

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

***Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae): COMPOSIÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL, DIVERSIDADE E PARÂMETROS GENÉTICOS**

CAMILA MOREIRA BATISTA BELINI

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP- Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU - SP

Outubro/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

***Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae): COMPOSIÇÃO DO ÓLEO
ESSENCIAL, DIVERSIDADE E PARÂMETROS GENÉTICOS**

CAMILA MOREIRA BATISTA BELINI

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marcia Ortiz Mayo Marques

Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Glyn Mara Figueira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP- Campus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutor
em Agronomia (Horticultura).

BOTUCATU - SP

Outubro/2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Belini, Camila Moreira Batista, 1987-
B431b *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae): composição do óleo essencial, diversidade e parâmetros genéticos / Camila Moreira Batista Belini. - Botucatu : [s.n.], 2015
xii, 91 f. : fots. color., grafs. color., ils. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2015
Orientador: Marcia Ortiz Mayo Marques
Coorientador: Glyn Mara Figueira
Inclui bibliografia

1. Plantas medicinais. 2. Óleos vegetais - Composição. 3. Altitude - Influência. 4. Diversidade genética. I. Marques, Marcia Ortiz Mayo. II. Figueira, Glyn Mara. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

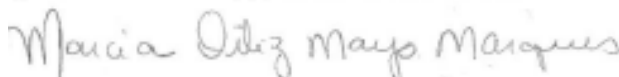
TÍTULO: *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae): COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL, DIVERSIDADE E PARÂMETROS GENÉTICOS”

AUTORA: CAMILA MOREIRA BATISTA BELINI

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. GLYN MARA FIGUEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos / Instituto Agronômico de Campinas



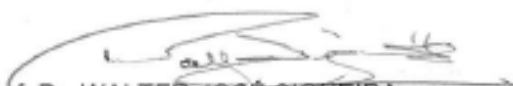
Prof. Dr. FILIPE PEREIRA GIARDINI BONFIM

Dep de Horticultura / Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu



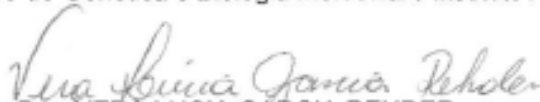
Prof. Dr. LUIZ FERNANDO ROLIM DE ALMEIDA

Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu



Prof. Dr. WALTER JOSÉ SIQUEIRA

Centro de Genética e Biologia Molecular / Instituto Agronômico de Campinas



Profa. Dra. VERA LUCIA GARCIA REHDER

Departamento de Cpqba/Unicamp - Paulínia/SP

DEDICO...

A Deus, Pai de amor por toda sustentação e auxílio.

“Cada novo dia é uma nova chance para ser melhor. Não melhor que os outros. Melhor que nós mesmos.”

Carlos Hilsdorf

OFEREÇO...

*À minha família Mami, Papito, Dan, Mu,
Amor e a nossa pequena Antonella.*

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, pela bolsa de doutorado e pelo financiamento da pesquisa concedidos (processos: 2013/05052-9 e 2012/14136-9),

Ao Programa de Pós Graduação em Horticultura da Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, pela oportunidade da realização do curso de Doutorado,

A Profª Drª Marcia Ortiz Mayo Marques, pela orientação, amizade, auxílio, paciência e confiança,

A Profª Drª Glyn Mara Figueira, pela coorientação, amizade, ensinamentos, conselhos e auxílio em todo desenvolvimento dessa pesquisa,

A pesquisadora Drª Maria Imaculada Zucchi, pela amizade, por todo auxílio na elaboração da pesquisa, principalmente da parte molecular e ensinamentos,

Ao pesquisador Dr. Alexandre Magno Sebbenn, pelo auxílio nas análises estatísticas do teste de procedências e progênies (TPP),

A Fatima pela amizade, apoio e quase todos os almoços,

Ao pessoal do laboratório de Genética da USP/ESALQ, em especial, Miklos, João e Jaki, pelos ensinamentos, paciência e auxílio,

Ao pessoal do laboratório de Biologia Molecular do CPQBA, em especial a Aline pela amizade e auxílio na formatação, a Camis pelo auxílio na parte de sementes e amizade e, a Thalita pela amizade,

Ao pessoal do laboratório do Barracão da Unicamp,

Ao pessoal do laboratório de Fitoquímica do IAC, em especial, Paulo, Cris e Dani,

Ao pesquisador Dr. Adilson, pelo auxílio nas análises químicas do TPP,

Aos funcionários do barracão do CPQBA por todo auxílio desde a semeadura até as colheitas do TPP,

As funcionárias da seção de pós-graduação,

Aos professores doutores que aceitaram compor a minha banca,

Ao Luis, meu amor, pelo apoio, companheirismo, paciência, exemplo, amor, dedicação, conselhos e por sempre estar ao meu lado,

Aos meus amados pais, Tania e Zezé por tudo desde o início e por participarem sempre da minha vida,

Aos meus irmãos Danilo e Murilo, por serem companheiros incondicionais e por todo amor,

Aos meus sogros, Helena e Beto, pelo apoio, amor e força,

A todos os amigos, familiares e profissionais que se fizeram presentes, meus agradecimentos.

SUMÁRIO		Página
LISTA DE TABELAS		VIII
LISTA DE FIGURAS		X
RESUMO		1
SUMMARY		3
1. INTRODUÇÃO		5
2. REVISÃO DE LITERATURA		8
2.1. <i>Baccharis dracunculifolia</i>		8
2.2. CONSERVAÇÃO GENÉTICA DAS SEMENTES		9
2.3. MARCADOR MOLECULAR MICROSSATÉLITES		11
2.4. ESTUDOS GENÉTICOS EM GRADIENTES ALTITUDINAIS		12
2.5. TESTES DE PROGÊNIES E PROCEDÊNCIAS E PROGÊNIES		13
2.6. ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis dracunculifolia</i>		14
3. MATERIAL E MÉTODOS		16
3.1. MATERIAIS VEGETAIS		16
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DO TESTE PROCEDÊNCIAS E PROGÊNIES DE <i>BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA</i>		16
3.3. TESTES DE SEMENTES		20
3.4. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA		21
3.5. CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA GENÔMICA ENRIQUECIDA COM SSR		22
3.6. SELEÇÃO, SEQUENCIAMENTO DOS CLONES POSITIVOS E DESENHO DE PRIMERS		23
3.7. CARACTERIZAÇÃO E GENOTIPAGEM DOS MICROSSATÉLITES ...		24
3.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS MICROSSATÉLITES		25
3.9. ÓLEOS ESSENCIAIS DAS POPULAÇÕES NATURAIS		27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO		29
4.1. TESTE DE PROGÊNIES (TP)		29
4.1.1. Rendimento e produtividade de óleo essencial do TP		29
4.1.2. Caracterização química do óleo essencial do TP		30
4.1.3. Capacidade de rebrota do TP		33

4.2. TESTES DE SEMENTES	35
4.2.1. Triagem das cipselas.....	35
4.2.2. Peso de mil sementes	36
4.2.3. Teor de umidade	36
4.2.4. Redução da umidade das cipselas.....	37
4.2.5. Testes de germinação.....	38
4.3. CONSERVAÇÃO E DIVERSIDADE DAS POPULAÇÕES NATURAIS	45
4.3.1 Avaliação da qualidade e quantidade de DNA	45
4.3.1.1. Seleção, sequenciamento dos clones positivos e desenho de <i>primers</i>	45
4.3.2 Variabilidade genética	48
4.3.3 Estrutura populacional	54
4.4. ÓLEO ESSENCIAL DAS POPULAÇÕES NATURAIS	62
4.4.1 Rendimento dos óleos essenciais das populações naturais.....	62
4.4.2 Caracterização da composição química dos óleos essenciais das populações naturais	63
5. CONCLUSÕES	75
6. REFERÊNCIAS	76
7. APÊNDICE	90

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1. Cronograma das coletas dos materiais vegetais utilizados para cada experimento.	16
Tabela 2. Composição química em porcentagem relativa média do óleo essencial da parte aérea de <i>B. dracunculifolia</i> das 60 progênies, Campinas-SP.	32
Tabela 3. Anova da concentração de <i>trans</i> -nerolidol (mg/mL) entre as procedências de Campos do Jordão, Campinas e Ubatuba.	33
Tabela 4. Concentração média de <i>trans</i> -nerolidol entre as procedências de Campos do Jordão, Campinas e Ubatuba pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.	33
Tabela 5. Análise de variância para o caráter massa fresca para procedências de Campinas, Ubatuba e Campos do Jordão de <i>B. dracunculifolia</i> , em Campinas-SP.	34
Tabela 6. Componentes de variância (REML) para o caráter massa fresca para procedências de Campinas, Ubatuba e Campos do Jordão de <i>B. dracunculifolia</i> , em Campinas-SP.	35
Tabela 7. Ganho esperado com a seleção para massa fresca em teste de procedências e progênies de <i>B. dracunculifolia</i> em Campinas-SP.	35
Tabela 8. Valores de massa das amostras para cálculo do teor de umidade das cipselas do lote bruto, 2013.	36
Tabela 9. Valores de massa das amostras para cálculo do teor de umidade das cipselas do lote puro, 2013.	37
Tabela 10. Marcadores SSR sintetizados, com os respectivos motivos, amplitude alélica (SR), porcentagem de CG e classificação do motivo.	47
Tabela 11. Heterozigosidade esperada (H_E) por loco e por população de <i>B. dracunculifolia</i>	51
Tabela 12. Heterozigosidade observada (H_O) por loco e por população de <i>B. dracunculifolia</i>	53
Tabela 13. Coeficiente de endogamia (F_{IS}) por loco e por população de <i>B. dracunculifolia</i>	54
Tabela 14. Estimativa das estatísticas F de Weir e Cockerham, e R_{ST} nas três populações de <i>B. dracunculifolia</i>	55
Tabela 15. Matriz de F_{ST} par a par entre as três populações de <i>B. dracunculifolia</i> analisadas.	55

Tabela 16. <i>p</i> -valor do Teste Exato de Fisher para verificação de aderência ao EHW por loco e por população. $\alpha = 0,0005$ (correção de Bonferroni sobre 99 combinações). Valores com asterisco são os locos que aderem às proporções esperadas. NA indica que os respectivos locos são monomórficos	56
Tabela 17. Teste de algoritmo de Brookfield (1996) para os locos nas populações de <i>B. dracunculifolia</i> para verificar presença de alelos nulos.	57
Tabela 18. Composição química (%) do óleo essencial da parte aérea de <i>B. dracunculifolia</i> das populações naturais de Campinas, Campos do Jordão e Ubatuba coletadas nos anos de 2012 e 2013, Estado de São Paulo.....	65
Tabela 19. Composição química média (%) do óleo essencial da parte aérea de <i>B. dracunculifolia</i> das populações naturais de Campinas, Campos do Jordão e Ubatuba coletadas nos anos de 2012 e 2013, Estado de São Paulo.	68
Tabela 20. Divergência química interpopulacional da PCA, sob o ponto de vista qualitativo.....	72

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estruturas químicas das principais substâncias do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> , Campinas-SP.....	15
Figura 2. Teste de procedências e progênies de <i>B. dracunculifolia</i> , Campinas-SP.	17
Figura 3. Curva de calibração da concentração de <i>trans</i> -nerolidol ($\mu\text{g/mL}$) das 60 progênies, Campinas-SP.....	18
Figura 4. Perfil de gel obtido pelo sistema de eletroforese LICOR, correspondente ao loco Bd 06 na população de Campinas de <i>B. dracunculifolia</i> , Campinas-SP.....	25
Figura 5. Rendimento de óleo essencial das progênies do teste de procedências e progênies de <i>B. dracunculifolia</i> , Campinas-SP.....	30
Figura 6. Produtividade em $\text{kg}/1000 \text{ m}^2$ para as populações de Campinas, Ubatuba e Campos do Jordão de <i>B. dracunculifolia</i> , Campinas-SP.....	30
Figura 7. Percentual de germinação de cipselas de <i>B. dracunculifolia</i> em diferentes substratos e temperaturas. Letras diferentes sobre as barras das médias diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey, Campinas-SP.	38
Figura 8. Percentual de germinação de cipselas de <i>B. dracunculifolia</i> em diferentes temperaturas e fotoperíodo e médias comparadas pelo teste Tukey. As médias seguidas pela mesma letra, sobre as barras das médias, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, Campinas-SP.	40
Figura 9. Percentual de germinação de cipselas de <i>B. dracunculifolia</i> por 3, 6 e 9 meses de armazenamento sob temperatura de $6 \text{ }^\circ\text{C}$, em substrato de mudas e em gerbox. As médias seguidas pela mesma letra, sobre as barras das médias, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, Campinas-SP.	41
Figura 10. Percentual de germinação de cipselas de <i>B. dracunculifolia</i> das populações naturais de Campos do Jordão, Campinas e Ubatuba em gerbox e substrato de mudas. As	

médias seguidas pela mesma letra, sobre as barras das médias, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, Campinas-SP.	42
Figura 11. Percentual de germinação de cipselas de <i>B. dracunculifolia</i> das populações de Campos do Jordão e CPQBA em substrato de mudas e gerbox em resistência a dessecação. Letras diferentes sobre as barras das médias diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, Campinas-SP.	43
Figura 12. Índice de velocidade de emergência das plântulas de <i>B. dracunculifolia</i> das populações naturais. As médias seguidas pela mesma letra, sobre as barras das médias, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, Campinas-SP.	43
Figura 13. Perfil eletroforético dos DNAs genômicos extraídos de tecidos foliares de <i>B. dracunculifolia</i> . As quatro primeiras canaletas de cada gel apresentam um padrão de concentração de DNA conhecido (λ DNA USB), Campinas-SP.	45
Figura 14. Distribuição das frequências alélicas para os 11 locos SSR, estimados para 278 indivíduos de <i>B. dracunculifolia</i> . O eixo y indica a frequência alélica e o x o número do alelo. J: Campos do Jordão; U: Ubatuba e C: Campinas, Campinas-SP.	48
Figura 15. Número de alelos em cada população pelo número de indivíduos por população, Campinas-SP.	49
Figura 16. Riqueza alélica (R) dos 11 locos nas três populações de <i>B. dracunculifolia</i> , Campinas-SP.	50
Figura 17. Intervalo de confiança a 95% das médias populacionais de <i>B. dracunculifolia</i> de heterozigosidade esperada (H_E), Campinas-SP.	51
Figura 18. Intervalo de confiança a 95% das médias populacionais de <i>B. dracunculifolia</i> de heterozigosidade esperada (H_E), Campinas-SP.	53
Figura 19. Intervalo de confiança a 95% das médias populacionais de <i>B. dracunculifolia</i> de coeficiente de endogamia (F_{IS}).	54
Figura 20. Delta K de Evanno (Evanno et al., 2005) que indica que $K = 2$ acomoda melhor os dados, Campinas-SP.	58
Figura 21. 1-3 Campos do Jordão, 4-6 Ubatuba; 7-9 Campinas. Análise bayesiana de agrupamento utilizando genótipos multilocos (Evanno et al., 2005), admitindo admixture model, contendo 2 populações ($k=2$), demonstradas pelas respectivas cores. As subpopulações são representadas por linhas verticais coloridas. A mesma cor em subpopulações diferentes indica que elas pertencem ao mesmo cluster, Campinas-SP.	58

