinae Less., sendo a única tribo da família Asteraceae, que se caracteriza por apresentar plantas com látex (Bremer 1994). As espécies de *Hypochaeris* ocorrem particularmente em regiões subtropicais e temperadas (Barroso 1991), podendo ser encontradas em diferentes ecossistemas tais como: campos, ambientes savânicos e florestas abertas (Cabrera 1929; Matzenbacher 1985; Garcia et al. 2000). *Hypochaeris* possui mais de 15 espécies ocorrendo na Europa, Ásia e nordeste da África (DeFillips 1976; Oberprieler 2002) e cerca de 50 espécies na América do Sul (Bortiri 1999). Considerando o número e morfologia cromossômica Stebbins (1971) propôs que o gênero *Hypochaeris* possui dois centros de diversidade, a Região Mediterrânea como centro primário e a América do Sul, como centro secundário.

Hoffman (1891) com base em características morfológicas subdividiu as espécies da região Mediterrânea em cinco seções (*Achyrophorus*, *Euhypochaeris* Benth, *Metabasis* D.C., *Seriola* L. e *Robertia* D.C.), onde são encontrados todos os números básicos de cromossomos ( $x = 3, 4, 5$  e eventualmente 6) descritos para o gênero. Estes números básicos estão associados com cariótipos simétricos que se assemelham aos das espécies de *Leontodon*, gênero próximo de *Hypochaeris*. Em contraste, as espécies sul-americanas apresentam cariótipos altamente assimétricos e bimodais associados a um único número básico de  $x = 4$  (Stebbins 1971; Cerbah et al. 1995, 1998b; Ruas et al. 1995, 2005).

Samuel et al. (2003) constataram que o gênero na América do Sul, apesar do grande número de espécies, apresenta uma evolução rápida e recente, consequência provavelmente, da diversidade de habitats disponíveis na América do Sul para sua ocupação. Cerbah et al. (1998a) confirmam que informações sobre número, morfologia de cromossomos e dados sobre distribuição de sítios de DNA ribossômico, tanto em espécies da região mediterrânea quanto em espécies sul-americanas, reforçam a hipótese de que a América do Sul é o centro secundário de diversificação do gênero.

Tem sido proposto que após chegada de um ancestral hipotético do gênero *Hypochaeris* à América do Sul, este colonizou uma ampla variedade de ambientes exceto

áreas extremamente áridas, florestas tropicais e costas de desertos, o que reflete um padrão característico de radiação adaptativa (Cabrera e Willink 1980). Radiações rápidas e entre continentes, tais como as observadas em *Hypochoeris* na América do Sul representam um importante fenômeno evolutivo (Tremetsberger et al. 2005), pois constituem uma forma de radiação adaptativa ainda pouco exemplificada. Processos de radiação adaptativa em plantas são mais comumente visto em modelos de evolução de grupos em ilhas, ou em cenários similares. Em *Hypochoeris*, a forma de radiação rápida combinada com as características cariotípicas (pequeno número cromossômico, cariótipo bimodal e cromossomos relativamente grandes) pode fornecer informações importantes sobre os modos de especiação e os padrões de biogeografia, permitindo inferir a importância dos rearranjos cromossômicos nos processos de especiação do grupo sul-americano de espécies (Stebbins 1971; Cerbah et al. 1995, 1998b; Ruas et al. 1995, 2005; Weiss et al. 2003, Weiss-Schneeweiss et al. 2007, 2008).

As espécies da América do Sul possuem grande diversidade morfológica, ocupando habitats distintos que vão desde o nível do mar até alturas superiores a 5000m, refletindo um padrão característico de radiação adaptativa. Supõe-se que o gênero surgiu na América do Sul a cerca de 0,25 a 3,5 milhões de anos atrás durante o Plioceno ou Pleistoceno tendo evoluído rapidamente, entre 0,25 a um milhão de anos no Pleistoceno (Tremetsberger et al. 2005). Apenas recentemente (Tremetsberger et al. 2005) demonstrou-se que o grupo sul-americano de *Hypochoeris* não é um membro da seção *Achyrophorus*, como sugerido previamente por Hoffmann et al. (1893). Análise de sequências de DNA nuclear ribossomal e com marcadores moleculares AFLP mostraram que a espécie *H. angustifolia*, endêmica do Marrocos, é co-irmã do grupo de *Hypochoeris* da América do Sul, sugerindo que um centro secundário de diversidade surgiu no Novo Mundo após dispersão a longa distância, a partir de um ancestral hipotético oriundo do noroeste da África (Tremetsberger et al. 2005). Estes dados encontram suporte também em características de dados de AFLP (Tremetsberger et al. 2006), e características cariotípicas (Oberprieler e Vogt 2002; Tremetsberger et al. 2005), fornecendo informações importantes que ligam *H. angustifolia* ao grupo de espécies do Novo Mundo.

No Brasil o maior número de espécies do gênero *Hypochoeris* (de oito a dez) ocorre na Região Sul (Bortiri 1999). Uma das espécies pertencentes ao grupo sul-americano é *Hypochoeris lutea*, que ocorre preferencialmente no Sul do Brasil com poucos relatos de ocorrência na Argentina e Uruguai (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007).

## 2.2 HYPOCHAERIS LUTEA

*Hypochaeris lutea* pode ser encontrada em regiões frias, altas e de extrema umidade (banhados e brejos) no sul do Brasil, em associação com espécies hidrófilas que são encontradas, principalmente, em turfeiras como *Sphagnum* sp. (Matzenbacher 1998) (Figura 1). A espécie é encontrada predominantemente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Porém, alguns relatos (coleções de herbários) mostram sua ocorrência também em regiões montanhosas e de grande umidade nos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, bem como no Uruguai e Argentina (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007). *Hypochaeris lutea* é uma erva perene com raiz pivotante profunda, com flores de cor amarela e lígulas também amarelas, que ultrapassam as brácteas involucrais, apresenta florescimento em fevereiro e julho e frutificação em fevereiro (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007), porém, em algumas populações, pode-se observar florescimento entre os meses de novembro e janeiro.



**Figura 1** – Ambiente de ocorrência de *Hypochaeris lutea*, Campina Grande do Sul, PR (A), corola de *H. lutea* (B), indivíduo em casa de vegetação de *H. lutea* (C), indivíduo com variação de cor da corola de *H. lutea* (D).

Estudos citogenéticos mostram que *Hypochaeris lutea* se caracteriza por apresentar um cariótipo representado pela fórmula  $2n = 2x = 4st + 2m\text{-sat} + 2m$ , com constrição secundária subterminal associada ao satélite no braço curto do cromossomo 3. Este padrão foi descrito para *H. rozengurtii*, sinonímia de *H. lutea*, por Ruas et al. (1995, 2005). A

partir de dados sobre a morfologia dos cromossomos, particularmente sobre distribuição de sítos de rDNA, Weiss-Schneeweiss et al. (2007) dividiram várias espécies sul-americanas de *Hypochoeris* em grupos cariotípicos. A morfologia cromossômica de *H. lutea* possibilitou a inclusão desta espécie dentro do grupo *Patagonica*, que se caracteriza pela presença de satélite no braço curto do cromossomo 3. Esse grupo conta com a presença de apenas duas espécies: *H. patagonica* e *H. lutea* (Weiss-Schneeweiss et al. 2007).

Estudos citogenéticos adicionais em *H. lutea* mostraram a presença de heterocromatina, evidenciada por blocos CMA<sub>3</sub> (Cromomicina A3) positivos, de intensidade média no satélite do braço curto do cromossomo 3, além de sinais CMA<sub>3</sub> positivos adicionais nas regiões intersticiais nos braços curto e longo do cromossomo 2 (Ruas et al. 2005). Dados mais recentes, envolvendo estudos de populações em *H. lutea*, mostraram a ocorrência de uma população totalmente poliplóide nesta espécie (Fiorin 2008).

### 2.3 FATORES QUE ATUAM NA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

A variação genética existente nas populações é um fator fundamental para que ocorra a evolução. A seleção natural atua nas diferenças dentro de populações em relação à adaptação ao ambiente, proporcionando então a variação entre populações, e por fim, a diferenciação entre espécies (Torggler et al. 1995). Sendo assim, quanto maior a variabilidade genética presente na população, maiores as chances da espécie perdurar naquele ambiente.

O padrão espacial ou a estrutura genética dentro de populações é um componente importante dentro dos processos genético-ecológicos e evolutivos de populações naturais de plantas (Epperson 1990). A destruição de habitats e a consequente fragmentação de populações naturais podem levar a uma limitação evolutiva, uma vez que podem reduzir a capacidade adaptativa da espécie (Barret e Kohn 1991). A perda da variabilidade genética pela fragmentação de habitats, pode ocorrer devido à redução do tamanho populacional, criando gargalos genéticos, nos quais indivíduos remanescentes participam apenas com uma pequena parcela da amostra do conjunto gênico original para a formação de novas populações. Caso a população que teve seu tamanho reduzido permaneça isolada por muitas gerações, poderá haver ainda perda contínua de alelos devido à deriva genética (Barret e Kohn 1991; Charlesworth e Charlesworth 1987).

Em populações naturais esta variabilidade genética pode ser tanto perdida quanto acrescida por processos naturais. Os processos que podem introduzir variabilidade continuamente nas populações são basicamente dois: mutação e migração, e esta pode ser perdida por deriva genética, endocruzamentos e seleção natural (Cole 2003). A distribuição da variabilidade genética nas populações naturais depende também de outros fatores que são intrínsecos à espécie, como o mecanismo de dispersão de pólen e sementes, o modo de reprodução, o sistema de cruzamento, bem como alguns fatores ambientais que possam influenciar ou direcionar de forma agregada essa distribuição (Kevin et al. 2004; Luna et al. 2005; Marquardt e Epperson 2004).

Hamrick e Murawski (1991) afirmam que as espécies que mantêm populações com alta densidade demográfica apresentam maiores níveis de diversidade genética do que as de baixa densidade, aumentando a probabilidade de ocorrerem mutações e a incorporação de novos alelos nas populações.

A distribuição geográfica de uma espécie também exerce uma grande influência sobre o nível da variabilidade genética como proposto por Cavalli e Winge (2003). Sendo assim, espécies endêmicas com razoável homogeneidade ambiental podem apresentar menores níveis de variabilidade genética em suas populações, enquanto, espécies com distribuição regional, relativamente restrita, têm níveis de variabilidade genética intermediária. Por outro lado, espécies com distribuição geográfica ampla são as que normalmente apresentam maior variabilidade genética intrapopulacional (Cavalli e Winge 2003).

O fluxo gênico é um outro fator importante na estruturação genética de populações de plantas, no qual é responsável pela redução da divergência genética entre populações (Nason et al. 1997). Fluxo gênico é um termo coletivo que inclui todos os mecanismos que resultam no movimento de alelos de uma população para outra (Slatkin 1985). Através da dispersão de pólen e sementes, genótipos de diferentes populações podem se encontrar, equilibrando fenômenos como a deriva genética, que pode reduzir a variabilidade genética destas populações ao longo do tempo (Futuyma 1992). Sendo assim, Wright (1943) afirma que populações separadas por longas distâncias e com fluxo gênico limitado podem tornar-se diferenciadas geneticamente uma das outras pelo processo de isolamento por distância.

As estimativas de fluxo gênico podem ser realizadas tanto por métodos diretos ou indiretos. Slatkin (1987) recomenda o uso desses dois métodos conjuntamente, por produzirem informações diferentes e complementares. Os métodos diretos utilizam

estimativas das distâncias de dispersão e do sucesso no estabelecimento de imigrantes que podem ser influenciadas pela capacidade de dispersão, variando significativamente entre espécies. Algumas comparações entre as taxas de colonização observadas e as previstas pelas curvas de distribuição, descritas pela abordagem ecológica, tem mostrado que a magnitude da dispersão a longa distância tem sido subestimada (Ouborg et al. 1999). Já os métodos indiretos usam as frequências alélicas ou medidas de diferenciação genética, obtidas frequentemente com uso de marcadores moleculares.