Figura 22. Análise das coordenadas principais (PCoA) de três populações de <i>B. dracunculifolia</i> indicando que as diferentes cores são conjuntos genéticos específicos, Campinas-SP.	59
Figura 23. Padrão de divergência genética entre 3 populações <i>B. dracunculifolia</i> , definido pelo agrupamento UPGMA, com base na distância genética de Nei (1978). Coeficiente de correlação cofenética = 0,96, Campinas-SP.	60
Figura 24. Correlograma de Mantel das distâncias geográficas e genéticas das três populações naturais de <i>B. dracunculifolia</i> . Correlação matricial de Pearson = 0,65, Campinas-SP.	61
Figura 25. Rendimento de óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> das populações naturais de Ubatuba, Campinas-SP.	62
Figura 26. Rendimento de óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> das populações naturais de Campinas 2012 e 2013, Campinas-SP.	63
Figura 27. Rendimento de óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> da população natural de Campos do Jordão, Campinas-SP.	63
Figura 28 A-B. Dispersão das seis populações de <i>Baccharis dracunculifolia</i> em três grupos pela PCA A. Dispersão dos três componentes principais da PCA, espécimes de populações naturais de Campinas, Ubatuba e Campos do Jordão B.	71
Figura 29 A-B. Centroides das funções discriminantes para caracterização química do óleo essencial das seis populações de <i>B. dracunculifolia</i> A, Diagrama vetorial exibindo as correlações negativas e positivas das 50 variáveis do primeiro e segundo fator oriundo da Análise Discriminante Linear B.	73

RESUMO

A espécie *Baccharis dracunculifolia* pode ser utilizada na recuperação de áreas degradadas e antropizadas por atividades agrícolas além de proporcionar diversos benefícios à saúde, todavia não existem bancos de germoplasma de sementes e mudas para atender a esta demanda, o que poderá acarretar na exploração inadequada da espécie como aconteceu à *Baccharis trimera*. Dentro desse contexto, a finalidade deste trabalho é a de fornecer subsídios para a exploração sustentada da espécie, bem como, o desenvolvimento do melhoramento genético para produção de óleo essencial e para a formação de um banco de germoplasma de sementes com ampla variabilidade genética.

Os materiais vegetais utilizados para este estudo foram divididos em dois grupos, foram coletadas, num gradiente altitudinal, plantas de populações naturais em Campos do Jordão, Ubatuba, e Campinas. Encontrou-se 56 constituintes na composição do óleo essencial, extraído por hidrodestilação, das populações naturais estudadas nos anos de 2012 e 2013, sendo, somente, oito constituintes comuns a todas as populações, o composto *trans*-nerolidol foi a substância majoritária para todas as populações (variando de 21,6 a 40,8%), Essas populações estão bem estruturadas quimicamente sugerindo que há a influência da altitude, em especial para os compostos químicos das populações de Campos do Jordão. No outro grupo, foi um teste de procedências e progênies instalado no CPQBA/UNICAMP, no qual se avaliou a produtividade de óleo essencial extraído por destilação por arraste a vapor d'água e massa fresca de da parte aérea para as estimativas de parâmetros genéticos, o rendimento variou de 0,1% a 0,3% e, não foram observadas diferenças significativas entre as médias. A produtividade do óleo essencial em

kg/1000 m², em média, variou de 13 para a população de Campinas a 15 para a população de Ubatuba. A característica de massa fresca, em média, das progênies, foi superior para a população de Campinas (1,6 kg), seguida de Ubatuba e de Campos do Jordão (1,5 kg), entretanto não diferiram estatisticamente entre si. As populações naturais foram genotipadas com 11 locos SSR que possibilitaram a caracterização de duas estruturas populacionais sendo Campos do Jordão, a maior altitude, a mais diversa.

Baccharis dracunculifolia DC. (Asteraceae): COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL, DIVERSIDADE E PARÂMETROS GENÉTICOS. Botucatu, 2015. 91p. Tese (Doutorado em Agronomia/Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: CAMILA MOREIRA BATISTA BELINI

Adviser: MARCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Co Adviser: GLYN MARA FIGUEIRA

SUMMARY

The *Baccharis dracunculifolia* species can be used in the recovery of deforested areas and disturbed by agricultural activities in addition to providing many health benefits, but there are no germplasm collections of seeds and seedlings to meet this demand, which may result in inadequate exploitation of the species as it happened to *Baccharis trimera*. In this context, the purpose of this work is to provide subsidies for the sustainable exploitation of the species, as well as the development of genetic improvement for essential oil production and the formation of a germplasm bank of seeds with wide genetic variability.

The plant materials used for this study were divided into two groups, were collected in an altitudinal gradient, plant natural populations in Campos do Jordão, Ubatuba, and Campinas. 56 constituents were found in the essential oil composition, extracted by hydrodistillation, natural populations studied in the years 2012 and 2013, with only eight constituents common to all populations, the *trans*-nerolidol compound was the major substance for all populations (ranging from 21.6 to 40.8%), These populations are well structured chemically suggesting that there is the influence of altitude, especially for the chemical compounds of the population of Campos do Jordão. In the other group, it was a test provenances and progenies installed in CPQBA/UNICAMP, in which it evaluated the essential oil yield extracted by distillation by steam distillation of water and fresh mass of shoots for the estimation of genetic parameters, the yield ranged from 0.1% to 0.3%, and no significant differences were observed between the averages. The yield of essential oil kg/1000 m² on average, ranged from 13 to the population of Campinas 15 for the population of Ubatuba. The characteristic of weight, on average, the progeny was higher for the population of Campinas (1.6 kg), followed by Ubatuba

for the population of Campinas (1.6 kg), followed by Ubatuba and Campos do Jordão (1.5 kg), though not statistically different. Natural populations were genotyped with 11 SSR loci that enabled the characterization of two population structures being Campos do Jordao, the highest altitude, the most diverse.

Keywords: *Baccharis dracunculifolia*, essential oil, genetic parameters, altitude.

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Baccharis dracunculifolia* DC. pertence à família Asteraceae que, segundo Heywood (1993), possui 1.100 gêneros e 25.000 espécies, sendo que as plantas podem possuir aspectos distintos, desde pequenas ervas e arbustos à árvores. Popularmente é conhecida como alecrim, alecrim-do-campo, vassourinha-do-campo, alecrim-de-vassoura ou vassoura, trata-se de um arbusto lenhoso, de crescimento rápido, podendo medir até 4,0 m de altura, apresenta folhas alternas, espiraladas, capítulos numerosos com fruto-semente tipo cipsela. (FERREIRA et al., 2009). Ocorre nas Regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil (NAKAJIMA et al., 2015). A espécie possui potencial para ser utilizada na recuperação de áreas degradadas, é usual como planta ornamental e principalmente na medicina caseira para combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica (CARNEIRO e FERNANDES, 1996; JARVIS et al., 1991; MORS et al., 2000; SILVA JÚNIOR, 1997). Além disso, o óleo essencial extraído das folhas de alecrim-do-campo é de alto valor para a indústria de fragrâncias (MOLT e TRKA, 1983) e é a principal fonte botânica para produção de própolis verde no sudeste brasileiro (PARK et al., 2004).

Apesar da crescente procura nos mercados interno e externo por plantas medicinais brasileiras, a matéria-prima não chega ao mercado com a qualidade, na quantidade e regularidade necessárias devido à falta de informações técnicas para os extratores, manejadores, agricultores e indústria. Além disso, existe aumento crescente da demanda de sementes de *B. dracunculifolia* para a produção de mudas destinadas a recuperação de áreas degradadas, alteradas e para o cultivo, dada a importância dos seus

produtos. Contudo, não existe produção de sementes de qualidade para atender esta demanda.

Para que isto ocorra é necessário primeiramente avaliar a germinação das sementes, o que é feito pela metodologia do teste de germinação, padronizada e descrita nas Regras para Análise de Sementes-RAS (BRASIL, 2009), onde se encontram os parâmetros do teste de germinação para as espécies agrícolas e muitas outras espécies de valor comercial. Todavia, a RAS não trás as condições para o teste de germinação de sementes de muitas espécies, como é o caso da *B. dracunculifolia*. Assim, são necessários estudos que estabeleçam os parâmetros para o teste de germinação que garantam a qualidade e viabilidade das sementes visando também à formação de banco de germoplasma dos genótipos selecionados.

Segundo Valois et al. (1996), um banco de germoplasma é a base física do conhecimento genético, que se constitui no conjunto de materiais hereditários de uma espécie. Como estratégia para conservação de espécies, os bancos de germoplasma de sementes e em campo que constituem uma forma de conservação *ex situ* podem ser alternativas potenciais.

Por essas razões se faz necessário estudos que auxiliem na seleção a partir da diversidade genética de populações. Assim, os marcadores moleculares estão sendo veementemente empregados para a obtenção de resultados que possuem qualidade e repetibilidade comprovadas, fornecendo dados que possibilitam o estudo da variabilidade genética em plantas (RAJORA e MOSSELLER, 2001).

Em particular, os microssatélites têm recebido muita atenção em estudos de biologia da conservação, dado que investigações em espécies raras são frequentemente limitadas pela perda de marcadores genéticos variáveis (GOLDSTEIN e SCHLÖTTERER, 1999). As vantagens do uso de marcadores de microssatélite para a análise da variabilidade genética resume-se basicamente em: codominância, especificidade e alta informatividade (estimada como conteúdo de informação polimórfica, como diversidade genética ou como heterozigosidade esperada). Os ganhos genéticos adicionais exigirão, cada vez mais, um melhor conhecimento da biologia das espécies, bem como, da resposta à seleção ao nível genotípico, ou seja, molecular (SOUZA, 2001).

Alguns fatores ambientais podem afetar a expressão fenotípica devendo ser estudados e considerados em programas de melhoramento de plantas, como

por exemplo, a altitude. Estudos recentes abordam a importância da altitude na diversidade genética, estrutura espacial, tamanho populacional de espécies endêmicas e fluxo gênico de populações naturais de plantas (STEINBAUER et al, 2013; MELO et al., 2014).

Além disso, também é importante o conhecimento da biologia, do manejo de espécies de plantas nativas, pois muitas destas espécies possuem potencial para à recuperação de áreas degradadas e programas de conservação (MONTEIRO e RAMOS, 1997).

Assim, este trabalho teve por objetivo fornecer subsídios para a conservação e manejo sustentável da espécie, para seus usos medicinal e aromático, bem como, o melhoramento genético, visando à produção de óleo essencial de interesse comercial e a formação de banco de germoplasma de *Baccharis dracunculifolia* DC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Baccharis dracunculifolia*

Baccharis é um importante gênero pertencente à família Asteraceae que é o grupo sistemático mais numeroso das angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. Também é de competência da tribo Asteraceae e possui aproximadamente 500 espécies distribuídas todas no continente americano, das quais aproximadamente 120 ocorrem no sudoeste do Brasil (BUDEL et al., 2005).

Baccharis dracunculifolia DC. é popularmente conhecida como alecrim, alecrim-do-campo, vassourinha-do-campo, alecrim-de-vassoura ou vassourinha, ocorre espontaneamente no Brasil, Paraguai, Argentina, Uruguai e é encontrada também nos altos vales da Bolívia, chegando até 3.280 m de altitude (CASSEL et al., 2000), sendo considerada importante pela população local por seus usos na medicina tradicional (LOAYZA et al., 1995). Trata-se de um arbusto lenhoso de crescimento rápido, podendo medir até 4,0 m de altura, no Brasil ocorre nas Regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul (NAKAJIMA et al., 2015).

Esta espécie é dioica, se reproduz por sementes (cipselas), com caules bastante ramificados e densamente povoados por tricomas (BASTOS, 2001), possui folhas lanceoladas, membranáceas, uninérvias, com 1 a 2 cm de comprimento e 3 a 4 mm de largura, densamente pontuadas de glândulas, com margens inteiras, 1 a 3 denteadas, raramente apresentando entre 5 e 7 dentes. Possui flor feminina com corola de 2 a 3 mm de comprimento e flor masculina com corola de 2,5 a 3 mm de comprimento. A planta já foi muito utilizada na confecção de vassouras rústicas, de onde vem um de seus nomes

populares, é usual como planta ornamental e na medicina caseira para combater, principalmente, distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica (CARNEIRO e FERNANDES, 1996; JARVIS et al., 1991; MORS et al., 2000). Além disso, o óleo essencial extraído das folhas de alecrim-do-campo é de alto valor para a indústria de fragrâncias (MOLT e TRKA, 1983) e é a principal fonte botânica para produção de própolis verde no sudeste brasileiro (PARK et al., 2004). A espécie é pioneira e tem importância destacada na regeneração natural após distúrbios como fogo (TABARELLI e MANTOVANI, 1999; GALINDEZ et al., 2009). Apresenta ainda plasticidade fenotípica, quando colocada em locais de alta fertilidade, atinge ótimos níveis de crescimento e quando submetida a solos com baixa disponibilidade de nutrientes, possui sobrevivência alta (NEGREIROS et al. 2014). Também, apresenta ampla distribuição em biótopos urbanos sujeitos a vários graus de distúrbios antrópicos e de poluição atmosférica, está associada a uma grande diversidade de outros organismos (RODARTE et al. 1998, ARAÚJO et al. 2003). Caracteriza-se como planta exclusora, restringindo o acúmulo de arsênio em suas raízes, sendo de interesse para técnicas de fito estabilização, podendo ser aplicada para revegetação de locais contaminados, pois conseguem promover uma estabilização mecânica do poluente por meio da sua imobilização no sistema radicular, auxiliando outras espécies a colonizar e sobreviver, da mesma forma que evita erosão e previne o transporte do poluente por processos de lixiviação (GILBERTI, 2012).

2.2. Conservação genética das sementes

À medida que os estudos científicos avançam na comprovação das propriedades medicinais de uma determinada espécie de uso terapêutico popular, favorece a sua comercialização e, não havendo um sistema produtivo adequado para atender a demanda, aumenta-se o extrativismo inadequado, acarretando em muitas perdas. As espécies nativas, em estado selvagem, apresentam grande variabilidade genética que se expressa em diversos parâmetros, incluindo os teores de princípios ativos. Se isto prejudica a utilização imediata dos benefícios terapêuticos em maior escala, por outro lado, representa a possibilidade de seleção de genótipos superiores e a padronização da matéria prima em melhores níveis. A técnica para a conservação em longo prazo de espécies vegetais visa à preservação da variabilidade genética.

Deste modo, o conhecimento a respeito do manejo e formas de avaliação da qualidade e viabilidade fisiológica da semente é essencial para viabilização de

estudos na área genética em bancos de germoplasma. Os Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs) são uma alternativa para a conservação dos recursos genéticos vegetais. O armazenamento de sementes constitui uma forma segura e econômica de conservação da diversidade genética vegetal e, no caso de espécies florestais, representa uma estratégia para suprir a demanda contínua de mudas para fins comerciais, reflorestamentos e recomposição de áreas degradadas. Para o armazenamento eficiente das sementes, sua qualidade deve ser mantida pelo maior período possível, o que depende do conhecimento prévio de seu comportamento durante o armazenamento (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000).

Dependendo da maior ou menor tolerância à dessecação e ao armazenamento sob baixas temperaturas, as sementes podem ser classificadas em ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias. As sementes ortodoxas mantêm por mais tempo a qualidade fisiológica quando armazenadas com baixos teores de água e sob baixas temperaturas, uma vez que elevados teores de água nas sementes tendem a acelerar o processo de deterioração das mesmas em razão da intensificação da atividade respiratória, consumo de reservas, liberação de calor e proliferação de microrganismos. As sementes recalcitrantes, por outro lado, caracterizam-se por não sofrerem dessecação natural na planta-mãe ao longo do processo de maturação, sendo dispersas com elevados teores de água que, se reduzidos a um nível considerado crítico, levarão à rápida perda da viabilidade e até à morte. Como forma de manter a viabilidade de sementes ortodoxas por longos períodos de armazenamento, pode-se submetê-las à secagem até teores de água em torno de 5% e armazená-las em embalagens herméticas, sob baixa temperatura. As sementes recalcitrantes, por outro lado, perdem a viabilidade quando sofrem redução nos teores de água em níveis inferiores a 30% e representam um desafio para o armazenamento em longo prazo (MEDEIROS e EIRA, 2006; CARVALHO et al. 2006).

A conservação das sementes em bancos de germoplasma e a manutenção da qualidade fisiológica ao longo do tempo são fundamentais. Para garantir que isso ocorra, as sementes são armazenadas sob baixas temperatura e umidade relativa do ar, acondicionadas em embalagens herméticas, com baixos teores de água. Tais condições são facilmente aplicáveis no caso das sementes ortodoxas, que incluem a maioria das espécies cultivadas, e que podem ser mantidas sob essas condições por muitos anos (MEDEIROS; EIRA, 2006; CARVALHO et al. 2006).

Para que isto ocorra é necessário primeiramente testar essas sementes, o que é feito de acordo com a metodologia do teste de germinação, descrita nas Regras para Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009), na qual estão listadas espécies agrícolas e muitas outras espécies de valor comercial, todavia esta metodologia não é conhecida para a *B. dracunculifolia*, sendo necessários estudos que estabeleçam técnicas para quantificar a qualidade e viabilidade das cipselas.

2.3. Marcador Molecular Microsatélites

O melhoramento genético é relativamente lento, pois necessita de vários ciclos de recombinação, avaliação e seleção, e os problemas como suscetibilidade a pragas e doenças, arquitetura da planta, ou introgressão de genes de interesse, levam anos para serem solucionados (SOUZA, 2001).

Ferramentas moleculares baseadas na identificação direta de variações úteis do DNA fornecem novas oportunidades para a manipulação genética da ou das características desejadas. Os ganhos genéticos adicionais exigirão, cada vez mais, melhor conhecimento da biologia das espécies, bem como, da resposta à seleção ao nível genotípico, ou seja, molecular (SOUZA, 2001). Tais ferramentas moleculares são definidas como marcadores genéticos, que são quaisquer características, processos bioquímicos ou fragmentos de DNA que permitem distinção de indivíduos geneticamente diferentes (BORÉM, 1998). Segundo Souza (2001), qualquer forma alélica originada de um genoma que pode ser utilizada como marcador genético, podendo ser esta um dado fenótipo, uma proteína ou um fragmento de DNA que codifica ou não um gene, possuindo sequência repetida ou única no genoma. Os marcadores genéticos podem ser fenotípicos, o que correspondem ao produto de expressão de um ou mais genes, podendo ser influenciados pelo ambiente e/ou pela ação de outros genes e também moleculares, denominados de marcadores genômicos ou genotípicos e detectam o polimorfismo diretamente ao nível do DNA, sem qualquer tipo de influência ambiental ou gênica.

Os marcadores moleculares surgiram como grande contribuição ao desenvolvimento das técnicas moleculares que permitem a análise do genoma (SOUZA, 2001). A partir deles é possível analisar cada genótipo de interesse, fornecendo informações relativas à variabilidade existente; resolver questões de identificação de genótipos ou genes específicos, visando, por exemplo, a proteção varietal ou investigações

de paternidade em sistemas de polinização aberta; e associação entre marcadores moleculares e características fenotípicas (SOUZA, 2001; KIRST et al., 2005).

Os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*, conhecidos também como locos microssatélites) são repetições de sequências di, tri, tetra ou penta nucleotídicas, comuns nos genomas de eucariotos, muito empregados como marcadores codominantes em plantas (TÓTH et al., 2000). São muito úteis quando o intuito é diferenciar genótipos de materiais muito similares, devido a sua alta frequência de heterozigosidade e sua característica multialélica, propiciando discriminação mais precisa (KIRST et al., 2005). Segundo Grattapaglia (2001) a grande desvantagem do marcador baseado em SSR é o custo relativamente alto e a necessidade de conhecimento e infraestrutura em biologia molecular para o desenvolvimento de sequências específicas de *primers*. Apesar disso, o elevado custo é facilmente recompensado pela ampla gama de potencialidades de pesquisa e desenvolvimento que se abrem ao se possuir tal tecnologia para uma determinada espécie.

2.4. Estudos Genéticos em gradientes altitudinais

Estudos recentes abordam a influência da altitude na diversidade genética de habitat, estrutura espacial, tamanho populacional de espécies endêmicas e fluxo gênico de populações naturais de plantas (STEINBAUER et al, 2013; MELO et al., 2015). Segundo Melo et al. (2015) possivelmente áreas que estão mais elevadas correm menos risco de exploração, mantendo altos índices de diversidade genética e densidade populacional. Eles estudaram populações de *Cabrlea canjerana* que, em elevadas altitudes, apresentaram maior quantidade de indivíduos jovens e adultos por hectare, os quais ainda preservaram elevados níveis de diversidade genética.

Populações menores em geral têm aumento das taxas de endocruzamento, o que pode trazer sérias consequências às populações comprometidas, tais como fixação de alelos deletérios e depressão endogâmica (HERRERA e BAZAGA, 2010).

Shi et al. (2011) estudando *Castanopsis eyrei*, obtiveram resultados indicando maior fluxo gênico entre níveis de elevação semelhantes do que entre diferentes níveis, sugerindo uma influência seletiva de elevação sobre a distribuição da diversidade genética. Wei et al. (2013) encontraram que o fluxo gênico foi maior entre populações de elevações semelhantes.

Habitats que se diferenciam em gradientes altitudinais podem ser considerados repositórios de variabilidade genética, sendo de suma importância a conservação legal dessas áreas como estratégia de conservação de populações naturais.

2.5. Testes de Progênes e Procedências e Progênes

Os testes ou ensaios de progênes representam uma das mais úteis ferramentas para o melhorista (KAGEYAMA, 1980). São formados a partir de sementes advindas tanto de árvores de polinização livre como de cruzamentos controlados. Os testes de progênes propiciam a manutenção de amostras representativas de populações, que após a caracterização genética, podem estar disponíveis ao melhoramento genético. Representando assim, alternativas à conservação genética de populações, possibilitando estimar estrutura genética de populações e selecionar indivíduos superiores como fonte de produção de sementes (KAGEYAMA, 1980; SHIMIZU et al., 1982).

Nos experimentos genéticos florestais, os testes de progênes de polinização livre são os mais utilizados para estimar parâmetros genéticos. Suas vantagens em comparação aos testes de progênes de polinização controlada são os custos menores, além de atenderem aos objetivos de determinação da capacidade geral de combinação (SHIMIZU et al., 1982; SAMPAIO et al., 2000).

Já os testes de procedências e progênes são ensaios que se baseiam no princípio de que populações que ocorrem em diferentes condições ecológicas tenham características adaptativas diversas, apresentando assim, variações em sua constituição genética e no seu comportamento (SEBBENN; ZANATTO; MORAIS, 2002; SEBBENN et al., 2003).

Ao se plantar no mesmo local esses indivíduos obtidos de várias populações, é possível estimar a variação de características existentes entre as progênes (mudas originárias da mesma planta mãe) e entre as procedências (populações).

Em programas de melhoramento florestal, esses testes são amplamente empregados, pois permitem determinar qual é a origem das sementes mais produtivas, quais se adaptam melhor em dada região, e conseqüentemente, geram informações úteis para a definição da estratégia mais adequada para o cultivo e conservação da espécie (ETTORI et al., 2004).

2.6. Óleo Essencial de *Baccharis dracunculifolia*

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* tem sido avaliado em diversos estudos em aplicações farmacológicas. Kloppel et al. (2007) e Massignani et al. (2009) obtiveram resultados satisfatórios para a atividade antiulcerogênica, Florão et al. (2012) para atividade anti-inflamatória. Ferronato et al. (2007) avaliaram a capacidade antibacteriana desse óleo em cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e obtiveram resultados satisfatórios. Parreira et al. (2010) detectaram eficiência apenas contra formas promastigotas de *Leishmania donovani* e em ensaios antiesquistossomicidas. A capacidade antibacteriana foi avaliada por Galvão et al. (2012) que, constataram eficácia desse óleo sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

O óleo essencial também, pelo seu aroma exótico, pode ser utilizado pela indústria de cosméticos. A sua importância comercial reside nos teores de *trans*-nerolidol (Figura 1-1) e espatulenol (Figura 1-2), normalmente encontrados como componentes principais em óleos essenciais obtidos com a utilização de processos de hidrodestilação (CASSEL et al., 2000; FABIANE et al. 2008; FERRACINI et al., 1995; FRIZZO et al., 2008). Óleos essenciais com baixas concentrações de *trans*-nerolidol e espatulenol são considerados de baixa qualidade e não são aceitos por algumas farmacopeias (WAGNER e BLADT, 1995).

Entre os terpenoides, destacam-se os mono e sesquiterpenoides por apresentarem diversas funções nos vegetais, como atração de polinizadores, proteção contra herbívoros e a agentes microbianos, proteção a danos oxidativos, fotorrespiração às altas temperaturas e baixas concentrações de O₂ e alelopatia (OWEN, 2005).

O espatulenol é um sesquiterpeno que apresenta atividade biológica importante com propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica (LIMBERGER et al., 2004).

O *trans*-nerolidol, também um sesquiterpênico presente nos óleos essenciais de diversas plantas, foi aceito nos Estados Unidos da América, pela agência reguladora Food and Drug Administration (FDA), como agente flavorizante utilizado em alimentos (ARRUDA et al., 2005). Representa um composto de grande interesse da indústria de perfumes por ser um fixador natural, de suma importância na composição dos perfumes. Esse composto apresenta propriedade antineoplásica, antimalárica (ARRUDA,

2005; MACEDO et al., 2002) e antileishmania causada pelo *Leishmania amazonensis* (ARRUDA et al., 2005).