A deriva genética é um outro fator de importância que pode influenciar na estrutura genética de uma população e apresenta efeitos contrários ao fluxo gênico. Este fator se refere a uma flutuação aleatória na frequência alélica, levando eventualmente, a fixação ou perda do alelo. Este processo apresenta numerosas consequências evolutivas, duas das quais merecem ênfase especial: perda de variação genética dentro de populações e possível divergência genética entre elas (Futuyma 1992). Além disso, um fator importante em relação à deriva genética diz respeito ao tamanho efetivo da população ( $N_e$ ), ou seja, o número efetivo de indivíduos em idade reprodutiva que podem ser encontrados dentro de uma área de vizinhança genética (Silvertown e Doust 1993). Enquanto o efeito da deriva genética pode ser sentido com mais intensidade em populações de menor tamanho, este pode ser desprezível em populações grandes (Ridley 2006). O tamanho efetivo juntamente com outros fatores como densidade populacional (Murawski e Hamrick 1992), sincronia no florescimento, padrões fenológicos (Hall et al. 1994), presença de mecanismos de auto-incompatibilidade (Murawski e Hamrick 1992) pode ser de grande interesse também devido a sua influência sobre o sistema reprodutivo.

O sistema reprodutivo é determinado pelo modo de transmissão dos genes de uma geração para outra, o qual pode ocorrer por cruzamentos aleatórios, cruzamentos biparentais, autofecundações, apomixia e suas combinações (Souza et al. 2003). Desta maneira, o sistema reprodutivo interfere na variação genética e sua distribuição entre e dentro das populações (Crawford 1984). Na maioria das espécies de plantas, a polinização cruzada é preferível à autofecundação e há diversos mecanismos da biologia da reprodução que dificultam e, às vezes, até impedem a ocorrência de autofecundação. (Adams 1991). Como exemplo, há o sistema sexual das espécies (dioiccia, monoiccia), mecanismos de autoincompatibilidade, as características florais, o comportamento dos agentes polinizadores, entre outros (Adams 1991; Boshier 2000).

Métodos tradicionais de estudo do sistema de reprodução de uma espécie são baseados numa análise da morfologia floral, em experimentos de cruzamentos em casa de

vegetação e na observação do comportamento dos polinizadores fornecendo apenas informações qualitativas (Clegg 1980). Já a inferência quantitativa do sistema da reprodução é possível pelo uso de marcadores moleculares (Boshier et al. 2000), por meio da determinação da distribuição dos genótipos nas famílias, desta maneira sendo possível então quantificar geneticamente os resultados dos cruzamentos (Clegg 1980). A determinação do sistema de reprodução com marcadores genéticos descreve, portanto, a maneira como os gametas dos parentais de uma população se unem (Boshier et al. 1995).

A relação entre o sistema de reprodução e deriva genética, principalmente no que diz respeito à depressão por endogamia, é uma importante questão a ser considerada na conservação de recursos genéticos, pois populações pequenas geralmente sofrem endogamia. Altos níveis de endogamia não resultam necessariamente em depressão, pois a depressão por endogamia depende principalmente de mecanismos genéticos e da história de vida da espécie (Barret e Kohn 1991; Charlesworth e Charlesworth 1987).

### 2.3.1 Análise sobre a Estrutura Genética de Populações

A estrutura genética de populações pode ser avaliada utilizando-se algumas metodologias distintas: coeficiente de coancestralidade de Cockerham (Cockerham 1969; Vencovsky 1992; Weir 1996), que fornece a distribuição da variabilidade genética em diversos níveis hierárquicos; as estimativas da diversidade genética de Nei (1973, 1978), que fornece a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações (Gonzales e Hamrick 2005; Lee et al. 2002); estatísticas  $F$  de Wright (Wright 1965), que possibilitam identificar níveis médios dos índices da fixação alélica para o total de populações ( $F_{IT}$ ), dentro da população ( $FIS$ ), e a divergência genética entre populações ( $F_{ST}$ ) (Moraes et al. 1999; Yeeh et al. 1996).

Os parâmetros mais utilizados para quantificar a variação genética são as proporções de locos polimórficos dentro de espécies ( $Pe$ ) e dentro de populações ( $Pp$ ) e a diversidade geral de espécie ( $He$ ) e de populações ( $Hp$ ) (Hamrick 1994). Apesar da grande importância dessas estatísticas para a caracterização genética de populações naturais, elas permitem apenas uma descrição geral sobre a heterogeneidade espacial da variabilidade existente (Barbujani 1987). As inferências sobre os processos microevolutivos atuando nas populações podem ser efetuadas de forma mais completa com a utilização de técnicas mais

elaboradas de análise espacial (Slatkin e Arter 1991, Epperson 1997). A análise de autocorrelação espacial (Sokal e Oden 1991; Heywood 1991) representa uma estratégia mais geral e mais eficiente para descrever “superfícies” de variação genética complexas, avaliando a semelhança entre os valores das frequências alélicas nas subpopulações vizinhas espacialmente e como essa semelhança se altera à medida que se modifica a escala geográfica. Considerando que a variabilidade genética é a condição principal para evolução, o conhecimento sobre a amplitude e distribuição desta variabilidade é fundamental para acessar o potencial evolutivo de populações e espécies de plantas. (Silvertown e Doust 1993).

#### 2.4 MARCADORES MOLECULARES PARA ESTIMATIVA DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

Existem muitas maneiras de acessar a estrutura genética de populações e verificar o grau de variabilidade existente em uma determinada espécie. O mais simples indicador de variabilidade genética é a variabilidade morfológica, porém esta pode sofrer influência do ambiente, apresentando variação contínua e grande plasticidade (Ferreira e Grattapaglia 1998). Sendo assim para uma melhor e mais segura determinação da variabilidade genética é necessário utilizar características que não sofram influências do meio ambiente. Neste sentido as técnicas de biologia molecular permitem observar o polimorfismo diretamente no DNA. Os marcadores moleculares abriram novas perspectivas para as pesquisas de biologia populacional e de conservação de espécies, e têm sido largamente utilizados no monitoramento da variabilidade genética (Ferreira e Grattapaglia 1998).

A introdução da técnica de eletroforese de isoenzimas no início na década de 60, além de iniciar a era dos marcadores moleculares, ampliou o número de marcadores que poderiam ser utilizados na caracterização de espécies. A eletroforese de isoenzimas tem como base a ocorrência de mutações no código genético, as quais alteram a carga elétrica de algumas proteínas com função enzimática. Após eletroforese das amostras de proteína, o polimorfismo é detectado através da visualização do produto enzimático por métodos histoquímicos (Toggler et al. 1995). Apesar de acrescentarem informações importantes para a análise genética, os marcadores isoenzimáticos podem ter baixo polimorfismo, encontrando pouca aplicabilidade, quando é necessária uma cobertura mais ampla do genoma (Ferreira e Grattapaglia 1998).

O poder de detecção da variabilidade existente diretamente ao nível do DNA só foi alcançado com o desenvolvimento de técnicas em biologia molecular. Os marcadores genéticos de DNA têm se mostrado importantes ferramentas para descrever os padrões da variabilidade genética de uma população natural e, com o seu uso, é possível avaliar como esta variabilidade encontra-se distribuída dentro e entre as populações (Sebbenn 2001; Telles et al. 2003).

A primeira técnica descrita para obtenção de marcador genético de DNA, baseia-se na ação de enzimas de restrição após reconhecimento de uma sequência de DNA, no qual o marcador RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) é fundamentado. A técnica de RFLP surgiu na década de 70 em um experimento destinado a detecção de mutação de DNA de vírus (Grodzicker et al. 1974) ele foi usado mais tarde por Botstein et al. (1980) para análise genômica. Os marcadores RFLP tornaram-se uma ferramenta útil e importante para várias áreas da biologia. Porém, em estudos de genética de populações este marcador não foi muito difundido e utilizado devido ao grau de dificuldade e o alto custo da técnica, quando aplicada a um grande número de indivíduos.

Os marcadores minissatélites desenvolvidos na década de 80 permitem também a identificação de polimorfismo diretamente no DNA. A primeira região hipervariável foi isolada ao acaso a partir de uma biblioteca genômica descrita por Wyman e White, 1980. Os minissatélites têm sido utilizados no melhoramento de plantas para identificação de variedades e clones, na análise de diversidade genética e na determinação de paternidade (Dallas 1988; Nybom e Hall 1991; Broun et al. 1992).

O surgimento da técnica de PCR na década de 80 desenvolvida por Mullis e Faloona (1987), que permitiu a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, provocou uma verdadeira revolução nas técnicas de biologia molecular. O uso das técnicas de PCR na análise genética permite um melhor entendimento de processos de especiação, padrões de biogeografia ao nível de espécie, bem como a estrutura genética de populações. Os marcadores de DNA mais utilizados em estudos genéticos de plantas são o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e os SSRs (*Simple Sequence Repeats*) ou microsatélites (Ferreira e Grattapaglia 1998).

### 2.4.1 Marcadores AFLP

A técnica AFLP, descrita por Vos et al. (1995), associa o polimorfismo gerado por enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR. O DNA total da planta é clivado por enzimas de restrição, originando um número extremamente elevado de fragmentos que, em função da concentração, não são detectados em eletroforese. Pequenas sequências de DNA (adaptadores) são acopladas às extremidades 3' desses fragmentos de restrição, as quais se anelam com *primers* específicos, durante a PCR (pré-amplificação e amplificação seletiva). Os fragmentos gerados são então separados por eletroforese em gel de poliacrilamida. Porém, atualmente existem equipamentos e programas específicos para análise destes fragmentos, não sendo necessário o uso de géis de poliacrilamida.

Os marcadores AFLP têm como vantagens o grande número de marcadores analisados em um único gel com alto poder de detecção de variabilidade genética, não requer informação prévia de sequência de DNA, ainda há a possibilidade de diferentes combinações entre *primers* e enzimas de restrição e, é possível maior repetibilidade dos resultados, quando comparados com a técnica RAPD (Ferreira e Grattapaglia 1998).

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 (Ferreira e Grattapaglia 1998; Zhivotovsky 1999; Costa et al. 2000).

Os marcadores moleculares de AFLP foram considerados úteis para estudos de diversidade genética e padrões biogeográficos, que foram moldados por mudanças climáticas no Mediterrâneo durante o período quaternário em espécies de plantas como *Hypochaeris angustifolia* (Terrab et al. 2009). Marcadores de AFLP foram também utilizados para estudos biogeográficos de três espécies andinas de *Hypochaeris* na América do Sul: *H. acaulis* (Remy) Britton, *H. tenuifolia* (Hook. et Arn.) Griseb., e *H. palustris* (Phil.) De Wild. (Tremetsberger et al. 2003a; 2003b; Muellner et al. 2005), para espécies da Península Ibérica tais como, *H. salzmanniana* DC., *H. radicata* L. still e *H. glabra* L. e para estudos de populações da espécie endêmica na costa Atlântica *H. salzmanniana*, distribuídas em ambos os lados do estreito de Gibraltar (Tremetsberger et al. 2004, Ortiz et al. 2007). Os resultados destes estudos sugerem que o uso de marcadores AFLPs é adequado para a determinação da estrutura genética das populações do gênero *Hypochaeris* e estes dados podem fornecer

informações relevantes para auxiliar na compreensão sobre a chegada e a radiação do gênero no continente sul-americano.

### 3 JUSTIFICATIVA

Exemplos de radiação adaptativa vegetal em continentes são menos conhecidos. O gênero *Hypochaeris* ocorre em dois centros distintos de diversidade, um na região Mediterrânea e o outro na América do Sul. Porém, as relações filogenéticas no grupo sul-americano, sua chegada à América do Sul e os mecanismos de radiação adaptativa que levaram a diversificação do gênero neste continente ainda não foram completamente elucidados. Sendo assim, o gênero *Hypochaeris* tem se mostrado um excelente modelo para estudos evolutivos em continentes.

No Brasil são descritas cerca de 8 a 10 espécies de *Hypochaeris* as quais se encontram distribuídas principalmente na região sul. Dentre estas espécies se encontra *Hypochaeris lutea* (Vell.) Britton encontrada em regiões frias, altas e de extrema umidade (banhados e brejos) em associação com espécies hidrófilas que são encontradas, principalmente, em turfeiras.

Alguns estudos citogenéticos já foram realizados para definir a estrutura cariotípica em *H. lutea*, mas nenhum trabalho envolvendo técnicas moleculares para estudos de estrutura genética de populações foi realizado até o momento. Estes dados são importantes por fornecerem subsídios para estudos genéticos, pois o conhecimento sobre a estrutura de populações de plantas oferece uma perspectiva histórica sobre as mudanças evolutivas que caracterizam uma espécie. O estudo proposto com *H. lutea* poderá contribuir para uma melhor compreensão sobre os mecanismos envolvidos nos processos de radiação e evolução do gênero *Hypochaeris* no continente sul-americano.