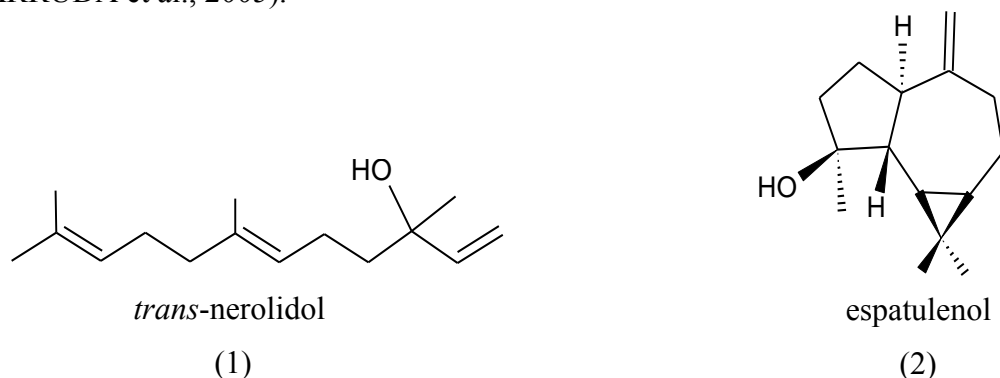


Figura 1. Estruturas químicas das principais substâncias do óleo essencial de *B. dracunculifolia*, Campinas-SP.

Outros sesquiterpenos como β -cariofileno, β -selineno, globulol, viridiflorol e α -cadinol, também já foram relatados como substâncias majoritárias em óleos essenciais de *B. dracunculifolia* (FERRACINI et al., 1995; AGOSTINI et al., 2005). Os óleos essenciais de espécies do gênero *Baccharis* estão passíveis a muitas variações em suas composições, pois estão relacionadas a fatores climáticos e outros fatores ambientais, ou seja, tanto o metabolismo primário quanto o especializado são influenciados por diversos fatores, como por exemplo, a variação dos estádios fenológicos ao longo de elevação de altitude (SHI et al., 2011). O manejo, a temperatura, a umidade relativa do ar, a exposição ao sol, os ventos, entre outros também exercem influência direta e indireta na composição e rendimento, especialmente em espécies que possuem estruturas superficiais que armazenam e produzem óleos essenciais (BRUNETON, 1995). Há ainda, diferentes órgãos de uma mesma planta que podem produzir óleos essenciais com composição química, caracteres físico-químicos e odores discrepantes (SIMÕES e SPITZER, 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais vegetais

Tabela 1. Cronograma das coletas dos materiais vegetais utilizados para cada experimento.

Local de coleta	Altitude (m)	Sementes	Folhas Populações	Parte aérea Populações
		Teste de progênies e germinação e vigor	naturais Molecular	naturais Química
Ubatuba	02	20/04/2013	15/05/2012	26/06/2012; 25/06/2013
Campinas	680	11/05/2013	14/05/2012	25/06/2012; 26/06/2013
Campos do Jordão	1620	23/02/2013	16/05/2012	27/06/2012; 27/06/2013

Para a realização da pesquisa foi obtida autorização de acesso ao patrimônio genético pelo processo de nº 010152/2013-0 no CNPq.

3.2. Delineamento experimental do teste procedências e progênies de *Baccharis dracunculifolia*

Foram coletadas sementes de 20 progênies de *B. dracunculifolia* em um gradiente altitudinal na Mata Atlântica do estado de São Paulo, Campos do Jordão (1620 m), Campinas (680 m) e Ubatuba (02 m). As sementes foram triadas e semeadas.

As mudas foram propagadas, em julho de 2013, por sementes e mantidas em bandejas de poliestireno expandido com 200 células, com substrato de formulação comercial, denominada pelo fabricante como GII (Gioplanta®).

As mudas permaneceram em telado com sombreamento de 70% no CPQBA-UNICAMP - localizado em Paulínia, SP, na latitude 22° 48'S e longitude 47° 07'O, a 669 m de altitude, solo tipo latossolo vermelho escuro argiloso. Estas foram transferidas para local definitivo em novembro com sistema de irrigação por aspersão localizado (Figura 2). O delineamento experimental do teste de procedências e progênies é o de blocos casualizados com 20 progênies de cada procedência, trinta blocos e uma planta por parcela, no espaçamento de 1,5 x 1 m e bordadura externa de duas linhas. As plantas de 1 a 20 são de Campinas, 21 a 40 de Ubatuba e 41 a 60, de Campos do Jordão.



Figura 2. Teste de procedências e progênies de *B. dracunculifolia*, Campinas-SP.

A colheita foi realizada na segunda quinzena de setembro de 2014 (após 10 meses do plantio) para análise de variância da produtividade de óleo essencial e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa Assistat 7.7 beta (SILVA e AZEVEDO, 2002). Em seguida, foram colocadas em estufa, somente em circulação de ar. As extrações do óleo essencial iniciaram no fim de setembro, por meio da destilação por arraste a vapor d'água por uma 1 h e 30 min, em escala piloto.

Posteriormente, os óleos essenciais das 60 progênies foram armazenados em frascos de vidro âmbar de 50 mL e mantidos no freezer até a análise da composição química. As análises da composição química dos óleos essenciais e as análises de quantificação de *trans*-nerolidol foram conduzidas no CPQBA da Unicamp na Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Agilent, HP-5975), operando a 70 eV, injetor split 1/30, dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 um), hélio como gás de arraste (1 mL/min.), injetor a 220°C, detector a 250 °C e o seguinte programa de temperatura: 60°C – 240 °C, 3°C/minuto e injetado 1 µL da amostra.

O padrão de nerolidol utilizado foi o da Sigma Aldrich[®] (mistura de 40,50% de *cis*-nerolidol e 59,50% de *trans*-nerolidol; 154,80 mg de nerolidol/25 mL de metanol) e calculou-se as concentrações das 60 progênies das três procedências por meio da curva de calibração do referido padrão (Figura 3).

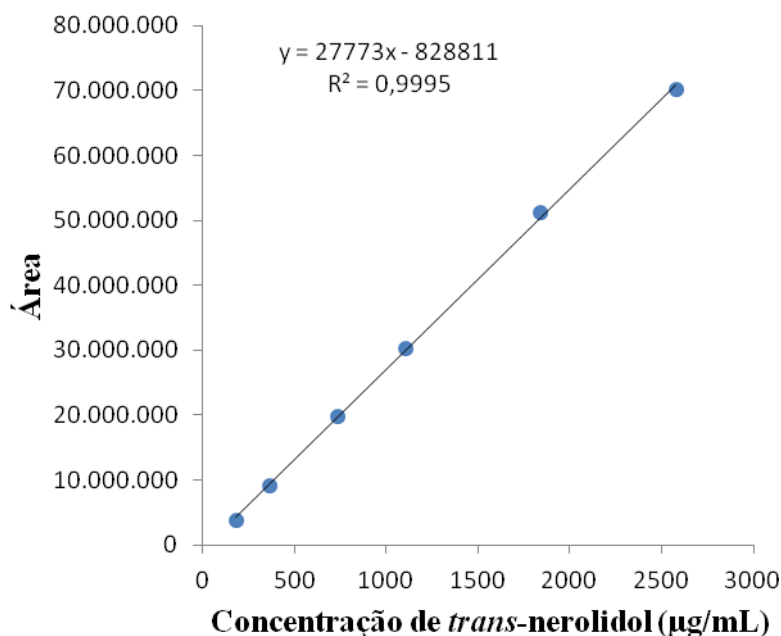


Figura 3. Curva de calibração da concentração de *trans*-nerolidol (µg/mL) das 60 progênies, Campinas-SP.

A identificação dos constituintes químicos foi efetuada pela análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema CGEM (Nist 5.lib) cálculo do índice de retenção e literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção (IR) das substâncias foram obtidos pela injeção de uma série homóloga de n-alcenos (C₈-C₂₂ Sigma – Aldrich, 99%), aplicando-se a equação de Van Den Dool e Kratz (1963). A análise estatística para a comparação das médias da concentração e a linha de tendência entre área e a concentração de nerolidol entre as populações foram realizadas pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade, pelo programa Assistat 7.7 beta (SILVA e AZEVEDO, 2002).

Em janeiro de 2015 foram coletadas as partes aéreas da rebrota de cada progênie e a pesagem da massa foi realizada no momento da colheita, por duas balanças Toledo[®] para estimarem estatisticamente os parâmetros genéticos do teste para a capacidade de rebrota.

As análises da variância foram conduzidas utilizando-se o método REML (Restricted Maximun Likelihood) para as estimativas dos componentes da

variância. O procedimento REML do programa estatístico SAS (SAS, 1999) foi utilizado para encontrar os componentes da variância pelo modelo de máxima verossimilhança restrita, combinado com o comando VARCOMP. Para a análise de variância e estimativa de componentes de variância foi adotado o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = m + b_i + t_j + f_{jk} + (tb)_{ij} + (fb)_{ijk} + e_{ijkl},$$

em que, Y_{ijkl} é o valor fenotípico do l -ésimo indivíduo da k -ésima progênie da j -ésima procedência na i -ésima repetição; m é o termo fixo da média geral; b_i é o efeito aleatório da i -ésima repetição; t_j é o efeito fixo da j -ésima procedência; f_{jk} é o efeito aleatório da k -ésima progênie na j -ésima procedência; $(tb)_{ij}$ é o efeito da interação entre a j -ésima procedência e a i -ésima repetição; $(fb)_{ijk}$ é o efeito da interação entre a k -ésima progênie da j -ésima procedência na i -ésima repetição, e e_{ijkl} é o efeito da l -ésima planta dentro da k -ésima progênie da j -ésima procedência na i -ésima repetição. Este último termo inclui os efeitos do erro dentro; $i = 1 \dots b$ (b é o número de repetições, no caso blocos); $j = 1 \dots t$ (t é o número de procedências); $k = 1 \dots f$ (f é o número de progênies dentro de procedência); $l = 1 \dots n$ (n é o número de plantas por progênie). Com exceção da média e do efeito de procedências, todos os outros efeitos serão assumidos como aleatórios. Da análise de variância foram decompostos os componentes de variância: $\sigma_{p(p)}^2$ = variância genética entre progênies dentro de procedência; σ_e^2 = variância da interação entre blocos e progênies dentro de procedência (variância ambiental), e σ_d^2 = variância fenotípica dentro de progênies.

O cálculo da variância genética, das herdabilidades e dos ganhos esperados na seleção seguiram Namkoong (1979). A variância genética aditiva (σ_A^2) foi estimada por: $\hat{\sigma}_A^2 = \hat{\sigma}_p^2 / \hat{r}_{xy}$. O termo refere-se à covariância genética entre plantas dentro de progênies, a qual foi estimada com base em Ritland (1989), utilizando-se dados de marcadores genéticos. A variância fenotípica total (σ_F^2) foi estimada por: $\hat{\sigma}_F^2 = \hat{\sigma}_d^2 + \hat{\sigma}_e^2 + \hat{\sigma}_{p(p)}^2$. O coeficiente de variação genética (CVg) foi estimado por:

$$CV_g = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_{p(p)}^2}}{\bar{x}} \times 100,$$

em que \bar{x} , é a média do caráter. Os coeficientes de herdabilidade em nível de plantas individuais (h^2_i), média de progênies (h^2_m) e dentro de progênies (h^2_d) foram estimados por:

$$\hat{h}_i^2 = \frac{\hat{\sigma}_A^2}{\hat{\sigma}_F^2}; \quad \hat{h}_m^2 = \frac{\hat{\sigma}_{p(p)}^2}{\frac{\hat{\sigma}_d^2}{nb} + \frac{\hat{\sigma}_e^2}{b} + \hat{\sigma}_{p(p)}^2}; \quad \hat{h}_d^2 = \frac{(1 - \hat{r}_{xy})\hat{\sigma}_A^2}{\hat{\sigma}_d^2},$$

A resposta à seleção foi estimada objetivando a seleção entre e dentro de procedência e progênies para a formação de um pomar de sementes por mudas.

A resposta entre e dentro de progênies (R_{ed}) foi calculada por:

$$\hat{R}_{ed} = i_e \hat{\sigma}_F \hat{h}_m^2 + i_d \hat{\sigma}_d \hat{h}_d^2,$$

em que, i_e e i_d são as intensidades de seleção em unidade de desvio-padrão aplicada entre e dentro de progênies e σ_F e σ_d são os desvios-padrão da variância fenotípica total e dentro de progênies. A resposta à seleção em porcentagem [$R(\%)$] foi estimada por:

$$\hat{R}(\%) = \frac{\hat{R}_{ed}}{\bar{x}} \times 100$$

em que, \bar{x} é a média do caráter.

3.3. Testes de sementes

Os ramos colhidos com sementes foram acondicionados em sacos de papel e secos em estufa a 40 °C durante 72 horas. Após esse período, os ramos foram armazenados em dessecador com sílica gel. Por não haver indicação nas regras de análises de sementes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009) para *B. dracunculifolia*, foram realizados testes das cipselas com diferentes substratos (papel, substrato para mudas e vermiculita) e diferentes condições de temperatura (15°C, 20°C e 25°C) e fotoperíodo (12 h luz/12 h escuro, luz constante e escuro constante) para fixar condições adequadas de experimento e as cipselas utilizadas foram as recém-coletadas provenientes do lote de julho/2012 – CPQBA.

Após analisado os resultados obtidos, as cipselas foram submetidas ao teste de germinação em caixas tipo gerbox, sob duas folhas de papel de filtro umedecidas com solução de nistatina 500 U.I./L (GOMES e FERNANDES, 2002). Os gerbox foram lavados com solução de hipoclorito 2,5% e o papel foi autoclavado. Em

todos os tratamentos foram utilizados quatro repetições com 25 cipselas cada (MEYER et al., 1997).

O número de cipselas germinadas foi verificado diariamente. Como critério de germinação, foi avaliada a emergência da radícula através do tegumento da semente (LUCAS e ARRIGONI, 1992).

As porcentagens de germinação em diferentes temperaturas e substrato das sementes de *B. dracunculifolia* foram submetidas à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. O índice de velocidade de emergência da radícula (IVE) foi calculado para cipselas recém-coletadas das populações naturais de acordo com a seguinte fórmula (MAGUIRE, 1962), onde:

$$IVE = N_1/D_1 + N_2/D_2 + \dots + N_n/D_n$$

N_1 = número de cipselas germinadas no primeiro dia de contagem; N_2 = número de cipselas germinadas no segundo dia de contagem; N_n = número de cipselas germinadas no enésimo dia de contagem; D_1 = primeiro dia de contagem; D_2 = segundo dia de contagem; D_n = enésimo dia de contagem. Após calcular o IVE, os dados foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (ZAR, 1999). A relação entre o número total de cipselas germinadas das populações naturais e o IVE foram verificados através de análise de regressão (ZAR, 1999), utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

3.4. Extração e quantificação de DNA

A amostra foi constituída de 105 indivíduos por local, sendo três subpopulações naturais de 35 indivíduos cada, evitou-se coletar indivíduos muito próximos, no sentido de explorar maior extensão possível das áreas de coleta e evitar sobreposições de gerações. Foram coletadas folhas jovens e saudáveis, armazenadas individualmente em sacos plásticos e armazenadas a -80 e a -20°C. Para cada população foram registrados individualmente os dados de latitude e longitude em um gradiente altitudinal da Mata Atlântica no estado de São Paulo (Apêndice 2). As plantas coletadas de cada local foram depositadas no Herbário do Instituto Agronômico de Campinas e obtiveram os seguintes *vouchers*: IAC – 54.955 de Campos do Jordão, IAC 54.956 de Ubatuba e IAC 54.957 de Campinas.

As análises de extração e quantificação do DNA dos tecidos foliares coletados foram feitas no Laboratório de Biologia Molecular da Divisão de

Agrotecnologia do CPQBA-UNICAMP. Utilizou-se para a extração mais ou menos 1,5 g de tecido foliar, utilizando o protocolo MATAB adaptado (RISTERUCCI et al., 2000). Dos 315 indivíduos utilizados para as extrações de DNA, obteve-se êxito em todos eles. Para verificar a qualidade dos DNAs extraídos, usou-se 1 µL por amostra de Blue green® e empregou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose 1%, em TBE 1X (Tris 28 mM, ácido bórico 88 mM, EDTA 7 mM, pH 8,3).

As quantificações foram realizadas pela técnica de eletroforese, onde cada banda de DNA genômico das amostras foi comparada com bandas de DNA de concentrações conhecidas (36,64; 54,96; 91,6; 109,92 ng/µL), por meio da utilização de DNA do fago (λ USB).

3.5. Construção de biblioteca genômica enriquecida com SSR

A construção da biblioteca genômica enriquecida com microssatélites foi realizada em janeiro de 2013 pelo curso prático e teórico: Construção de Bibliotecas Enriquecidas em Microssatélites para Estudos Genéticos em Eucariotos, oferecido pela Professora Dra. Anete Pereira de Souza e Dra. Maria Imaculada Zucchi, no Laboratório de Análise Genética e Molecular CBMEG, da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Seguiu-se o protocolo descrito por Billotte et al. 1999, com modificações, e otimizado pelo pesquisador Angie-Marie Risterruci, do CIRAD/França.

Restrição do DNA: 5,0 µg de DNA genômico foi digerido utilizando 6,0 µL enzima RsaI, adicionando-se na reação 8,0 µL de tampão de reação, 10,0 µL de espermidina e água estéril até 100 µL. O material foi incubado a 37 °C por 16 horas.

Ligação dos adaptadores: Para a ligação dos adaptadores utilizou-se 10 µM do adaptador Rsa21 e Rsa 25, 1,0 µg do DNA genômico digerido, 10,00 µL do tampão 5X, 4,0 µL de T4 DNA ligase e água estéril para completar 40,0 µL. Esta reação foi incubada a 20 °C por 2 horas.

Pré-Amplificação: Após a ligação os fragmentos foram amplificados utilizando 3 µL do produto da ligação; 20 µM do primer Rsa21; 5 µL de tampão 10 X; 2,0 mM MgCl₂; 200 mM de dNTP e 3 U de Taq polimerase.

Seleção dos fragmentos contendo SSR: Os fragmentos contendo sequências ricas em GA/CT, AT/TA e CA/GT foram selecionados por meio de hibridização com sonda biotilada, biotIII(CT)₁₀, biotIII(TA)₁₀ e biot III(GT)₁₀ e

recuperados com estreptavidina ligadas a “beads” magnéticas utilizando o kit Streptavidine-Magnisphere da Promega[®].

Amplificação dos fragmentos selecionados: Após a seleção dos fragmentos ricos com microssatélites estes foram amplificados utilizando 3 µL do produto da ligação; 20 µM do primer Rsa21; 5 µL de tampão 10 X; 2,0 mM MgCl₂; 200 mM de dNTP e 3 U de Taq polimerase.

Clonagem em vetor pGEM-T e transformação em células super-competentes: Após a amplificação dos fragmentos foram ligados em vetor pGEM-T e transformados em XL1-Blue SuperCompetent. As colônias de bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB e incubadas a 37 °C.

Amplificação dos clones e transferência para membrana: amplificados 3 µL do produto da ligação; 20 µM do primer Rsa21; 5 µL de tampão 10 X; 2,0 mM MgCl₂; 400 mM de dNTP; 3 U de Taq polimerase. Após a amplificação os fragmentos foram separados em gel de agarose 1,5% e realizou-se a transferência para membrana Hybond H+. A hibridação foi realizada com sondas complementares aos motivos selecionados, ou seja, sondas com motivos (GA)₁₀, (AT)₁₀ e (CA)₁₀.

3.6. Seleção, sequenciamento dos clones positivos e desenho de primers

Depois de feitas as hibridizações com sondas complementares, os fragmentos contendo clones positivos para SSR foram extraídos e os plasmídeos sequenciados por ABI 3500xL Genetic Analyzer. Foi realizada uma reação com 2 µL de Tampão Save Money, 0,5 µL de Primer, 0,4 µL de Big Dye, 4 µL de DNA e água MilliQ para completar 10 µL.

A partir do sequenciamento do DNA da biblioteca foram desenhados os *primers* que amplificaram os microssatélites. Para isso todos os fragmentos foram analisados usando os programas *BioEdit* (para transformar as sequências no modo de leitura apropriado), *WebSat* (para detectar a presença das repetições em tandem), *VecScreen* (para procurar os adaptadores), *Primer3* (para desenho do conjunto de primer que fará a amplificação do microssatélite), *Chromas 2* (para avaliar a qualidade do sequenciamento nas regiões dos *primers* e dos microssatélites) e *GeneRunner* (para analisar quão bons são os *primers* obtidos quanto a probabilidade de ocorrerem conformações secundárias).

3.7. Caracterização e genotipagem dos microssatélites

Os marcadores SSR sintetizados para o presente estudo foram inicialmente testados em diferentes temperaturas de anelamento, diferentes concentrações de DNA e reagentes, utilizando três genótipos representantes de cada população, para obter a melhor condição de amplificação dos fragmentos desejados. Os ciclos de amplificação foram feitos no termociclador PTC-100 (MJ Research, Watertown, Massachusetts) e foram realizadas num volume total de 10 μ L contendo: 1 μ L de DNA a 0,5 ng; 0,10 μ L de cada iniciador (Forward + Reverse a 10 mM); 0,1 μ L (10 mM) de cauda marcada com o fluoróforo IRDye 700 ou IRDye 800 (LICOR Biosciences); 0,4 μ L de dNTP (2,5 mM); 0,75 μ L de tampão 1x de PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,9]); 0,8 μ L de albumina do soro bovino (BSA, 2,5 μ M), 0,3 μ L de $MgCl_2$ (50 mM) e 0,6 μ L somente para o *primer* Bd 09 e, 0,4 μ L de tampão da enzima *Taq* DNA polimerase (75 mM Tris-HCl; 20 mM $(NH_4)_2SO_4$ pH8,8; 0,01% (v/v) Tween 20). Os locos Bd 06, Bd 13, Bd 16, Bd 17 e Bd 26, foram amplificados por meio da programação *touchdown*: 94 °C por 40 s para desnaturação, 94 °C por 4 min seguido de 10 ciclos de 94 °C for 45 s, temperatura de anelamento de 55 °C a 53 °C (-0.5 °C por ciclo), 72°C por 1min para extensão dos fragmentos pela *Taq* polimerase, seguido de 24 ciclos a 94 °C for 45 s, 72 °C por 1 min 15 s e um ciclo de extensão final de 72 °C por 5 min. Já para os locos Bd 09, Bd 14, Bd 17, Bd 19, Bd 04M, Bd 06M, Bd 10M foi utilizado temperatura fixa de anelamento de 55 °C. Na extremidade 5' do iniciador *forward* de cada loco foi adicionada uma cauda M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC) complementar às sondas. Os produtos de amplificações foram separados em condições desnaturantes em gel de poliacrilamida a 5% (v/v) em sequenciador automático (LI-COR 4300S DNA Analysis System; LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA). Os locos foram genotipados utilizando o software Saga (LI -COR Biosciences). A leitura de dos géis obtidos ocorre após emissão dos sinais decorrentes da incidência do raio laser sobre os diferentes IRDyes presentes nos *primers*. Estes sinais são convertidos na forma de eletroferogramas na imagem do próprio gel (Figura 4).

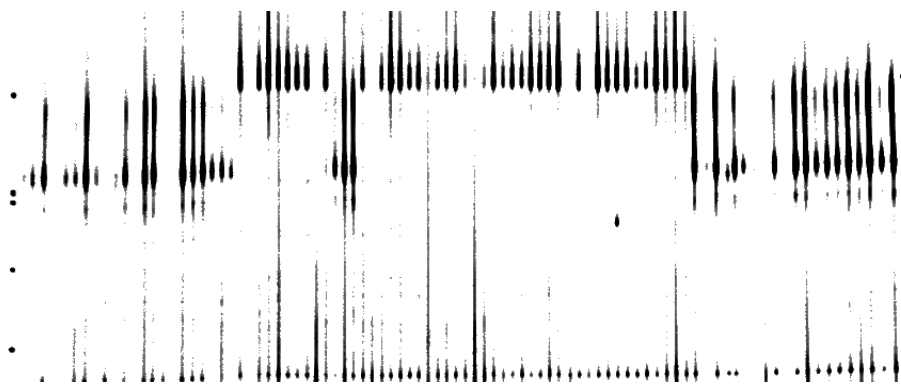


Figura 4. Perfil de gel obtido pelo sistema de eletroforese LICOR, correspondente ao loco Bd 06 na população de Campinas de *B. dracunculifolia*, Campinas-SP.

3.8. Análises estatísticas dos microssatélites

As frequências alélicas, o número de alelos por loco (A), a heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E), de cada loco foram calculados com o pacote PopGenReport (GRUBER e ADAMACK, 2015) implementado para o software R (R CORE TEAM, 2015). Os intervalos de confiança a 95% das estimativas populacionais de H_E , H_O e Riqueza Alélica foram obtidos através de reamostragens por 1000 *bootstraps* pelo pacote PopGenKit (PAQUETTE, 2012) também disponível para o software R (R CORE TEAM, 2015). Nos marcadores microssatélites, o processo mutacional pode não ser compatível com o modelo de alelos infinitos. Por essa razão, foi utilizada, além do F_{ST} (WRIGHT, 1931), uma estatística análoga, denominada de R_{st} (SLATKIN, 1995), desenvolvida especificamente para dados de microssatélites.

As estatísticas F de Wright, utilizando f e θ como estimadores de F_{IS} e F_{ST} , respectivamente (WEIR e COCKERHAM, 1984) e o R_{ST} foram determinadas utilizando o pacote hierfstat (GOUDET, 2014). Os intervalos de confiança foram obtidos por meio de 1000 reamostragens *bootstrap*.

O teste exato foi feito para verificar se as populações aderem às proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e para a detecção de desequilíbrio de ligação (DL), feito com base em permutações através do programa GENEPOP v. 3.1 (RAYMOND e ROUSSET, 1995), segundo Guo e Thompson (1992), mediante o algoritmo da cadeia de Monte Carlo Markov (100 *batches*, 5000 interações). Foi aplicada a correção de Bonferroni (HOLM, 1979) ajustando-se o nível nominal de significância (0,05%) ao número de testes aplicados.

A estruturação da variabilidade foi visualizada através de dendrogramas construídos a partir da matriz de distâncias genéticas sem viés de Nei (1978) com auxílio do pacote adegenet (JOMBART et al., 2015), pelo critério de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (SNEATH e SOKAL, 1973). A estabilidade dos agrupamentos foi testada através de 10.000 reamostragens bootstrap utilizando o pacote poppr (KAMVAR et al., 2015). O valor do coeficiente de correlação cofenética (r) foi calculado através de um teste de Mantel com 1000 permutações no NTSYS (ROHLF et al., 1989) com o objetivo de estimar quanto da matriz original foi explicada pelo dendrograma obtido.

A estrutura genética da população foi avaliada também pelo programa STRUCTURE versão 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003) a fim de definir o número de grupos (K) mais provável nas amostras, através de métodos bayesianos, não necessitando de informações hierárquicas *a priori* para fazer um teste de atribuição dos genótipos. O programa foi configurado para admitir mistura de genomas, frequências correlacionadas, número de grupos (K) variando de 1 a 10, 500.000 *burn-in* e 10^6 interações, repetidos 20 vezes. Para determinar qual o K mais provável em relação aos 10 testados, foi utilizada a estatística descrita por Evanno et al. (2005), baseada na taxa de mudança na probabilidade das repetições dos dados entre os sucessivos valores de K . O valor de K que melhor representa a estruturação das populações pode ser identificado pelo pico no valor de ΔK .

Como cada corrida independente do software STRUCTURE gera efeitos estocásticos, é particularmente importante considerar todas as informações dos dados replicados. O programa CLUMPP (JAKOBSSON e ROSENBERG 2007) foi utilizado para recolher todos os dados gerados nas 20 repetições em uma matriz (Q -matriz) de adesão dos coeficientes individuais e de cada das três populações pré-definidas (Campinas, Campos do Jordão e Ubatuba). Para a representação gráfica dos clusters da estrutura populacional das amostras do estudo foi utilizado o programa DISTRUCT (ROSENBERG, 2004).