## 4 OBJETIVO

Investigar a estrutura genética de 11 populações de *Hypochaeris lutea* distribuídas nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Mapear populações de *H. lutea* nas diferentes áreas de distribuição;
- b) Aplicar a técnica de AFLP para definir a estrutura genética de populações de *H. lutea*
- c) Gerar informações relevantes que auxiliem nos estudos de biogeografia do gênero *Hypochaeris*.

**5 ARTIGO**

**ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *HYPOCHAERIS LUTEA*  
(ASTERACEAE)**

\* Este artigo será submetido à revista **Genetica**.

## ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *HYPOCHAERIS LUTEA* (ASTERACEAE)

### Abstract

*Hypochaeris lutea* (Vell.) Britton, Asteraceae is an endemic species from South American, growing in cold and wet lands in the southern and southeastern of Brazil, as well as in Uruguay, Paraguay and Argentina. In the present study, 270 individuals representing 11 populations of *H. lutea*, distributed in the states of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul, were studied using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) markers, aiming to elucidate the population genetic structure of this species. Six AFLP primer combinations rendered 193 markers that were used to estimate the Nei's genetic distance. The relationships within and among populations were estimated by AMOVA (Analysis of Molecular Variance) and Principal Coordinate Analysis (PCoA). The frequency of polymorphic *loci* and the gene diversity were high, varying from 83,42% to 91,66% and from 0,2588 to 0,3442, respectively. As showed by the Mantel test there was no positive correlation between genetic and geographic distances. The PCA revealed that individuals of all populations are mixed, as suggested by absence of private alleles. AMOVA used to estimate  $F_{ST}$  indicated that most of the genetic variability was found within 80,66% than among 19,34% populations, possibly because a process of long distance dispersion, a common phenomenon in plants of the Asteraceae family with a system of allogamy. The pattern of genetic structure observed in *H. lutea* is consistent with a process of rapid and recent radiation that has been proposed to explain the origin of the South American species of *Hypochaeris*.

**Keywords:** Population genetics. AFLP. Genetic variability. Asteraceae.

### INTRODUÇÃO

O gênero *Hypochaeris* L. (Asteraceae) compreende um grupo de espécies herbáceas cosmopolitas, com maior ocorrência nas regiões subtropicais e temperadas (Barroso 1991). Estas espécies podem ser encontradas em diferentes ecossistemas tais como campos, ambientes savânicos e florestas abertas (Cabrera 1929; Matzenbacher 1985; Garcia et al. 2000). *Hypochaeris* possui dois centros de diversidade, a Região Mediterrânea como centro primário e a América do Sul, o centro secundário, proposto por Stebbins (1971) com base em número e morfologia cromossômica. O gênero possui mais de 15 espécies, ocorrendo na Europa, Ásia e nordeste da África (DeFillips 1976; Oberprieler 2002) e cerca de 50 espécies na América do Sul (Bortiri 1999).

Estudos com sequências de DNA nuclear ITS, de citogenética molecular (rDNA 5S, 18 e 25S) e marcadores moleculares AFLP (Tremetsberger et al. 2005, 2006) têm mostrado que *Hypochaeris angustifolia*, (Litard. & Maire) uma espécie endêmica do

Marrocos, é co-irmã do grupo sul-americano de *Hypochoeris*, sugerindo que um centro secundário de diversidade tenha surgido no Novo Mundo após dispersão a longa distância, a partir de um ancestral hipotético oriundo do noroeste da África (Tremetsberger et al. 2005). Estes dados encontram suporte também em dados de AFLP (Tremetsberger et al. 2006), e características cariotípicas (Oberprieler e Vogt 2002; Tremetsberger et al. 2005), fornecendo informações importantes que ligam *H. angustifolia* ao grupo de espécies do Novo Mundo.

Samuel et al. (2003) e Tremetsberger et al. (2005) a partir de estudos filogenéticos sugerem que o gênero *Hypochoeris* tem passado por processos de especiação de forma rápida e recente na América do Sul, tendo surgido há cerca de 3,5 milhões de anos atrás durante o Plioceno ou Pleistoceno e evoluído rapidamente, entre 0,25 a um milhão de anos no Pleistoceno. Radiações rápidas e entre continentes, tais como observado em *Hypochoeris* na América do Sul e na região Mediterrânea representam um importante fenômeno evolutivo (Tremetsberger et al. 2005). Neste contexto o gênero *Hypochoeris*, fornece um excelente modelo para estudos evolutivos e de especiação.

Entre as espécies pertencentes ao grupo sul-americano, *Hypochoeris lutea* (Vell.) Britton, com ocorrência preferencialmente no sul do Brasil e com alguns relatos de ocorrência na Argentina e Uruguai (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007) ainda carece de informações. *Hypochoeris lutea* apresenta características morfológicas e ecológicas semelhantes à espécie co-irmã, *H. angustifolia*, possível ancestral do grupo sul-americano (Tremetsberger et al. 2005). Alguns estudos citogenéticos detalhados já foram realizados em *H. lutea*, mas nenhum trabalho envolvendo técnicas moleculares para estudos de estrutura genética de populações foi realizado até o momento nesta espécie.

Os estudos genéticos são importantes por fornecerem subsídios para estudos evolutivos. O conhecimento de uma determinada estrutura de população de plantas oferece uma perspectiva histórica sobre as mudanças evolutivas que caracterizam uma espécie e permite aos investigadores prever com mais precisão como essas populações vão reagir a futuros eventos de origem natural e artificial (Ridley 2006).

Os marcadores genéticos são a principal ferramenta para descrever os padrões da variabilidade genética de uma população natural e, com o seu uso, é possível avaliar como esta variabilidade encontra-se distribuída dentro e entre as populações (Sebbenn 2001; Telles et al. 2003). Dentre as técnicas de marcadores moleculares, o AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*) destaca-se pelo grande número de marcadores gerados por ensaio, grande poder de detecção de variabilidade genética e maior repetibilidade (Vos et al. 1995). Apesar de pouco informativo por locos, por se tratar de um marcador dominante,

estudos de simulação mostram que o grande número de marcadores AFLP compensa o baixo conteúdo de informação genética por locos (Mariette et al. 2002).

Marcadores AFLP estão sendo frequentemente utilizados nos estudos de diversidade genética no gênero *Hypochaeris*, tanto nos grupos do velho mundo quanto no grupo sul-americano (Tremetsberger et al. 2003a; 2003b, 2004; Ortiz et al. 2007; Terrab et al. 2009). Os resultados destes estudos sugerem que o uso destes marcadores é adequado para a determinação da estrutura genética das populações do gênero *Hypochaeris*.

Neste trabalho utilizamos o método de AFLP com o objetivo de investigar a estrutura genética de 11 populações de *H. lutea*, distribuídas nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e também fornecer informações relevantes que auxiliem nos estudos de biogeografia do gênero *Hypochaeris*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

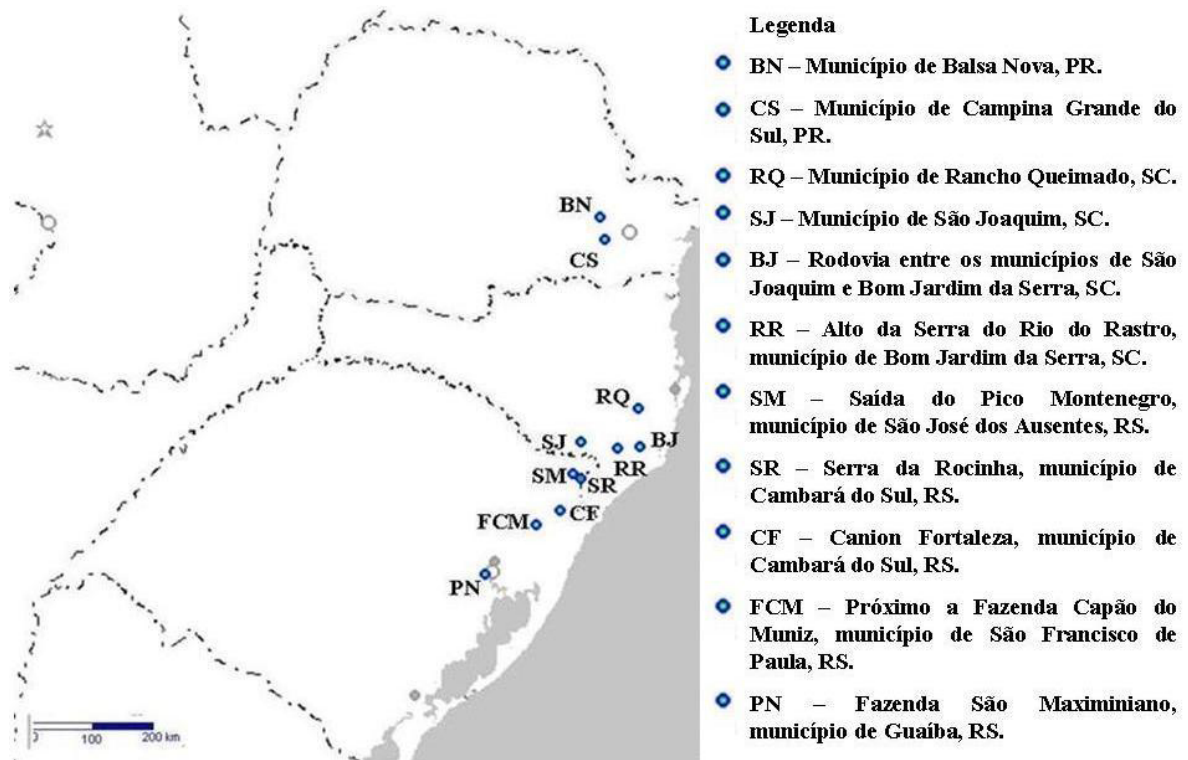
### ***Coleta do material***

Folhas jovens de *H. lutea* foram coletadas em sílica gel. Aproximadamente 25 indivíduos de cada uma de 11 populações naturais, distribuídas nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, foram amostrados (Tabela 1 e Figura 1) totalizando 270 indivíduos. Amostras herborizadas, representantes das referidas populações encontram-se depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL).

**Tabela 1** – Origem geográfica de 11 populações de *H. lutea* na região sul do Brasil com respectivos coletores, números de coleta e coleção, (N) – número de indivíduos coletados.

Siglas	Localização	N	Coordenadas geográficas
FCM	Próximo a Fazenda Capão do Muniz, município de São Francisco de Paula, (RS). CR, PR, NM, MO. 13/06 (FUEL42225).	25	29° 33' S, 51° 51' O
BJ	Rodovia entre os municípios de São Joaquim e Bom Jardim da Serra, (SC). CR, PR, EU. 355/08 (FUEL43).	25	28° 17' S, 49° 56' O
RR	Alto da Serra do Rio do Rastro, município de Bom Jardim da Serra, (SC). PR, CR, TN. 07/07 (FUEL40654).	20	28° 16' S, 49° 52' O
CF	Cânion Fortaleza, divisa entre os estados de SC e RS, próximo ao município de Cambará do Sul. CR, PR, NM, MO. 27/06 (FUEL42233).	25	29° 2' 86'' S 50° 8' O
PN	Fazenda São Maximiliano, Br-116, km 308, Guaíba, (RS). 02/06 (FUEL 42235).	25	30° 10' S, 51° 23' O
SR	Serra da Rocinha, município de Cambará do Sul, (RS). CR, PR, NM, MO. 17/06 (FUEL42235).	25	29° 01' S, 50° 09' O
SM	Saída do Pico Montenegro, município de São José dos Ausentes, (RS). CR, PR, NM, MO. 22/06 (FUEL42241).	25	28° 37' S, 49° 48' O
RQ	Município de Rancho Queimado, (SC). CR, PR, EU. 352 (FUEL42).	25	27° 40' S, 49° 01' O
SJ	Município de São Joaquim, (SC). PR, CR, TN. 08/07 (FUEL40652).	25	28° 17' S, 49° 55' O
BN	Município de Balsa Nova, (PR). CR, PR, LR, MR. 10/08a (FUEL44451).	25	25° 31' 16'' S 49° 35' 15'' O
CS	Município de Campina Grande do Sul, (PR). CR, PR, LR, MR. 10/08b (FUEL44452).	25	25° 18' 77'' S 48° 55' 90'' O

Abreviações dos estados: PR, Paraná; RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina. Abreviações dos coletores: CR, C.F. Ruas; EU, E. Urtubey; LR, L.A. Rodrigues; MO, M.A. Ortiz; MR, M. Reck; PR, P.M. Ruas; NM, N.I. Matzenbacher; TN, T.J. Nakayama. FUEL – Herbário da Universidade Estadual de Londrina.