Além disso, aplicou-se duas metodologias de análise exploratória com o intuito de verificar como a diversidade genética nas populações está estruturada. A primeira foi à análise de coordenadas principais e a segunda foi a análise de discriminantes de componentes principais. Para isto, foram utilizados os pacotes PopGenReport (GRUBER e ADAMACK, 2015) e adegenet (JOMBART et al., 2015).

Com a finalidade de avaliar os padrões de variação espacial, foi obtida a estimativa do coeficiente de correlação de Pearson (r) entre matrizes de distâncias genéticas calculadas a partir do índice de similaridade de Jaccard e as distâncias geográficas entre as populações. A significância desta correlação matricial foi testada pela estatística Z de Mantel, utilizando 9999 permutações aleatórias pelo pacote `mpmcorrelogram` (MATESANZ et al., 2011) utilizando o software R (R CORE TEAM, 2015).

3.9. Óleos essenciais das populações naturais

Para extração dos óleos essenciais, após as colheitas das populações naturais, que foram realizadas no inverno de 2012 e 2013, as folhas e os ramos foram colocados para secar em estufa com circulação de ar e temperatura controlada de 40°C por 72 horas, e posteriormente, utilizou-se subamostras de aproximadamente 5 g de cada amostra a 105 °C, por um período de 24 horas, sendo o teor de umidade e o cálculo de rendimento de óleo essencial determinados pela equação de Santos et al. (2004), modificada. O cálculo do teor de umidade (u) foi estimado por:

$$u = (100 - m_p),$$

onde: m_p é a diferença de massa da planta (g) após a secagem a 105°C.

O rendimento do óleo essencial, extraído de biomassa aérea das plantas de alecrim-do-campo, foi calculado com base na matéria seca ou base livre de umidade. Sendo:

$$R = (m_o * 100) / m_{pb},$$

onde, R = rendimento de óleo essencial em %; m_o = massa de óleo essencial (g); m_{pb} = massa de planta bruta (g) (massa da planta total que foi destilada multiplicada pela diferença de massa de planta após a secagem) e 100 = fator de conversão para percentagem.

Foi extraído o óleo essencial das 105 amostras, 35 plantas de cada local (150 g em média), por hidrodestilação em aparato de Clevenger por uma e hora de meia. Os óleos essenciais foram armazenados em frascos âmbar e mantidos no freezer até a

análise da composição química. As análises da composição química dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico de Campinas e, conduzidas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu, QP-5000), em triplicata, operando a 70 eV, injetor split 1/30, dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹), injetor a 240°C, interface a 230°C e o seguinte programa de temperatura: 60°C – 135°C, 6°C min⁻¹; 135°C – 165°C, 3°C min⁻¹, 165°C – 240°C, 8°C min⁻¹ e injetado 1 µL de óleo essencial (1 µL/1 mL de acetato de etila).

A identificação dos constituintes químicos foi efetuada pela análise comparativa dos espectros de massas das substâncias com o banco de dados do sistema CGEM (Nist 62.lib) e literatura (MCLAFFERTY e STAUFFER, 1989) e índice de retenção (ADAMS, 2007). Os índices de retenção (IR) das substâncias foram obtidos pela injeção de uma série homóloga de n-alcenos (C₉H₂₀ – C₂₅H₅₂ Sigma – Aldrich, 99%), aplicando-se a equação de Van Den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963), empregando-se as seguintes condições operacionais: coluna cromatográfica DB.5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), temperatura inicial a 60°C .

As análises estatísticas de componentes principais (PCA) e discriminante (LDA) avaliaram cada indivíduo como um tratamento e cada composto químico como uma variável que foram realizadas pelo programa XLStat (Addinsoft®) para Microsoft Excel®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teste de Progênes (TP)

4.1.1. Rendimento e produtividade de óleo essencial do TP

O rendimento do óleo essencial das progênes do teste de procedências e progênes por meio do método de destilação por arraste a vapor d'água variou de 0,06% (progênie 18 de Campinas) a 0,27% (progênie 30 de Ubatuba) (Figura 5), em média das progênes, as populações de Campinas e Ubatuba obtiveram 0,16% e a de Campos do Jordão 0,17%, não diferindo estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados encontrados nesse estudo corroboram com o trabalho de Sforcin et al. (2012) que encontraram valores de porcentagem de rendimento que variaram de 0,01 a 0,35 para *B. dracunculifolia* e de Silva et al. (2012) que obtiveram 0,26% para *B. reticularia*. Também foram semelhantes e superiores aos obtidos por Xavier (2011), os quais variaram de 0,01% a 0,16% e, superiores aos de Silva et al. (2013), 0,02 a 0,03% para *B. trimera*. Santana (2013) também não encontrou diferenças significativas para rendimentos de *B. reticularia*.

A produtividade do óleo essencial em kg/1000m², em média, variou de 13 para a população de Campinas a 15 para a população de Ubatuba (Figura 6).

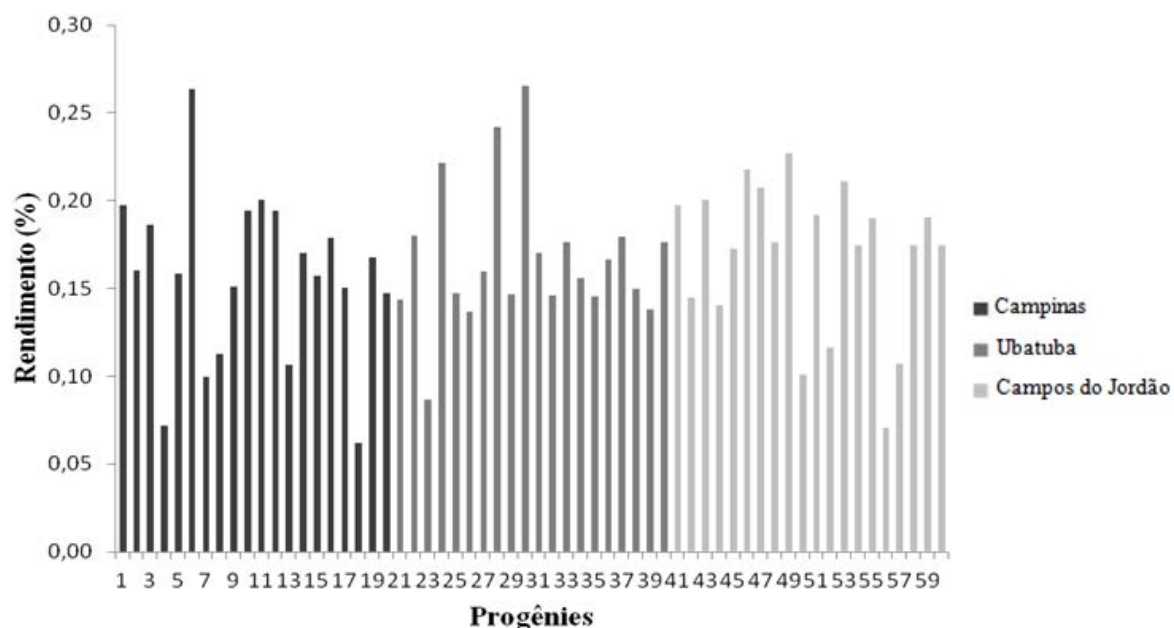


Figura 5. Rendimento de óleo essencial das progênes do teste de procedências e progênes de *B. dracunculifolia*, Campinas-SP.

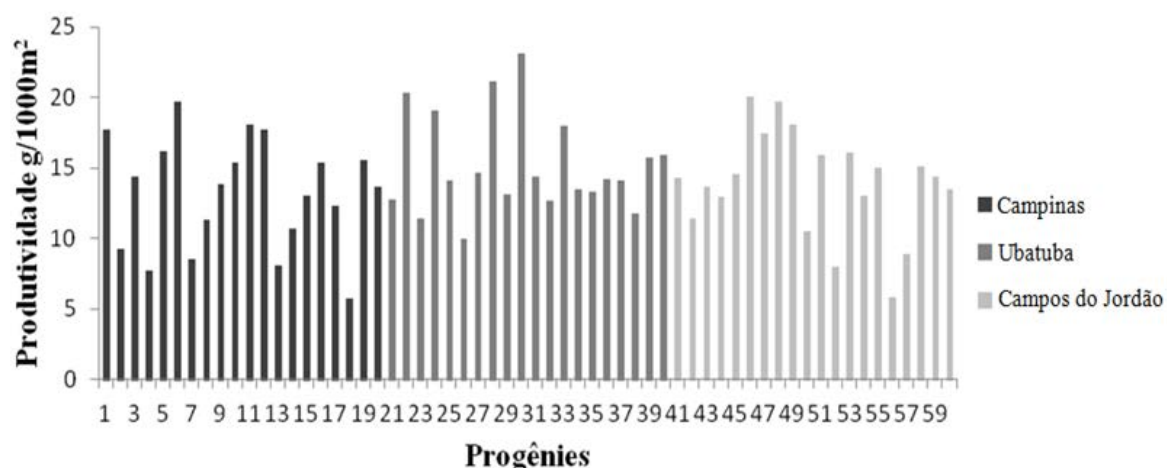


Figura 6. Produtividade em kg/1000 m² para as populações de Campinas, Ubatuba e Campos do Jordão de *B. dracunculifolia*, Campinas-SP.

4.1.2. Caracterização química do óleo essencial do TP

Por meio da análise da composição química dos óleos essenciais extraídos por arraste a vapor d'água das 60 progênes de *B. dracunculifolia*, verificou-se 23 constituintes no total, sendo o *trans*-nerolidol o composto com maior proporção relativa, a população em média de Ubatuba obteve 25%, seguida de Campos do Jordão 20% e de Campinas com a menor 19%. A porcentagem relativa de germacreno D variou de 10% para Ubatuba a 12% para Campinas (Tabela 2).

Dos 23 compostos identificados, quatro pertencem à classe dos monoterpenos (limoneno, sabineno, β -mirceno e α -pineno) e o restante a dos sesquiterpenos. Os óleos essenciais das populações obtiveram a mesma proporção de monoterpenos, Campos do Jordão (13%), seguida de Campinas (12%) e Ubatuba (11%). Para os sesquiterpenos, Ubatuba apresentou (81%) seguida de Campinas (80%) e Campos do Jordão (79%). Sforcin et al. (2012), obtiveram 1% de proporção relativa da classe dos monoterpenos e 70% dos sesquiterpenos dos compostos identificados. A espécie estudada possui em sua maior constituição compostos sesquiterpênicos. Alguns trabalhos estudando outras espécies de *Baccharis*, por destilação por arraste a vapor d'água, também encontraram maior proporção relativa de sesquiterpenos e baixa de monoterpenos (ASCARI et al., 2006; SANTANA, 2013).

Tabela 2. Composição química em porcentagem relativa média do óleo essencial da parte aérea de *B. dracunculifolia* das 60 progênies, Campinas-SP.

Componentes	IR _{exp}	Campinas	Ubatuba	Campos do Jordão
α -pineno	933	1,8	2,5	2,5
sabineno	976	3,4	4,4	4,0
β -mirceno	990	0,7	0,9	0,9
limoneno	1028	6,0	7,4	7,3
α -copaeno	1374	0,7	0,5	0,5
α -gurjuneno	1407	0,7	0,5	0,6
<i>trans</i> -cariofileno	1417	6,3	5,2	5,5
aromadendreno	1437	2,3	1,8	2,2
α -humuleno	1451	1,7	1,4	1,5
allo-aromadendreno	1458	0,7	0,6	0,7
γ -muuroleno	1475	1,7	1,4	1,6
germacreno D	1480	12,1	10,3	11,7
valenceno	1490	0,6	-	0,6
biciclogermacreno	1495	11,0	8,6	11,0
α -muuroleno	1499	1,6	1,3	1,4
germacreno A	1503	0,7	0,6	0,6
γ -cadineno	1512	1,7	1,3	1,4
δ -cadineno	1522	6,4	5,0	5,6
<i>trans</i> -nerolidol	1565	19,1	25,2	20,4
espatulenol	1576	8,8	9,3	9,0
epi- α -cadinol	1639	1,6	1,4	1,2
epi- α -muurolol	1652	1,6	1,3	1,0
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1683	1,0	1,4	1,0
Total (%)		92,2	92,2	92,0
Desvio-padrão		4,76	5,63	4,95

IR_{exp}: Índice de retenção; (-) ausência de substância.

A concentração de *trans*-nerolidol entre as 60 progênies de Campos do Jordão, Campinas e Ubatuba de *B. dracunculifolia*, foi significativa pela análise de variância e as médias diferiram entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) (Tabelas 3 e 4). Campos do Jordão obteve a maior concentração de *trans*-nerolidol (3,32 mg/mL), seguida de Ubatuba (2,96 mg/mL) e Campinas (2,55 mg/mL). Quando comparadas as concentrações de *trans*-nerolidol com as porcentagens relativas das três procedências, Ubatuba obteve a maior porcentagem relativa (25%), mas quando quantificada a concentração da substância, ficou abaixo de Campos do Jordão que apresentou a maior concentração (3,32 mg/mL), pois a porcentagem relativa não representa o teor do analito na amostra. Campinas manteve a menor porcentagem e concentração (19% e 2,55 mg/mL, respectivamente).

O *trans*-nerolidol é o composto majoritário do óleo essencial de *B. dracunculifolia* e possivelmente, o responsável pelo seu aroma, sendo muito valorizado pelas indústrias de fragrâncias, cosméticas e alimentícias (FABIANE et al. 2008; ARRUDA et al., 2005).

Tabela 3. Anova da concentração de *trans*-nerolidol (mg/mL) entre as procedências de Campos do Jordão, Campinas e Ubatuba.

Fonte da variação	SQ	GL	QM	F	P -valor	F crítico
Entre grupos	11,901	2	5,951	30,201	$2,6 \times 10^{-11}$	3,074*
Dentro dos grupos	23,053	117	0,197			
Total	34,955	119				

*significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Concentração média de *trans*-nerolidol entre as procedências de Campos do Jordão, Campinas e Ubatuba pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

Locais	Médias (mg/mL)
Campos do Jordão	3,32 ^a
Ubatuba	2,96 ^B
Campinas	2,55 ^C

*letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si.

4.1.3. Capacidade de rebrota do TP

A característica de massa fresca, em média, das progênies, foi superior para a população de Campinas (1,60 kg), seguida de Ubatuba (1,54 kg) e de Campos do Jordão (1,52 kg), entretanto não diferiram estatisticamente entre si.

O teste F da análise de variância detectou diferença significativa a 1% de probabilidade, somente, para efeito de blocos (2,41). Essa diferença entre blocos indica que o ambiente do ensaio não era homogêneo em toda sua extensão e que a utilização de blocos para controlar o ambiente foi eficiente para manter o controle da variação ambiental (Tabela 5).

O coeficiente de variação genética (CVg%) foi baixo (2,12) e as estimativas de herdabilidades também, variando de 0,07 em nível de plantas individuais a 0,1 em média de progênies (Tabela 6). Araújo (2010) também encontrou valores baixos de

herdabilidades, estudando características morfológicas de *A. conyzoides*, indicando que a seleção do material genético deve ser realizada de forma criteriosa em função da grande influência ambiental.

Comparando as massas frescas obtidas para as progênies com o rendimento por parcela, observa-se que não há diferenças significativas estatisticamente e que as estimativas dos parâmetros genéticos são baixas para todas as progênies, não possibilitando o uso dessa estimativa como esperado, dessa forma, sugere-se a seleção massal a partir da próxima geração para essas características, visto que espécie a estudada ainda não foi manipulada geneticamente, sendo esse, o primeiro estudo envolvendo procedências e progênies. O teste de progênies leva em consideração a capacidade dos genitores em produzir descendentes superiores e, a seleção massal pode favorecer o aumento da frequência de genes desejáveis nas populações, e assim, tornará possível a realização do melhoramento de plantas (BORÉM e MIRANDA, 2009).

Entretanto a capacidade de rebrota foi muito importante, para visualizar e padronizar a necessidade da poda para que haja um aumento substancial da parte aérea que é essencial para produção de óleo essencial, própolis verde e extratos.

Tabela 5. Análise de variância para o caráter massa fresca para procedências de Campinas, Ubatuba e Campos do Jordão de *B. dracunculifolia*, em Campinas-SP.

Efeito	GL	QM	F
Bloco	29	0,73	2,41**
Procedências	2	0,61	2,01 ^{ns}
Progênies	19	0,41	1,35 ^{ns}
Erro	1715	-	-
Total	1765	-	-
CV (%)	43,43		
Média (kg)	1,60		

** significativo a 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Tabela 6. Componentes de variância (REML) para o caráter massa fresca para procedências de Campinas, Ubatuba e Campos do Jordão de *B. dracunculifolia*, em Campinas-SP.

Componentes de variância	
σ_a^2	0,005
σ_e^2	0,302
σ_f^2	0,657
σ_p^2	0,001
σ_d^2	0,354
h_i^2	0,007
h_m^2	0,103
h_d^2	0,010
CV_g (%)	2,122

Para o cálculo da resposta esperada com a seleção entre e dentro de progênies para a formação de um pomar de sementes por mudas foi considerado 20 progênies e duas plantas, o que favoreceu um aumento de 0,20 kg (Tabela 7). Esse progresso genético esperado é válido para *B. dracunculifolia*, aos 14 meses de idade, no mesmo espaçamento utilizado (1,5 x 1 m) e nas mesmas condições ambientais de Campinas.

Tabela 7. Ganho esperado com a seleção para massa fresca em teste de procedências e progênies de *B. dracunculifolia* em Campinas-SP.

Intensidade de seleção entre	I_e	2,268
Intensidade de seleção dentro	I_d	1,830
Resposta à seleção entre e dentro	Red	0,199
Resposta à seleção	R (%)	12,470
Média	μ	1,599
Média melhorada (Kg)	μ_m	1,799

4.2. Testes de sementes

4.2.1. Triagem das cipselas

O uso de um conjunto de peneiras para a triagem das cipselas mostrou-se adequado para separar folhas, *pappus* (estrutura floral aderida à cipsela) e outros elementos que interfeririam na obtenção de um lote puro de cipselas. Os *mesh de*

#32 a #35 (abertura da peneira) retiveram a porção de cipselas de interesse para os testes de germinação e lotes para produção de mudas, de forma que cipselas pequenas e mal formadas foram já descartadas neste processo.

4.2.2. Peso de mil sementes

O peso de mil sementes é utilizado para calcular a densidade de semeadura, o número de sementes por embalagem e a massa da amostra de trabalho para análise de pureza, quando não especificado nas RAS. É uma informação importante, pois gera indicativos como a sanidade das sementes, a maturidade e a densidade de semeadura.

O peso de mil sementes de *B. dracunculifolia* obtida pela metodologia da RAS é inferior a 200 g, desse modo, as cipselas dessa espécie se enquadram na classificação de “semente pequena” pela RAS (Brasil, 2009). A média das oito amostras com 100 cipselas foi multiplicada por 10 para obtenção do valor final de 0,1090 g/1000 cipselas. O coeficiente de variação da amostragem foi 3,36% e se enquadra nos limites estipulados pela RAS (Brasil, 2009), não necessitando, portanto, de repetições desta análise.

4.2.3. Teor de umidade

A tabela 8 apresenta os valores de umidade calculados para o lote bruto, no qual estão presentes outras estruturas florais junto às cipselas, como o pappus e fragmentos das brácteas involucrais. O teor de umidade obtido foi de 10,37% \pm 0,75. O coeficiente de variação foi 7,21%.

Tabela 8. Valores de massa das amostras para cálculo do teor de umidade das cipselas do lote bruto, 2013.

Massa de planta (g)	Massa após secagem (g)	Umidade (%)
2,0162	1,8020	10,62
2,0992	1,8993	09,52
2,0761	1,8488	10,95
Média		10,37
Desvio Padrão	0,75	
Coeficiente de Variação (CV)	7,21	

Outra triplicata da determinação de teor de umidade foi realizada com o lote de cipselas puras, sem a presença de outras estruturas florais. A tabela 9 apresenta os valores de umidade calculados. O teor de umidade obtido foi de 7,41% \pm 0,20. O coeficiente de variação obtido foi 2,71%.

Tabela 9. Valores de massa das amostras para cálculo do teor de umidade das cipselas do lote puro, 2013.

Massa de planta (g)	Massa após secagem (g)	Umidade (%)
0,7797	0,7235	7,21
0,8989	0,8305	7,61
0,8888	0,8228	7,43
Média	7,41	
Desvio Padrão	0,2	
Coeficiente de Variação	2,71	

A diferença entre o teor de umidade do lote bruto e lote puro foi de aproximadamente 3%. O lote puro apresenta-se mais adequado para o armazenamento a médio e longo prazo, não só por conter menor teor de água, mas também menor quantidade de estruturas que estão sujeitas à contaminação de microrganismos. Para um produtor que utiliza o lote de cipselas para replantio de nova safra, o lote bruto pode ser utilizado para germinação.

4.2.4. Redução da umidade das cipselas

Para a redução da umidade foi utilizada com uma porção de cipselas do lote “puro”, a qual teve umidade inicial estabelecida como 7,41% (média obtida na determinação do teor de umidade). Após 15 dias em recipiente hermético com sílica gel, o peso da amostra não variou mais, apresentando 4,12% de massa a menos. Dessa forma, ao longo desse período a amostra teve sua umidade reduzida a 3,3% e foi acondicionada em freezer -20 °C para posterior teste de germinação.

São consideradas *ortodoxas* as sementes que suportam a diminuição de sua umidade e armazenamento a baixas temperaturas, situação esta que foi simulada no projeto.

4.2.5. Testes de germinação

O teste de germinação tem por objetivo determinar o potencial máximo de germinação de um lote de cipselas, o qual pode ser usado para comparar a qualidade de diferentes lotes e também estimar o valor para semeadura em campo.

4.2.5.1. Testes para padronização do substrato e temperatura

A avaliação do percentual de germinação de cipselas de *B. dracunculifolia* em diferentes substratos e temperaturas, por intermédio da análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) (Figura 7), foram detectadas diferenças estatísticas entre os tratamentos estudados, sendo a média de 30,67%.

Os diferentes substratos avaliados sob fotoperíodo de 12 h, em duas temperaturas constantes de 15 °C e 20 °C tiveram como melhor tratamento o papel com nistatina a 15 e a 20 °C, seguidos de vermiculita nas duas temperaturas testadas e substrato inerte a 15 °C, e o menos satisfatório foi o substrato inerte a 20 °C. Os resultados são mais baixos ao serem comparados com as maiores porcentagens (80%) de germinação a 15 e a 20 °C na presença de luz, com papel e nistatina, de Gomes e Fernandes (2002).

O desempenho do teste de germinação para *B. dracunculifolia* foi melhor em papel com nistatina, em relação aos outros substratos avaliados. Com isso, fixou-se o papel para a condução dos testes posteriores.

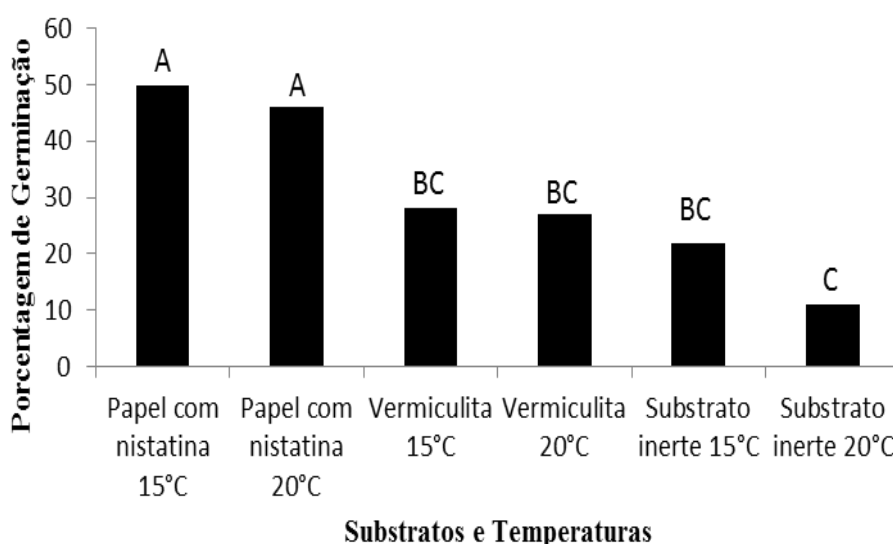


Figura 7. Percentual de germinação de cipselas de *B. dracunculifolia* em diferentes substratos e temperaturas. Letras diferentes sobre as barras das médias diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey, Campinas-SP.

4.2.5.2. Avaliação da temperatura e fotoperíodo

Avaliação da porcentagem de germinação de cipselas de *B. dracunculifolia* em diferentes temperaturas e fotoperíodo seguidas do teste Tukey, detectaram diferenças estatísticas entre os tratamentos estudados a 5% de probabilidade, sendo a média de 30,5%, Figura 8.

Os tratamentos foram conduzidos apenas em papel com nistatina nas temperaturas constantes de 15 °C e 20 °C e alternadas de 15-20 °C com fotoperíodo alternado (12 horas luz) e escuro constante, encontraram que os melhores tratamentos foram a temperatura constante de 20 °C sob fotoperíodo alternado (50%), temperaturas alternadas de 15-20 °C também sob fotoperíodo alternado (46%) e temperaturas alternadas de 15-20 °C sob escuro (44%). Os outros tratamentos não diferiram entre si estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade, sendo o menor tratamento a 15 °C e escuro (12%). As porcentagens de germinação são menores e semelhantes se comparadas aos melhores resultados de Gomes e Fernandes (2002), que encontraram 80% de germinação a 15 e 20 °C, na presença de luz e a 15 °C no escuro e, 60% a 30 °C. Todavia, Ferreira et al. (2001), avaliaram sementes de *B. trimera*, e encontraram baixos percentuais de germinação, abaixo de 20% em qualquer temperatura de 20 a 30 °C.

A baixa taxa de germinação no escuro é comum a várias espécies tropicais (KLEIN e FELIPPE, 1992; TEKETAY, 1997; TEKETAY e GANSTRÖM, 1997). Todavia, conforme Felipe e Silva (1984), a resposta à luz varia com a temperatura em que as cipselas foram incubadas.

Segundo Takaki (2001), o fotoblastismo está relacionado às formas do fitocromo que controlam a germinação, já que todas as sementes possuem esse pigmento e este seria responsável pela percepção das condições de luminosidade do ambiente. Geralmente, as condições ambientais exigidas para a germinação estão relacionadas com as condições ecológicas predominantes no habitat da espécie. Frequentemente, as temperaturas em que ocorrem as maiores taxas germinativas correspondem aos valores registrados nas épocas e microambientes mais propícios para o recrutamento de plântulas (BASKIN e BASKIN, 1992).

Considerando o estado não domesticado da espécie em questão, estabeleceram como condição ideal para comparação de outras populações de *B. dracunculifolia* o tratamento de 20 °C com fotoperíodo alternado.