**Figura 1** – Áreas de coleta de 11 populações amostradas de *H. lutea* situadas nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil.

### Reação de AFLP

Para aplicação da técnica de AFLP o DNA de cada amostra foi extraído de acordo com o protocolo CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Doyle e Doyle 1987) com algumas modificações (Tremetsberger et al. 2003b). As amostras de DNA foram quantificadas e cerca de 800 a 1000ng foram submetidas à restrição com 5U de *EcoRI* e 5U de *MseI* em tampão de digestão com um volume total de 20 $\mu$ l. As amostras foram incubadas em estufa a 37°C por 16h. Os fragmentos gerados foram ligados a adaptadores específicos, conforme descrito por Vos et al. (1995) com algumas modificações.

A reação de ligação foi feita em um volume de 10 $\mu$ l contendo tampão de T<sub>4</sub> DNA Ligase 1X, NaCl 0,05M, BSA 0,5ng, DTT 2,5mM, adaptadores *Mse* 50mM, adaptadores *EcoR* 5mM, T<sub>4</sub> DNA Ligase 1U, na qual foi adicionada 20 $\mu$ l da pré-digestão, totalizando 30 $\mu$ l. Esta reação foi incubada a 37°C por 3h, 17°C por 30 min, 70°C por 10 min. A seguir 25 $\mu$ l da reação de restrição-ligação foi diluída em 100  $\mu$ l de água ultrapura.

A reação pré-seletiva utilizando a reação de restrição-ligação diluída foi efetuada de acordo com Vos et al. (1995) com algumas modificações. A amplificação pré-seletiva foi realizada em duas etapas para maior especificidade dos fragmentos utilizando o kit

GoTaq® *Green Master mix* (Promega, USA) mais 0,58µL de *primer* pré-seletivo 4,75µM e 3,0 µL da diluição da reação de restrição-ligação. O programa da amplificação pré-seletiva foi realizada em: 1 ciclo 72°C por 2 min, 20 ciclos de 90°C por 1 seg, 56°C por 30 seg e 72°C por 2 min seguido de 1 ciclo final de 60°C por 30 min. Em seguida, um volume de 5 µl da reação pré-seletiva foi diluído em 20 µl de água ultrapura.

Para amplificação seletiva foram testadas 16 combinações de *primers* com 2 ou 3 nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. Destas foram selecionadas as seguintes seis combinações *EcoRI*-AGC/*MseI*-CAG, *EcoRI*-AGC/*MseI*-CAAG, *EcoRI*-AGC/*MseI*-CTAG, *EcoRI*-ACT/*MseI*-CTCG, *EcoRI*-ACT/*MseI*-CAAG, *EcoRI*-AGC/*MseI*-CTCG. A reação seletiva foi realizada utilizando 3,5µL do kit GoTaq® *Green Master mix* (Promega, USA), acrescentando 0,54µl de cada *primer* seletivo *MseI* 5µM e *EcoRI* 5µM e 2,5µl da reação pré-seletiva. O programa utilizado para amplificação seletiva foi o seguinte: 1 ciclo 94°C por 2 min, 65°C por 30 seg e 72°C por 2 min; 8 ciclos de 94°C por 1 seg, 64°C por 30 seg e 72°C por 2 min; 23 ciclos de 94°C por 1 seg, 56°C por 30 seg e 72°C por 2 min e 1 ciclo final de 60°C por 30 min. Os produtos da amplificação foram separados em gel de poli-acrilamida (29 acrilamida : 1 bis-acrilamida) a 7% a 200 volts por um período de três horas e vinte minutos.

Após eletroforese os géis foram mantidos sob agitação durante cinco minutos em 150 mL de fixador, acrescentando em seguida 1mL de uma solução de nitrato de prata a 20%, mantendo a agitação por mais 8 min. Após descarte do fixador com nitrato de prata, o gel foi lavado com água destilada por três vezes. A revelação foi realizada em 150 mL de revelador, acrescido de 1,5mL de formaldeído, agitando o gel nesta solução até o aparecimento das bandas. Após aparecimento das bandas, o revelador foi descartado e o gel lavado em água destilada por três vezes, fixado em 150 mL de fixador por 5 min, lavado novamente e fotografado usando uma câmera digital NIKON Coolpix 995. As imagens foram transferidas para um computador e armazenadas até análise com o software Canvas X.

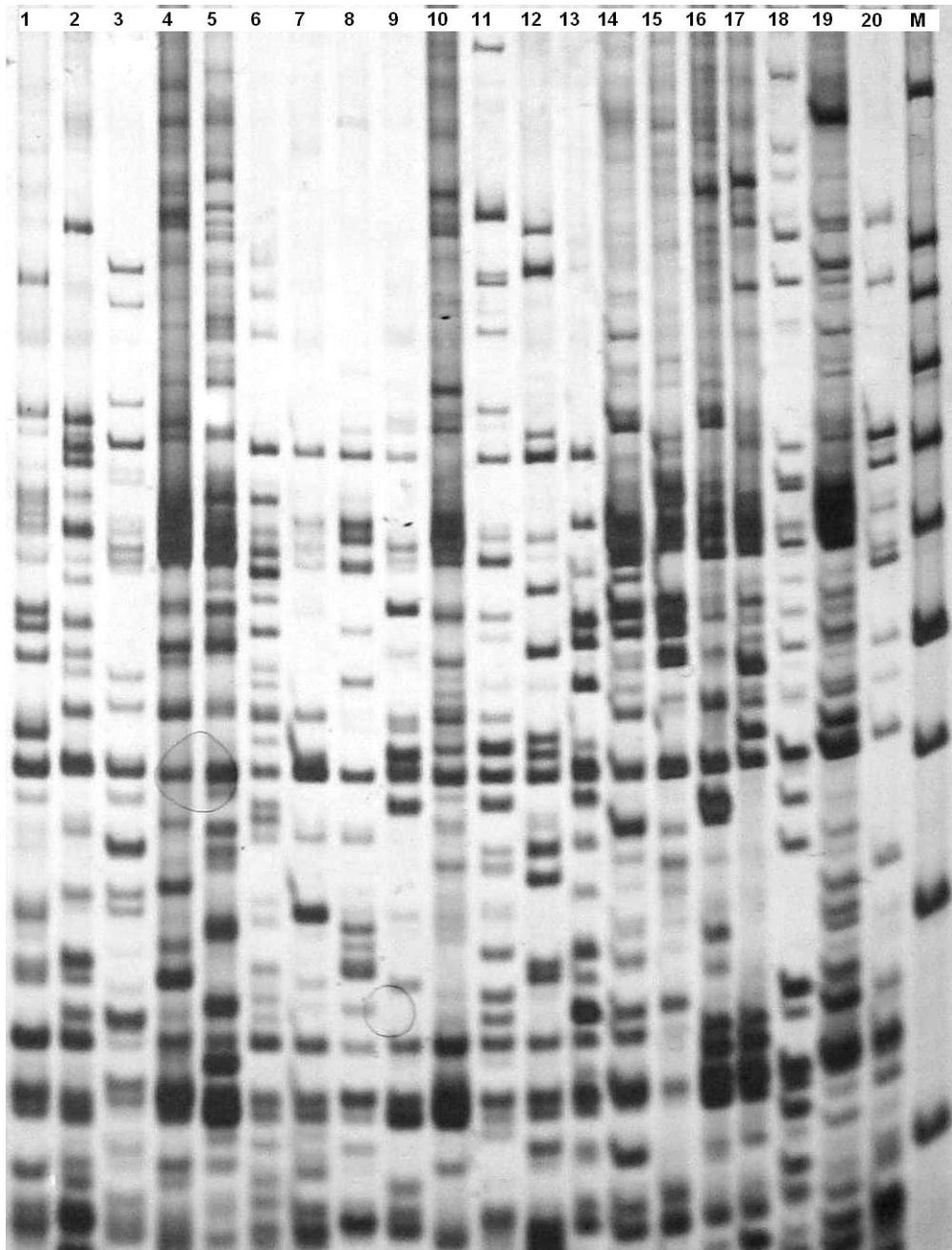
### ***Análise dos dados de AFLP***

Os géis foram analisados visualmente e os marcadores obtidos foram acessados para presença (1) ou ausência (0), no qual gerou-se uma matriz binária de dados, que foi utilizada nas análises estatísticas. Para o cálculo do coeficiente de variação foi utilizado o programa dBoot ver. 1.1 (Coelho 2001). A porcentagem de locos polimórficos, a diversidade gênica de Nei (1973) e a distância genética foram calculadas para as 11

populações utilizando o programa POPGENE 1.31 (Yeh et al. 2000). Para verificar a variação da variabilidade genética total entre e dentro de populações bem como o índice de fixação alélica ( $F_{ST}$ ) utilizou-se a análise de variância molecular (AMOVA) conduzido no programa Arlequin v. 3.11 (Excoffier et al. 2005). A matriz de distância genética foi comparada com a matriz de distância geográfica através de teste de Mantel (Manly 1997), utilizando o programa TFPGA (*Tools For Population Genetics Analyses*) versão 1.3 (Miller 1997). A análise da coordenada principal foi utilizada para avaliar a distribuição da distância genética através do programa FAMD (*Fingerprint Analysis with Missing Data*) (Schluter 2006).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

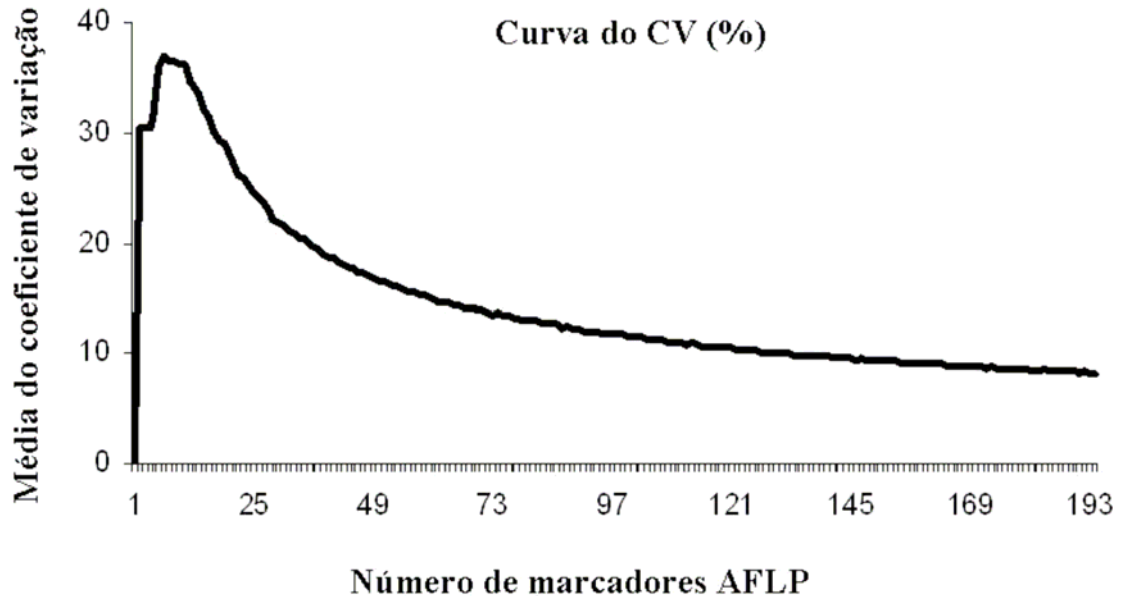
Seis combinações de *primers*, selecionados com base na qualidade dos produtos de amplificação e na quantidade de polimorfismo gerado, foram aplicados em 11 populações de *H. lutea*. As combinações de *primers* utilizadas renderam números variáveis de produtos de amplificação sendo: *EcoRI-AGC/MseI-CAG*, 28 marcadores; *EcoRI-AGC/MseI-CAAG*, 45 marcadores; *EcoRI-AGC/MseI-CTAG*, 24 marcadores; *EcoRI-ACT/MseI-CTCG*, 29 marcadores; *EcoRI-ACT/MseI-CAAG*, 30 marcadores; *EcoRI-AGC/MseI-CTCG*, 37 marcadores. Um total de 193 marcadores foram produzidos, com média de 32,17 marcadores por *primer* e 100% de polimorfismo. O tamanho dos fragmentos amplificados variou entre 50 a 1000 pb. A Figura 2 ilustra o padrão de marcadores AFLP obtido com a combinação de *primers EcoRI-AGC/MseI-CAG* em alguns dos indivíduos de *H. lutea*.



**Figura 2** – Padrão de marcadores amplificados por AFLP em alguns indivíduos de *H. lutea* com a combinação de *primers* *EcoRI*-AGC/*MseI*-CAG, 1-20 - indivíduos da população SM –Saída do Pico Montenegro, Município de São José dos Ausentes, M – marcador de peso molecular de 50pb.

O coeficiente de variação calculado para o número total de marcadores foi de 8,7%, este valor demonstra que o número de marcadores foi suficiente para realização das análises de diversidade genética (Figura 3). A estimativa de diversidade genética em *H. lutea* (Tabela 2) indicou a existência de elevados níveis de diversidade na espécie. A porcentagem de locos polimórficos apresentou uma variação de 83,42% na população da Serra do Rio do

Rastro - RR (07/07) a 98,96% na população de Serra da Rocinha - SR (17/06) com uma média de 91,66% entre as populações.



**Figura 3** – Coeficiente de variação aplicados em 193 marcadores moleculares AFLP em 11 populações de *H. lutea*.

**Tabela 2** – Comparação dos índices de diversidade dentro de cada população de *H. lutea* coletada na região Sul do Brasil, obtidos com marcadores AFLP. Pp - Porcentagem de locos polimórficos, (Hs) - diversidade gênica de Nei (1973).

População	Pp	Hs	Locos polimórficos
SM	97.41	0.3417	188
FCM	96.37	0.3078	186
SR	98.96	0.3321	191
BJ	95.34	0.3442	184
RR	83.42	0.2757	161
CS	88.08	0.2715	170
RQ	92.75	0.2853	179
PN	89.12	0.2668	172
CF	91.71	0.2929	177
BN	87.56	0.2588	169
SJ	87.56	0.2875	169

Abreviações das populações SM – Saída do Pico de Montenegro, Município de São José dos Ausentes RS; FCM – Próximo a Fazenda Capão do Muniz, Município de São Francisco de Paula, RS; SR – Serra da Rocinha, Município de Cambará do Sul, RS; BJ – Rodovia entre São Joaquim e Bom Jardim, SC; RR – Alto da Serra do Rio do Rastro, Município de Bom Jardim SC; CS – Município de Campina Grande do Sul, PR; RQ - Município de Rancho Queimado, SC; PN – Fazenda São Maximiliano, Município de Guaíba, RS; CF – Cânion Fortaleza, próximo ao Município de Cambará do Sul, RS; BN – Município de Balsa Nova, PR; SJ - Município de São Joaquim, SC.

Os valores de porcentagem de locos polimórficos encontrados em *H. lutea* são considerados elevados em comparação a outras espécies sul-americanas de *Hypochoeris*,

como o encontrado naquelas espécies que tiveram sua estrutura genética afetada por períodos glaciais durante o Pleistoceno. Por exemplo, em *H. incana* (Hook. & Arn.) Macloskie a porcentagem de locos polimórficos variou de 8,2 a 23,6% (Tremetsberger et al. 2009), em *H. palustris* (Phil.) De Wild. foi de 0,7 a 20,7% (Muellner et al. 2005) e em *H. acaulis* (Remy) Britton variou de 1 a 24% (Tremetsberger et al. 2003a). Possivelmente, os refúgios originados deste período podem ter afetado a porcentagem de locos polimórficos, devido à uma drástica redução no tamanho das populações nestas espécies, tendo como consequência a ocorrência de fenômenos de gargalo genético, efeito fundador e/ou deriva genética.

Os índices de diversidade (HS) gênica de Nei (1973) encontrados nas populações de *H. lutea* variaram de 0,2588, na população de Balsa Nova - BN (10/08a), a 0,3442, na população de Bom Jardim da Serra - BJ (355/08) com uma média de 0,2968 nas populações (Tabela 2). Estes índices são superiores aos encontrados em outras espécies de *Hypochaeris*. Por exemplo, na espécie marroquina irmã do grupo sul-americano, *H. angustifolia*, o índice de diversidade gênica variou de 0,01 a 0,15 (Terrab et al. 2009). Já na espécie endêmica do sudeste europeu *H. salzmanniana* DC. a diversidade gênica variou de 0,0426 a 0,1675 (Ortiz et al. 2007). Em outra espécie sul-americana, *H. acaulis*, também foi evidenciado um menor índice (0,002 a 0,056) de diversidade gênica (Tremetsberger et al. 2003a).

Cornuet e Luikart (1996) e Piry et al. (1999) sugerem que populações que experimentaram uma recente redução de seu tamanho efetivo exibem um número reduzido na porcentagem de locos polimórficos e na diversidade gênica. Desta maneira, considerando os elevados valores de diversidade gênica e de porcentagem de locos polimórficos, sugere-se que as populações de *H. lutea* não passaram por nenhum processo recente que tenha reduzido seu tamanho efetivo. É possível que as características intrínsecas à espécie, tais como, modo de reprodução, ciclo e história de vida, tenham contribuído para a manutenção desta variabilidade. Além disso, tal como verificado em outros grupos de plantas, como por exemplo, na família Poaceae (Pyšek 1997), espécies pertencentes à família Asteraceae apresentam alta capacidade de colonizar novos ambientes, principalmente devido a características como alta taxa reprodutiva e desenvolvimento de estruturas especializadas na dispersão (Pyšek 1997).

As estimativas da distância genética entre populações, calculadas conforme Nei (1978), mostraram que a menor distância genética (0,0318) foi verificada entre as populações de Serra da Rocinha – SR (17/06) e próximo a Fazenda Capão do Muniz – FCM (13/06), enquanto que a maior distância genética (0,2274) foi observada entre as populações

de Campina Grande do Sul – CS (10/08b) e da Serra do Rio do Rastro – RR (07/07) (Tabela 3). Foi observado também que as maiores distâncias genéticas foram observadas entre a população de Serra do Rio do Rastro em relação às demais populações do estudo.

**Tabela 3** – Distância genética de Nei (1978) abaixo da diagonal e distância geográfica (km) acima da diagonal em 11 populações de *H. lutea*.

	SM	FCM	SR	BJ	RR	CS	RQ	PN	CF	BN	SJ
SM	****	224,8	56	39	39	378	130	230	53	344	39
FCM	0.0482	****	175	234	240	553	347	82	178	499	235
SR	0.0364	0.0318	****	84	88	430	186	175	3	391	84
BJ	0.0409	0.0706	0.0491	****	7	346	113	252	82	308	2
RR	0.0928	0.1166	0.1090	0.1080	****	342	107	257	85	305	5
CS	0.1617	0.1513	0.1219	0.1750	0.2274	****	262	591	427	71	345
RQ	0.1148	0.0960	0.0871	0.1338	0.1979	0.0753	****	361	184	244	112
PN	0.1348	0.1190	0.0994	0.1583	0.2155	0.0785	0.0554	****	177	544	253
CF	0.1278	0.1015	0.0956	0.1519	0.1973	0.1108	0.0576	0.0443	****	389	82
BN	0.1501	0.1251	0.1074	0.1686	0.2008	0.0886	0.0741	0.0890	0.0982	****	308
SJ	0.1278	0.1310	0.1002	0.1439	0.1719	0.1067	0.0995	0.1090	0.0909	0.0814	****

Abreviações das populações SM – Saída do Pico de Montenegro, Município de São José dos Ausentes RS; FCM – Próximo a Fazenda Capão do Muniz, Município de São Francisco de Paula, RS; SR – Serra da Rocinha, Município de Cambará do Sul, RS; BJ – Rodovia entre São Joaquim e Bom Jardim, SC; RR – Alto da Serra do Rio do Rastro, Município de Bom Jardim SC; CS – Município de Campina Grande do Sul, PR; RQ - Município de Rancho Queimado, SC; PN – Fazenda São Maximiliano, Município de Guaíba, RS; CF – Cânion Fortaleza, próximo ao Município de Cambará do Sul, RS; BN – Município de Balsa Nova, PR; SJ - Município de São Joaquim, SC.

A análise de variância para dados moleculares (AMOVA) aplicada aos marcadores de AFLP mostrou que a maior parte, 80,66% da variância genética na espécie *H. lutea* se encontra dentro das populações, comparada com a variância entre de 19,34% populações (Tabela 4). Uma maior variabilidade genética dentro de populações, associada a altos níveis de locos polimórficos, tem sido encontrada em plantas com fecundação cruzada ou mista como observado por Hamrick e Godt (1989) em espécies arbóreas com sistema de cruzamento predominantemente misto.

Tremetsberger et al. (2003b) mostrou que a espécie sul-americana, alógama, *H. tenuifolia* (Hook. et Arn.) Griseb. apresenta maior variação dentro (69,11%) do que entre populações (30,89%). Já *H. acaulis*, uma espécie estritamente autógena, apresentou maior variabilidade genética entre (67,9%) as populações do que dentro (32,1%) das populações (Tremetsberger et al. 2003a). O mesmo padrão foi verificado em outra espécie autógena

facultativa, *H. palustris*, onde foi encontrada uma maior variabilidade entre (78%) populações do que entre (22%) indivíduos de uma mesma população (Muellner et al. 2005). Com relação à outra espécie sul-americana *H. incana* não se tem informações conclusivas sobre o sistema de cruzamento predominante, mas esta possui autoincompatibilidade esporofítica com poucos casos de autocompatibilidade (Mra'z et al. 2007) logo, é mais provável a alogamia e nesta também foi encontrada uma maior variabilidade dentro de populações (75%).

**Tabela 4** – Análise de variância para dados moleculares (AMOVA) em 11 populações de *H. lutea* a partir de marcadores AFLP.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre populações	10	2253,168	7,84899	19,34**
Dentro de populações	259	8476,01	32,72591	80,66
Total	269	10729,178	40,57489	
Índice de fixação	$F_{ST}$	0,1934		

\*\* P < 0.01; (teste de significância realizado através de 1023 permutações)

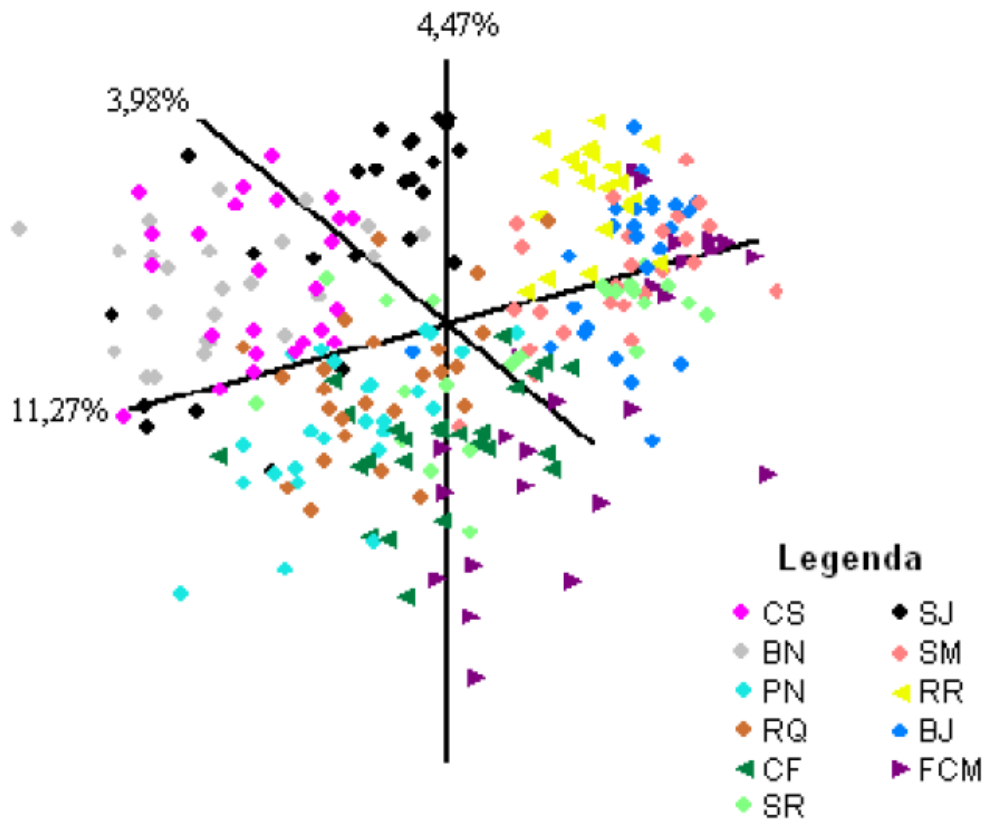
A AMOVA mostrou uma variação interpopulacional intermediária com um valor de  $F_{ST}$  igual a 0,1934 para *H. lutea*. Conforme parâmetros estabelecidos por Hartl e Clark (2007), valores de  $F_{ST}$  entre 15% a 25% representam níveis médios a elevado de variabilidade genética entre populações. Em *H. lutea* este valor intermediário de diferenciação entre populações, pode ser explicado pela forma de distribuição espécie. *Hypochaeris lutea* endêmica de regiões subtropicais no sul do Brasil, sendo encontrada especificamente em regiões frias de grande altitude, onde ocorre em populações extensas, porém isoladas e restritas a ambientes úmidos, como banhados e brejos. Existem alguns relatos da ocorrência de *H. lutea* em regiões de serra, no sudeste do Brasil (Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro), assim como no Uruguai e Argentina (Azevêdo-Gonçalvez e Matzenbacher 2007). Desta forma, esta espécie obedece aos padrões propostos por Cavalli e Winge, (2003) para espécies com distribuição regional, relativamente restrita apresentam níveis de variação intermediária. Este padrão de distribuição de *H. lutea* sugere que esta espécie invadiu ambientes úmidos por meio de uma sequência de eventos de dispersão a longa distância. Embora tais eventos sejam particularmente difíceis de serem acompanhados, pelo fato de serem relativamente raros, portanto pouco compreendidos, eles são essenciais para a colonização de novas áreas, particularmente para espécies cujos habitats ocorram em manchas

naturais, ou que tenham sido criadas pelo homem pela fragmentação de habitats anteriormente contínuos (Ouborg et al. 1999).

### **Estrutura Genética das populações de *H. lutea***

A partir da análise da coordenada principal observa-se que as 11 populações estudadas têm pouca ou nenhuma estruturação genética. Entretanto, a população da Serra do Rio do Rastro, parece mostrar indícios de estruturação (Figura 4). Os valores de distância genética de Nei (1978) (Tabela 3), em conjunto com a análise da coordenada principal (Figura 4) confirmam que a população da Serra do Rio do Rastro é a mais diferenciada geneticamente. Dados citogenéticos (Fiorin 2008) constataram a natureza poliplóide desta população, fato este, que poderia explicar, pelo menos em parte, a maior distinção entre esta e as outras populações de *H. lutea* estudadas. Não se tem informações que definam o tipo de poliploidia desta população, se auto - ou aloploplóide. Por outro lado, verificou-se que a população próxima a Fazenda Capão do Muniz - FCM (13/06) é a que apresenta uma dispersão mais ampla, mostrando seus indivíduos espalhados entre outros das demais populações. Esta população é bem peculiar, ela se encontra distribuída à margem de uma rodovia, ocupando uma faixa contínua com poucos indivíduos, característico de um processo recente de dispersão a longa distância a partir de outras populações.

O teste de Mantel, estimado para as distâncias geográfica e genética de Nei (1978), mostrou que não existe correlação significativa entre estas distâncias ( $r = 0,0865$   $P > 0,05$ ), mesmo para as populações que apresentam distância geográfica correspondente a 590 km. Foram realizados também o teste de Mantel para cada estado e por regiões próximas, entretanto, a ausência de correlação entre as distâncias geográfica e genética foi mantida. Esses resultados sugerem que *H. lutea* não obedece a um padrão claro de isolamento por distância, como verificado em *H. acaulis*, outra espécie também sul-americana de *Hypochaeris* (Tremetsberger et al. 2003a) e também na espécie marroquina *H. angustifolia* (Terrab et al. 2009).



**Figura 4** – Análise da coordenada principal obtida a partir da matriz de distância genética de Nei entre 270 indivíduos de *H. lutea* provenientes da região sul do Brasil.

Abreviações das populações SM – Saída do Pico de Montenegro, Município de São José dos Ausentes RS; FCM – Próximo a Fazenda Capão do Muniz, Município de São Francisco de Paula, RS; SR – Serra da Rocinha, Município de Cambará do Sul, RS; BJ – Rodovia entre São Joaquim e Bom Jardim, SC; RR – Alto da Serra do Rio do Rastro, Município de Bom Jardim SC; CS – Município de Campina Grande do Sul, PR; RQ - Município de Rancho Queimado, SC; PN – Fazenda São Maximiniano, Município de Guaíba, RS; CF – Cânion Fortaleza, próximo ao Município de Cambará do Sul, RS; BN – Município de Balsa Nova, PR; SJ - Município de São Joaquim, SC.

A pouca estruturação genética observada nas populações de *H. lutea* pode ser atribuída ao fato de que as espécies sul-americanas são relativamente jovens e apresentam uma história de rápida diversificação, em torno de 0,25 a 1 milhão de anos atrás (Tremetsberger et al. 2005). Resultados obtidos em trabalhos de filogenia molecular, realizados com espécies sul-americanas de *Hypochaeris* (Samuel et al. 2003; Stuessy 2003; Tremetsberger et al. 2005, 2006) mostraram baixos suportes de bootstrap, sugerindo que o processo recente de diversificação destas espécies não permitiu ainda uma diferenciação mais significativa ao nível de DNA. Além disso, foi verificado também que as espécies sul-

americanas de *Hypochoeris* ainda não estão completamente isoladas, pois o alto índice de hibridação é observado entre as diferentes espécies. (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007). Enquanto que nas espécies da região mediterrânea até o momento foi somente reportada a ocorrência de híbridos em casa de vegetação, não foi relatado nenhum de hibridização natural (Ortiz et al. 2009). A associação filogenética de plantas híbridas, entre dois possíveis parentais, foi confirmada com marcadores AFLP (Tremetsberger et al. 2006).

*Hypochoeris lutea* é uma erva rizomatosa com habilidade para propagação clonal e também para reprodução sexuada. Entretanto, a visitação por abelhas e os altos índices de locos polimórficos, juntamente com maior variabilidade encontrada dentro de populações sugerem que a reprodução por fecundação cruzada é predominante nestas populações, concordando com um padrão de distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações compatível com aquele observado em espécies alógamas no gênero *Hypochoeris*. Uma vez que os maiores níveis de variância genética dentro de populações foram encontrados em espécies alógamas (Tremetsberger et al. 2003b) enquanto os menores níveis de variância interpopulacional são vistos em espécies autógamas restritas e em espécies de sistema de cruzamento misto (Tremetsberger et al. 2003a; Muellner et al. 2005).

As plantas de *H. lutea* florescem entre os meses de setembro e janeiro, quando são visitadas por abelhas solitárias, provavelmente responsáveis pela polinização da espécie, assim como evidenciado em outras espécies do gênero *Hypochoeris*, como em *H. uniflora* (Mra'z et al. 2007) e *H. brasiliensis* (Noble e Moura 2009). Além da visitação das flores por abelhas verificadas durante as coletas, não foram encontrados na literatura outros dados sobre os agentes polinizadores ou dispersores em *H. lutea*. Porém observam-se diversos grupos de insetos atuando como vetores de pólen em Asteraceae, incluindo lepidópteros (borboletas), himenópteros (abelhas e vespas), dípteros (moscas) e coleópteros (besouros) (Arroyo et al. 1982; Mani e Saravanan 1999). A partir da análise de vários estudos realizados com plantas dessa família, Mani e Saravanan (1999) concluíram que 75% das espécies são polinizadas por borboletas, 15% por abelhas, 8% por moscas e 2% por besouros. Borboletas seriam, portanto, os insetos mais importantes como polinizadores. Porém alguns estudos com gêneros pertencentes a esta família encontraram as abelhas como o mais importante dispersor, como é o caso do gênero *Mikania* (Eiterer 2005).

Com relação aos agentes dispersores, *H.lutea* possui sementes plumosas, muito comuns na família Asteraceae, que são facilmente dispersas pelo vento (Soons et al. 2004), e que, conforme Holmes (1995) podem ser transportadas por correntes de ar por grandes distâncias. Além disso, foi observada a ocorrência de espécies de aves nas áreas de

coleta *H. lutea* que poderiam ajudar na dispersão destas sementes através da aderência destas em suas penas. É então provável que o padrão moderado de diferenciação genética interpopulacional esteja diretamente relacionado ao fato de aves poderem dispersar sementes para outras áreas e também pela participação dos ventos na dispersão. Sendo assim, a maior distribuição da variabilidade dentro de populações pode ser em parte devido à forma de dispersão das sementes. Cavalli e Winge, (2003) afirmam que populações que apresentam dispersão por sementes pelo vento, ingestão animal ou aderência, em regra, mantêm níveis de variação menores entre e maiores dentro de suas populações, como o encontrado em *H. lutea*. Além disso, numerosos estudos experimentais têm mostrado que os membros da família Asteraceae têm forte potencial para a dispersão de longa distância através de frutos leves e anexado a cerdas (Sheldon e Burrows, 1973; Anderson 1993).

Estudos filogenéticos com espécies sul-americanas de *Hypochaeris*, incluindo *H. lutea*, mostraram que esta espécie ocorre isolada dos agrupamentos formados, sugerindo pouca relação com outras espécies (Tremetsberger et al 2006). Recentemente *H. lutea* foi incluída em outro estudo (dados não publicados), no qual se procurava definir a posição filogenética de outra espécie (*H. catharinensis* Cabrera), entre as espécies sul-americanas de *Hypochaeris*. Nesse estudo *H. lutea* apareceu associada a *H. catharinensis*. As duas espécies ocorrem em regiões altas e frias no sul do Brasil, e, embora apresentem diferenças morfológicas e ecológicas marcantes, aparecem fortemente associadas e isoladas das outras espécies, caracterizando a formação de outro grupo filogenético entre os *Hypochaeris* da América do Sul.

*Hypochaeris lutea* e *H. catharinensis* também apresentaram padrões semelhantes de estruturação genética entre populações, além de maior variabilidade dentro de populações (80,66% para *H. lutea* e 83,64% para *H. catharinensis*) em relação às demais espécies sul-americanas já estudadas, tais como, *H. tenuifolia* (69,11%; Tremetsberger et al. 2003b), *H. acaulis* (32,1%; Tremetsberger et al., 2003a), *H. palustris* (75%; Muellner et al. 2005) e *H. incana* (75%; Tremetsberger et al. 2009). Algumas destas, como as espécies andinas *H. palustris*, *H. acaulis* e *H. incana*, sofreram ação direta de alterações climáticas, ocorridas durante a última glaciação no Pleistoceno, que possivelmente influenciaram na diferenciação e estruturação das populações. O padrão característico de distribuição geográfica encontrado nas populações de *H. lutea* e *H. catharinensis* sugere que alterações climáticas extremas, tal como no período da última glaciação máxima ocorrida nos Andes não influenciaram na estrutura de populações destas espécies. Além disso, *Hypochaeris* é considerado um gênero jovem que passou processos de especiação por radiação adaptativa

rápida e recente na América do Sul. É então possível que a disponibilidade de ambientes favoráveis, a diversificação recente assim como, a facilidade de dispersão de sementes de *H. lutea* e *H. catharinensis* tenham contribuído para a ausência de fragmentos raros e ou fixados e influenciado para a fraca estruturação genética observada entre populações.

## CONCLUSÃO

As populações de *H. lutea* estão bem conservadas, conforme demonstram os elevados valores de porcentagem de locos polimórficos e diversidade genética intrapopulacional. Quando comparado com outras espécies de *Hypochoeris*, o valor de  $F_{ST}$  indica que *H. lutea* apresenta um padrão de distribuição genética característico de espécies de fecundação cruzada ou mista, porém predominantemente alógama. O nível de divergência entre as populações de *H. lutea* pode ser considerado de intermediário a alto, entretanto não há estruturação genética bem definida entre populações, provavelmente devido a um processo recente de diversificação. Dentro do grupo sul-americano de *Hypochoeris*, a espécie *H. catharinensis* mostra-se mais semelhante a *H. lutea* em termos de distribuição geográfica e estruturação genética de suas populações, o que corrobora os estudos filogenéticos e dados citogenéticos recentes também mostram a proximidade genética destas espécies.

## AGRADECIMENTOS

Agradecimentos pelo suporte financeiro ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, ao Austrian Science Foundation (FWF projetos P15225-BIO e P18446-BO3 para T.F. Stuessy), à Fundação BBVA (Banco Bilbao Vizcaya Argentaria) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão de bolsas aos alunos de Mestrado.

## REFERÊNCIAS

- Anderson MC (1993) An analysis of variability in seed settling velocities of several wind-dispersed Asteraceae. *American Journal of Botany* 80:487–492
- Arroyo MTK, Primack R, Armesto J, (1982) Community studies in pollination ecology in the high temperate andes of central Chile. I. Pollination mechanisms and altitudinal variation. *American Journal of Botany* 69:82-97
- Azevêdo-Gonçalves CFO, Matzenbacher NI, (2007) O Gênero *Hypochoeris* L. (*Asteraceae*) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Ser Bot* 62:55-87
- Barroso GM (1991) Sistemática de Angiosperma no Brasil. Subclasse VI: Asteridae, V. F, Viçosa, v.3, p 326
- Bortiri E (1999) Asteraceae, parte 14. Tribu XIII. Lactuceae. In: *Hypochoeris*. Flora Fanerogâmica Argentina. v. 63, pp 1-25
- Cabrera AL (1929) Compuestas Platenses. *Revista del centro estudiantes de agronomía y veterinária, Buenos Aires* 139:17-52
- Cavalli SS, Winge H (2003) Variabilidade genética em populações naturais. In: Freitas LB, Bered F (org.) *Genética e Evolução Vegetal*. Ed. UFRGS, Porto Alegre, pp165-175
- Coelho ASG (2001) Software: BOOD Versão 2.0 Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap, Versão 3.0. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144(4): 2001-2014
- Defillips RA (1976) *Hypochoeris*. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, (ed). *Flora Europaea*, Cambridge University Press, Cambridge 4:308-310
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15

- Eiterer M (2005) Estratégias Reprodutivas de Espécies co-ocorrentes de *Mikania* (Asteraceae). Dissertação, Universidade Federal de Viçosa
- 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
- Fiorin FG (2008) Estrutura Cariotípica de Duas Espécies de *Hypochaeris* (*H. catharinensis* e *H. lutea*), Asteraceae Endêmicas do Sul do Brasil. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina
- Garcia EM, Boldrini II, Jacques AVA (2000) Dinâmica de formas vitais de uma vegetação campestre sob diferentes práticas e exclusão. *Iheringia, Ser Bot Porto Alegre* 57(2):215-241
- Hamrick JL, Godt MJW (1989) Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, (ed) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Associates, Sunderland 43-63
- Hartl DL, Clark AG (2007) *Principles of population genetics*. 4 ed. Sunderland: Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts pp 652
- Holmes WC (1995) A review preparatory to an infrageneric classification of *Mikania* (Tribe:Eupatorieae). In: Pope GV (ed) *Advances in Compositae systematics*. London: The Royal Botanical Gardens, pp 239- 254
- Mani MS, Saravanan JM (1999) *Pollination ecology and evolution in Compositae (Asteraceae)*. New Hampshire: Science Publishers, Inc.
- Manly BFJ (1997) *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology*. London
- Mariette S, Corre VLE, Austerlitz F, Kremer A (2002) Sampling within the genome for measuring within population diversity: trade-offs between markers. *Molecular Ecology* 11:1145-1156
- Matzenbacher NI (1985) Levantamento florístico preliminar das Compostas da fazenda São Maximiano – Guaíba – RS – Brasil. *Comunicações do museu de Ciências da PUCRS, Ser Bot* (37):115-127

- Miller MP (1997) Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), Version 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population data. Computer software distributed by author
- Mra'z P, Gaudeul M, Rioux D, Gielly L, Choler P, Taberlet P, Consortium I (2007) Genetic structure of *Hypochaeris uniflora* (Asteraceae) suggests vicariance in the Carpathians and rapid pos-glacial colonization of the Alps from an eastern Alpine refugium. *Journal of Biogeography* 34:2100-2114
- Muellner AN, Tremetsberger K, Stuessy T, Baeza CM (2005) Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochaeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology* 14:203–212
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(12):3321-3323
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
- Noble CF, Mouga DMDS (2009) Estudo dos recursos florais das abelhas nativas ocorrentes em área de floresta de transição ombrófila densa para mista em Joinville/SC. *Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil*, 13 a 17 de Setembro de 2009, São Lourenço, pp1-4
- Oberprieler CA (2002) *Hypochaeris* L. In: Valdés B, Rejdali M, Achhal EL, Kadmiri A, Jury SL, Montserrat JM, (ed) *Catalogue des plantes vasculaires du Nord du Maroc*, incluant des clés d'identification Madrid. CSIC 2 :686-687
- Oberprieler C, Vogt R (2002) *Hypochaeris arachnoidea* Poir., a hitherto neglected species in NW Africa. *Willdenowia* 32 :231–236
- Ortiz MA, Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy TF, Garcia-Castano JL (2007) 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
- Ortiz MA, Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy TF, Terrab A, Garcia-Castano JL, Talavera S (2009) Phylogeographic patterns in *Hypochaeris* section *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae) of the western Mediterranean. *Journal of Biogeography* 36 :1384-1397

- Ouborg NJ, Piquot Y, van Groenendael JM (1999) Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87:551-568
- Piry S, Luikart G, Cornuet J (1999) A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered* 90:502-503
- Pyšek P (1997) Compositae as invaders: better than the others. *Preslia* 69: 9–22
- Ridley M. (2006) *Evolução*. 3 ed. Artmed, Porto Alegre, pp752
- Ruas CF, Vanzela ALL, Santos MO, Fregonezi JN, Ruas PM, Matzenbacher NI, Aguiar-Perecin MLR (2005) Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil. *Gen Mol Biology* 28:129-139
- Samuel R, Stuessy TF, Tremetsberger K, Baeza CM, Siljak-Yakovlev S (2003) Phylogenetic relationships among species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae) based on ITS, plastid trnL intron, trnL-F spacer and matK sequences. *Amer J Bot* 90:496–507
- Schluter PM, Harris SA (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 6:569-572
- Sebbenn AM (2001) Distribuição da Variação genética de populações de jequitibá-rosa [*Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze] por caracteres quantitativos e isoenzimas. Tese. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
- Sheldon JC, Burrows FM (1973) The dispersal effectiveness of the achene-pappus units of selected Compositae in steady winds with convection. *New Phytologist* 72:665–675
- Soons MB, Heil GW, Nathan R, Katul GG (2004) Determinants of long-distance seed dispersal by wind in grasslands. *Ecology* 85:3056–3068
- Stebbins GL (1971) *Chromosomal evolution in higher plants*. Edward Arnold, London
- Stuessy TF, Tremetsberger K, Müllner 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 *Hypochaeris* (Asteraceae). *Basic and Applied Ecology* 4:287–296

- Telles MPC, Valva FD, Bandeira LF, Coelho ASG (2003) Caracterização genética de populações naturais de araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. – Annonaceae) no estado de Goiás. *Revista Brasileira de Botânica* 26(1):123-129
- Terrab A, Ortiz MA, Talavera M, Ariza MJ, Moriana MC, Garría-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 *Hypochaeris angustifolia* (Asteraceae), sister taxon to all of the South American *Hypochaeris* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53:13-22
- Tremetsberger K, Stuessy TF, Samuel RM, Baeza CM, Fay MF (2003a) Genetics of colonization in *Hypochaeris tenuifolia* (Asteraceae, Lactuceae) on Volcán Lonquimay, Chile. *Molecular Ecology* 12:2649–2659
- Tremetsberger K, Stuessy TF, Guo YP, Baeza CM, Weiss H, Samuel RM (2003b) 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, 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). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 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
- Tremetsberger K, Urtubey E, Terrab A, Baeza CM, Ortiz MA, Talavera M, König C, Tensch EM, Kohl G, Talavera S, Stuessy TF (2009) Pleistocene refugia and polytopic replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and

Subantarctic plant *Hypochaeris incana* (Asteraceae, Cichorieae). *Mol Ecol* 18:3668-3682

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21):4.407-4.414

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

Yeh FC, Yang R, Boyle, TJ, Xiyun JM (2000) Pop Gene 32. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, v. 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

## REFERÊNCIAS

- Adams J (1991) Reproduction. In: Gamlim, L, Vines, G (ed) The evolution of life, Oxford University Press, New York, pp 235-248
- Anderson MC (1993) An analysis of variability in seed settling velocities of several wind-dispersed Asteraceae. *American Journal of Botany* 80:487–492
- Arroyo MTK, Primack R, Armesto J, (1982) Community studies in pollination ecology in the high temperate andes of central Chile. I. Pollination mechanisms and altitudinal variation. *American Journal of Botany* 69:82-97
- Azevêdo-Gonçalves CFO, Matzenbacher NI, (2007) O Gênero *Hypochaeris* L. (*Asteraceae*) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Ser Bot* 62:55-87
- Barbujani G (1987) Autocorrelation of gene frequencies under isolation-by-distance. *Genetics* 177:772-782
- Barrett SCH, Kohn JR (1991) Genetic an evolutionary consequences as small population size in plants: implications for conservation. In: Falk, DA, Holsinger, KE (ed) Genetics and conservation of rare plants, Oxford Univ. Press, New York pp 3-30
- Barroso GM (1991) Sistemática de Angiosperma no Brasil. Subclasse VI: Asteridae, V. F, Viçosa, v.3, p 326
- Bortiri E (1999) Asteraceae, parte 14. Tribu XIII. Lactuceae. In: *Hypochaeris*. Flora Fanerogâmica Argentina. v. 63, pp 1-25
- Boshier DH (2000) Mating systems. In: Young A, Boshier D, Boyle T (ed) Forest conservation genetics: principles and practice, CSIRO Publishing, Collingwood, pp63-79
- Boshier DH, Chase MR, Bawa KS (1995) Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae) a neotropical tree. 2. mating system. *American Journal of Botany* 82(4):476-483
- Botstein D, White R, Skolnick M, Davis R (1980) Construction of Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331

- Bremer K (1994) *Asteraceae – Cladistics & Classification*. Timber Press, Portland, pp752
- Broun P, Ganal MW, Tankley SD (1992) Telomeric arrays display high levels of heritable polymorphism among closely related plant varieties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:1353-1357
- Cabrera AL (1929) *Compuestas Platenses*. Revista del centro estudiantes de agronomía y veterinária, Buenos Aires 139:17-52
- Cabrera AL, Willink A (1980) *Biogeografía de América Latina*. O.E.A., Washington, DC.
- Cavalli SS, Winge H (2003) Variabilidade genética em populações naturais. In: Freitas LB, Bered F (org.) *Genética e Evolução Vegetal*. Ed. UFRGS, Porto Alegre, pp165-175
- Cerbah M, Coulaud J, Godelle B, 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 relationships in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). *J Heredity* 89: 312–318
- Cerbah M, Souza-Chies T, Jibier MF, Lejeune B, Siljak-Yakovlev S (1998b) Molecular phylogeny of the genus *Hypochoeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution. *Mol Biol Evol* 15:345–354
- Charlesworth D, Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu Rev Ecol Syst* 18:237-268
- Clegg MT (1980) Measuring plant mating systems. *Bioscience* 30(12):814-818
- Cockerham CC (1969) Variance of gene frequencies. *Evolution* 23:72-84
- Coelho ASG (2001) Software: BOOD Versão 2.0 Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap, Versão 3.0. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás

- Cole TC (2003) Genetic variation in rare and common plants. *Annu Rev Evol Syst* 34: 213-237
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144(4): 2001-2014
- Costa P, Pot D, Dubos C, Frigerio JM, Pionneau C, Odenes C, Bertocchi E, Cervera MT, Rmington DL, Plomion CA (2000) Genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100:39-48
- Crawford TJ (1984) What is a population? In: Shorrocks, B (ed.) *Evolutionary Ecology*. Oxford: Blackwell Sci., p.135-174
- Dallas JF (1998) Detection of DNA fingerprints of cultivated rice by hybridization with a human minissatélites DNA probe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:6831-6835
- Defillips RA (1976) *Hypochoeris*. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, (ed). *Flora Europaea*, Cambridge University Press, Cambridge 4:308-310
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15
- Eiterer M (2005) Estratégias Reprodutivas de Espécies co-ocorrentes de *Mikania* (Asteraceae). Dissertação, Universidade federal de Viçosa
- Epperson BK (1997) Gene dispersal and spatial genetic structure. *Evolution* 51:672-681
- Epperson BK (1990) Spatial patterns of genetic variation within plant populations. In: Brown, AHD, Clegg, MT, Kahler, AL, Weir, BS, (ed) *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sunderland: Sinauer pp229-253.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionay Bioinformatics* 1:47-50
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 3 ed pp220

- Fiorin FG (2008) Estrutura Cariotípica de Duas Espécies de *Hypochoeris* (*H. catharinensis* e *H. lutea*), Asteraceae Endêmicas do Sul do Brasil. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina
- Futuyma DJ (1992) Biologia evolutiva. FUNPEC-RP, Ribeirão Preto, 2 ed. pp 631
- Garcia EM, Boldrini II, Jacques AVA (2000) Dinâmica de formas vitais de uma vegetação campestre sob diferentes práticas e exclusão. Iheringia, Ser Bot Porto Alegre 57(2):215-241
- Gonzales E, Hamrick JL (2005) Distribution of genetic diversity among disjunct populations of the rare forest understory herb, *Trillium reliquum*. Heredity 95(4):306-314
- Grodzicker T, Williams J, Sharp P, Sambrook J (1974) Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology 39:439-446
- Hamrick JL (1982) Plant population genetics and evolution. American Journal of Botany 69(10):1685-1693
- Hamrick JL, Godt MJW (1989) Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, (ed) Plant population genetics, breeding and genetic resources. Sinauer Associates, Sunderland, 43-63
- Hamrick JL, Murawski EDA (1991) Levels of allozyme diversity in populations of uncommon neotropical tree species. Journal of tropical ecology 7:395-399
- Hamrick JL (1994) Genetic diversity and conservation in tropical forests. Proc. International Symposium on Genetic conservation and Production of Tropical forest Tree Seed. Asean-Canada. In Drysdale, RM, John, SET, Yopa, AC (ed) Forest Tree Centre pp1-9
- Hall P, Orrell LC, Bawa KS (1994) Genetic diversity and mating system in tropical tree, *Carapaga guianensis* (Meliaceae). American Journal of Botany 81(9):1104-1111
- Hartl DL, Clark AG (2007) Principles of population genetics. 4 ed. Sunderland: Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts pp 652
- Heywood JS (1991) Spatial analysis of genetic variation in plant populations. Annual Review of Ecology Systematic 22:335-355

- Hoffmann O (1891) Liguliflorae-Chichoriae. In: Engler A, Prantl K, (eds) Die Natürlichen Pflanzenfamilien. Leipzig. pp 350–387
- Hoffmann O (1893) *Hypochoeris* L. In: Engler A, Prantl K, (eds) Die natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten, insbesondere den Nutzpflanzen, Leipzig. pp 361–363
- Holmes WC (1995) A review preparatory to an infrageneric classification of *Mikania* (Tribe:Eupatorieae). In: Pope GV (ed) Advances in Compositae systematics. London. The Royal Botanical Gardens. pp 239- 254
- Kevin K, NG S, Lee, L, Koh L (2004) Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. *Molecular ecology* 13(5):657-669
- Kim SC, McGowen MR, Lubinsky P, Barber JC, Mort ME, Santos-Guerra A (2008) Timing and tempo of early and successive adaptive radiations in Macaronesia. - *PLoS ONE*. 3:e2139
- Lee S–L, Ng KK-S, Saw L-G, Norwati A, Salwana MHS, Lee C-T, Norwati M (2002) Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virginin Jungle reserves in Peninsular Malaysia. *American Journal of Botany* 89:447-459
- Luna R, Epperson BK, Oywama K (2005) Spatial genetic structure of two sympatric neotropical palms with contrasting life histories. *Heredity* 95(4):298-305
- Mani MS, Saravanan JM (1999) Pollination ecology and evolution in *Compositae* (*Asteraceae*). New Hampshire: Science Publishers, Inc.
- Manly BFJ (1997) Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology. London
- Mariette S, Corre VLE, Austerlitz F, Kremer A (2002) Sampling within the genome for measuring within population diversity: trade-offs between markers. *Molecular Ecology* 11:1145-1156
- Marquardt PE, Epperson BK (2004) Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. *Molecular Ecology* 13(11):3305-3315

- Matzenbacher NI (1985) Levantamento florístico preliminar das Compostas da fazenda São Maximiano – Guaíba – RS – Brasil. *Comunicações do museu de Ciências da PUCRS, Ser Bot* (37):115-127
- Miller MP (1997) Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), Version 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population data. Computer software distributed by author
- Moraes PLR, Monteiro R, Vencovsky R (1999) Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica* 22(2):237-248
- Mraz P, Gaudeul M, Rioux D, Gielly L, Choler P, Taberlet P, Consortium I (2007) Genetic structure of *Hypochaeris uniflora* (Asteraceae) suggests vicariance in the Carpathians and rapid pos-glacial colonization of the Alps from an eastern Alpine refugium. *Journal of Biogeography* 34:2100-2114
- Muellner AN, Tremetsberger K, Stuessy T, Baeza CM (2005) Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochaeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology* 14:203–212
- Mullis K, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymology* 55:335-350
- Murawski DA, Hamrick JL (1992) Mating system and phenology of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) in central Panama. *Journal of Heredity*. 83:401-404
- Nason JD, Aldrich PR, Hamrick JL (1997) Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. In; Laurence, WFE, Bierregaard JRO (ed) *Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities*. University of Chicago press, Chicago, pp 304-320
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(12):3321-3323
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 89:583-590

- Noble CF, Mouga DMDS (2009) Estudo dos recursos florais das abelhas nativas ocorrentes em área de floresta de transição ombrófila densa para mista em Joinville/SC. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, 13 a 17 de Setembro de 2009, São Lourenço, pp1-4
- Nybom H, Hall HK (1991) Minisatellite DNA fingerprints can distinguish *Rubus* and estimate their degree of relatedness. *Euphytica* 53:107-114
- Oberprieler CA (2002) *Hypochoeris* L. In: Valdés B, Rejdali M, Achhal EL, Kadmiri A, Jury SL, Montserrat JM, (ed) Catalogue des plantes vasculaires du Nord du Maroc, incluant des clés d'identification Madrid. CSIC 2 :686-687
- Oberprieler C, Vogt R (2002) *Hypochoeris arachnoidea* Poir., a hitherto neglected species in NW Africa. *Willdenowia* 32 :231–236
- 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
- Ortiz MA, Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy TF, Terrab A, Garcia-Castano JL, Talavera S (2009) Phylogeographic patterns in *Hypochoeris* section *Hypochoeris* (Asteraceae, Lactuceae) of the western Mediterranean. *Journal of Biogeography* 36 :1384-1397
- Ouborg NJ, Piquot Y, van Groenendael JM (1999) Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87:551-568
- Piry S, Luikart G, Cornuet J (1999) A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Hered* 90:502-503
- Pyšek P (1997) Compositae as invaders: better than the others. *Preslia* 69: 9–22.
- Ridley M. (2006) *Evolução*. 3 ed. Artmed, Porto Alegre, pp752
- Ruas CF, Ruas PM, Metzenbacher NI, Ross G, Bernini C, Vanzela ALL (1995) Cytogenetic studies of some *Hypochoeris* species (Compositae) from Brasil. *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

Samuel R, Stuessy TF, Tremetsberger K, Baeza CM, Siljak-Yakovlev S (2003) Phylogenetic relationships among species of *Hypochoeris* (Asteraceae, Lactuceae) based on ITS, plastid trnL intron, trnL-F spacer and matK sequences. *Amer J Bot* 90:496–507

Schluter PM, Harris SA (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 6:569-572

Sebbenn AM (2001) Distribuição da Variação genética de populações de jequitibá-rosa [*Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze] por caracteres quantitativos e isoenzimas. Tese, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

Sheldon JC, Burrows FM (1973) The dispersal effectiveness of the achene-pappus units of selected Compositae in steady winds with convection. *New Phytologist* 72:665–675

Silvertown JW, Doust JL (1993) Introduction to plant population biology. Oxford: Blackwell Sci. pp 210

Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:393-430

Slatkin M (1987) Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science* 236:787-792

Slatkin M, Arter HE (1991) Spatial autocorrelation methods in population genetics. *American Naturalist* 138:499-517

Sokal RR, Oden NL (1991) Spatial autocorrelation analysis as an inferential tool in population genetics. *American Naturalist* 138:518-521

Soons MB, Heil GW, Nathan R, Katul GG (2004) Determinants of long-distance seed dispersal by wind in grasslands. *Ecology* 85:3056–3068

Souza LMFI, Kageyama PY, Sebbenn AM (2003) Sistema de reprodução em população natural de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 26(1):113-121

- Stebbins GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, London
- Stuessy TF, Tremetsberger K, Müllner 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 *Hypochaeris* (Asteraceae). *Basic and Applied Ecology* 4:287–296
- Telles MPC, Valva FD, Bandeira LF, Coelho ASG (2003) Caracterização genética de populações naturais de aratincunzeiro (*Annona crassiflora* Mart. – Annonaceae) no estado de Goiás. *Revista Brasileira de Botânica* 26(1):123-129
- Terrab A, Ortiz MA, Talavera M, Ariza MJ, Moriana MC, Garría-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 *Hypochaeris angustifolia* (Asteraceae), sister taxon to all of the South American *Hypochaeris* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53:13-22
- Torggler MGF, Contel EPB, Torggler SP (1995) Isoenzimas: variabilidade genética em plantas. SBG, Ribeirão Preto pp186
- 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). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 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
- Tremetsberger K, Urtubey E, Terrab A, Baeza CM, Ortiz MA, Talavera M, König C, Temsch EM, Kohl G, Talavera S, Stuessy TF (2009) Pleistocene refugia and polytopic replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and Subantarctic plant *Hypochaeris incana* (Asteraceae, Cichorieae). *Mol Ecol* 18:3668-3682
- Vencovsky R (1992) Análise de variância de frequências alélicas. *Brazilian Journal of Genetics* 15:53-60
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21):4.407-4.414
- Weir BS (1996) *Genetics data analysis II: methods for discrete population genetic data*. Sunderland: Sinauer Associates pp 455
- 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, Tremetsberger K, Urtubey E, Valdebenito HA, Beck SG, Baeza CM (2007) Chromosome numbers and karyotypes of South American species and populations of *Hypochaeris* (Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 153:49–60
- 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
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28:114-138
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19(3):395-420
- Wyman AR, White R (1980) A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77:6754-6758

- Yeoh Y, Kang SS, Chung MG (1996) Evaluation of the natural monement populations of *Camellia japonica* (Theearaceae) in Korea based on allozyme studies. Botanical Bulletin of Academia Sinica 37:141-146
- Yeh FC, Yang R, Boyle,TJ, Xiyan JM (2000) Pop Gene 32. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, v. 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada
- Zhivotovsky LA (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. Molecular Ecology 8:907-913

## **ANEXOS**

## ANEXO A – Gel de Poliacrilamida

### *Soluções*

#### Solução A

32mL de TBE10X

216mL de água ultrapura.

#### Solução B – poliacrilamida (29:1) 40%

2,66g de Bis-acrilamida

77,34g de acrilamida

110mL de água ultrapura

Homogeneizar bem e completar o volume para 200mL

### *Preparo do gel 7%*

75mL

60mL de solução A

13,12mL de solução B

1mL de persulfato de Amônio 10%

70µl de TEMED

Homogeneizar rápido e verter no suporte de placas devidamente higienizadas.

## ANEXO B – Coloração com Nitrato de prata

### *Soluções*

Fixador – 1000mL

10 mL ácido acético

150 mL de álcool etílico

840 mL de água destilada

Revelador – 1000mL

30 gramas de Hidróxido de sódio (NaOH)

água destilada.