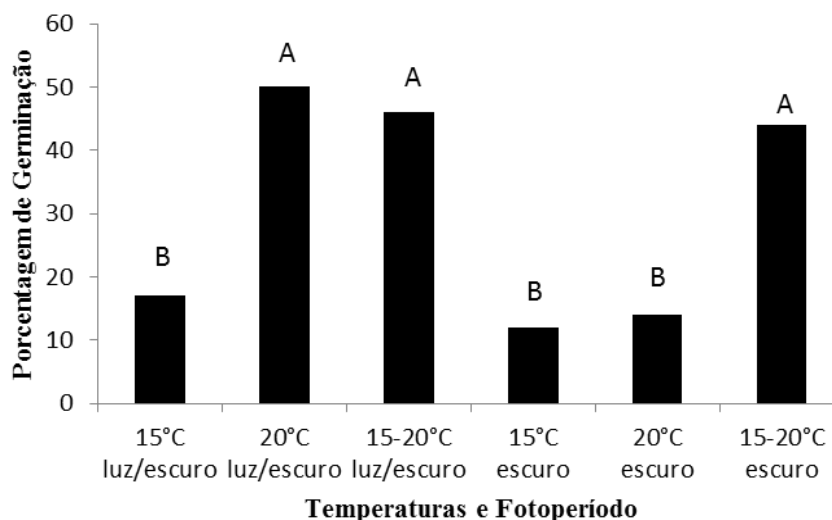


Figura 8. Percentual de germinação de cipselas de *B. dracunculifolia* em diferentes temperaturas e fotoperíodo e médias comparadas pelo teste Tukey. As médias seguidas pela mesma letra, sobre as barras das médias, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, Campinas-SP.

4.2.5.3. Avaliação do armazenamento em médio prazo

A avaliação da porcentagem de germinação de cipselas de *B. dracunculifolia* em 3, 6 e 9 meses de armazenamento sob temperatura de 6°C, em substrato de mudas e gerbox, por intermédio da análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) (Figura 9), foram detectadas diferenças estatísticas entre os tratamentos estudados a 5% de probabilidade, sendo a média de 40,52%.

Os resultados para os lotes armazenados sob temperatura de 6°C (médio prazo) não baixaram a taxa de germinação ao longo do tempo.

O teste conduzido com cipselas armazenadas por 9 meses apresentou a maior taxa de germinação (68%) em substrato de mudas. Os testes com lotes armazenados por 3 e 9 meses não diferiram estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$) em condições de substrato de mudas. Giordani e Silveira (2007), estudando sementes de Vernoniaeae (Asteraceae), após três meses de armazenamento não ocorreu germinação. Todavia Santana e Carvalho (2006) verificaram que sementes de *Baccharis trimera* armazenadas em geladeira (4 a 7 °C) apresentaram um percentual médio de germinação de 25,58%, um pouco inferior aos melhores resultados encontrados neste trabalho.

A conservação das sementes é de grande importância, uma vez que tem função básica de preservar a qualidade fisiológica das mesmas, sendo essa preservação possível porque o armazenamento uma vez aplicado de modo adequado vai diminuir a

velocidade de deterioração, que se caracteriza por ser um processo irreversível (CABRAL et al., 2003).

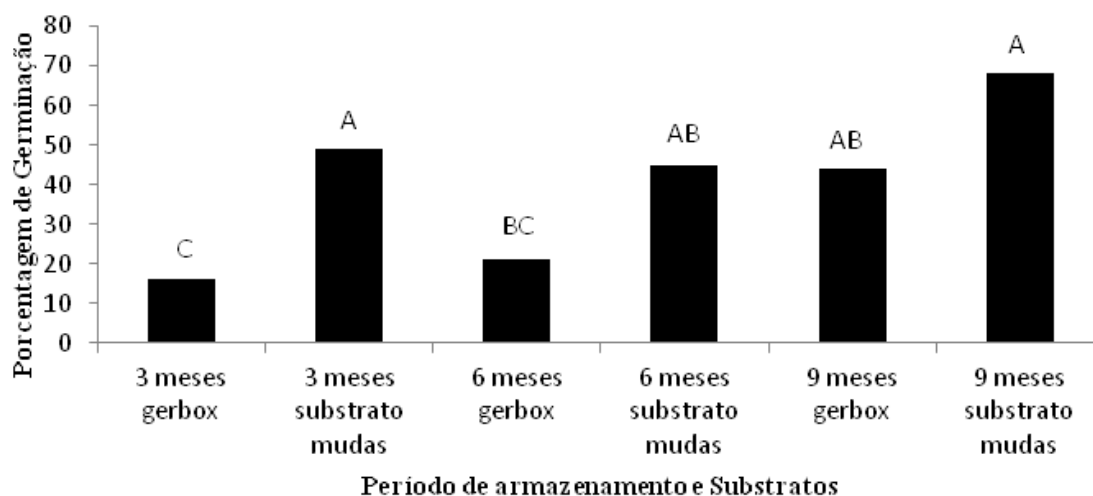


Figura 9. Percentual de germinação de cipselas de *B. dracunculifolia* por 3, 6 e 9 meses de armazenamento sob temperatura de 6 °C, em substrato de mudas e em gerbox. As médias seguidas pela mesma letra, sobre as barras das médias, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, Campinas-SP.

4.2.5.4. Avaliação das populações naturais: Campos do Jordão, Campinas e Ubatuba

A porcentagem de germinação de cipselas de *B. dracunculifolia* das populações naturais de Campos do Jordão, Campinas e Ubatuba em gerbox e substrato de mudas, por intermédio da análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) (Figura 10), avaliadas durante 30 dias, a média geral foi de 49,64%.

Comparando as taxas germinativas das amostras populacionais de Campos do Jordão, Campinas e Ubatuba, observa-se estatisticamente o destaque para o lote de Campinas, com as máximas porcentagens (76% gerbox e 73% substrato de mudas) e para Campos do Jordão com as mínimas (13% gerbox e 5% substrato de mudas).

Em todos os testes com o lote proveniente de Campos de Jordão a porcentagem de germinação após 30 dias mostrou-se muito baixa, variando de 5 a 13%. Entretanto, aproximadamente 75 dias após o início do teste em substrato de mudas, observou-se uma média de 19% de germinação total, evento que não foi observado nos testes com as populações de Campinas e Ubatuba. É possível que essa população de clima mais frio apresente algum mecanismo de dormência, germinando posteriormente.

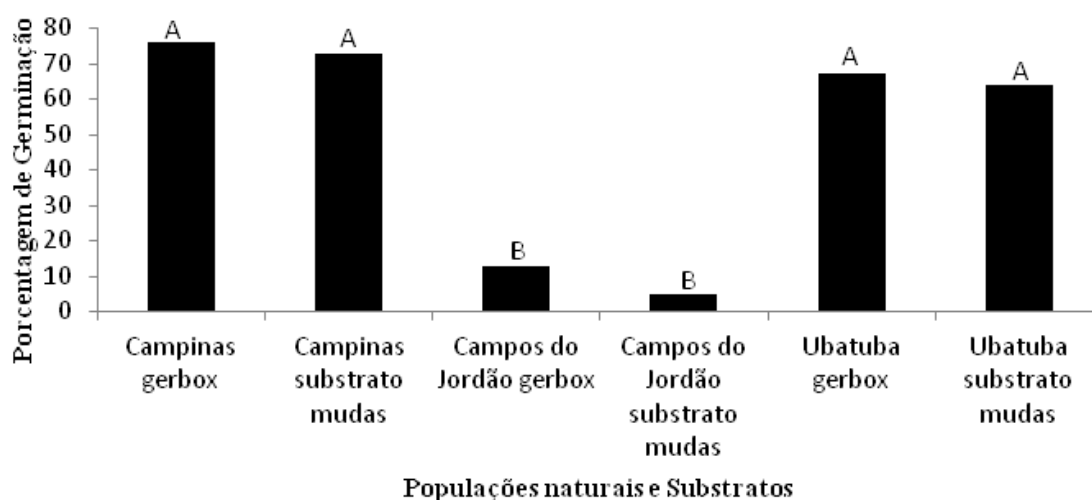


Figura 10. Percentual de germinação de cipselas de *B. dracunculifolia* das populações naturais de Campos do Jordão, Campinas e Ubatuba em gerbox e substrato de mudas. As médias seguidas pela mesma letra, sobre as barras das médias, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, Campinas-SP.

4.2.5.5. Avaliação de resistência à dessecação

A porcentagem de germinação de cipselas de *B. dracunculifolia* armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 dias com umidade de 3,3%, das populações de Campos do Jordão e do CPQBA em substrato de mudas e gerbox, por intermédio da análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) (Figura 11), a média geral foi de 27,52%.

Os dois lotes de cipselas armazenados $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 dias com umidade de 3,3% apresentaram de baixa a mediana taxa de germinação (máxima de 49% - lote julho/2012/CPQBA), entretanto em nenhum dos testes a germinação foi nula. Os resultados foram diferentes estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade para os lotes das sementes do CPQBA (44 e 49%) e de Campos do Jordão (4 e 13%).

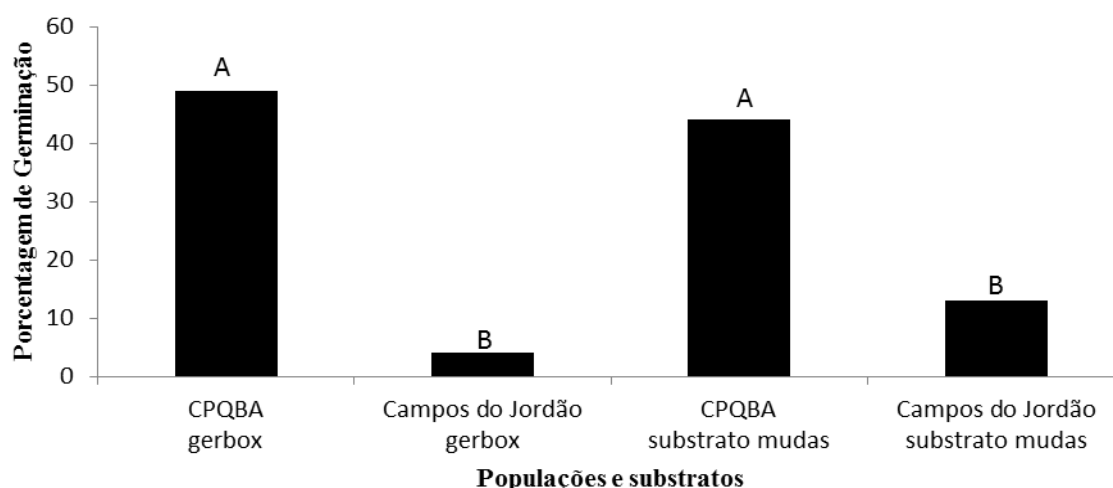


Figura 11. Percentual de germinação de cipselas de *B. dracunculifolia* das populações de Campos do Jordão e CPQBA em substrato de mudas e gerbox em resistência a dessecação. Letras diferentes sobre as barras das médias diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, Campinas-SP.

Analisou-se por intermédio da análise de variância o índice de velocidade de emergência de plântulas das populações naturais de Campos do Jordão, Campinas e Ubatuba em substrato de mudas e gerbox e as médias foram comparadas entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) (Figura 12), a média geral foi de 1,68.

O maior índice de velocidade de emergência de plântulas foi para Campinas/gerbox e substrato de mudas e Ubatuba/gerbox, e o menor percentual foi para Campos/ substrato de mudas.

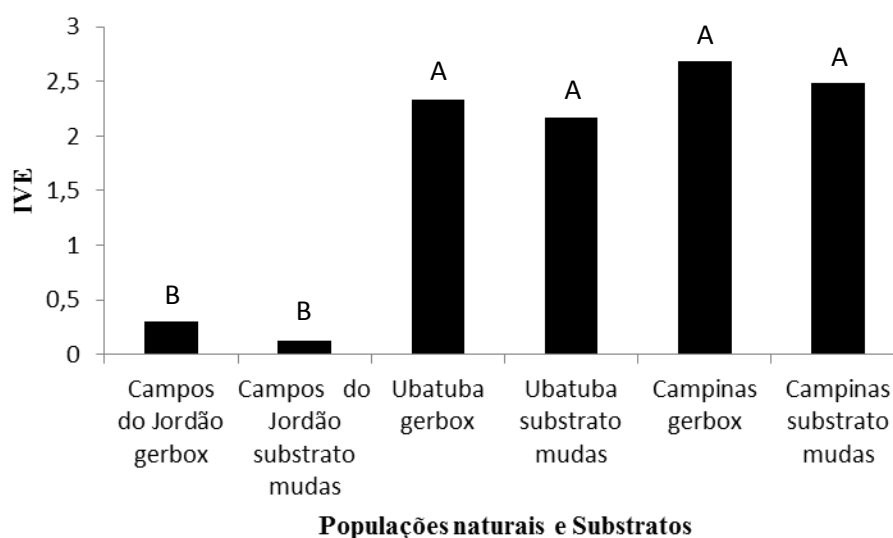


Figura 12. Índice de velocidade de emergência das plântulas de *B. dracunculifolia* das populações naturais. As médias seguidas pela mesma letra, sobre as barras das médias, não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% de probabilidade, Campinas-SP.

O índice de velocidade de emergência (IVE) apresentou relação estatisticamente significativa com os substratos testados das populações naturais ($\hat{y} = 1,709 \cdot x^2 + 6,025 \cdot x + 4,178$; $r = 0,99$; $p \leq 0,05$), o modelo linear foi o melhor, sendo a tendência de aumento de IVE nas populações naturais proporcionalmente ao substrato utilizado (papel em gerbox).

As cipselas de *B. dracunculifolia* submetidas à redução de umidade e armazenamento em baixa temperatura (-20 °C) foram capazes de germinar, ainda que em taxas reduzidas comparadas à germinação do mesmo lote recém-colhido. Dessa maneira, é possível afirmar que esta espécie apresenta comportamento ortodoxo, sendo viável a formação de um banco de germoplasma e a conservação *ex situ* em longo prazo.

O armazenamento em médio prazo, sem redução da umidade inicial em temperatura de 6 °C por 9 meses não indicou comprometimento na taxa de germinação, ao contrário do que foi relatado por Gomes e Fernandes (2002). Tal divergência pode ser relacionada à variabilidade genética dos lotes, uma vez que ambos os trabalhos foram conduzidos com populações naturais, não cultivadas.

A amostra da população proveniente do município de Campos do Jordão apresentou baixa taxa germinativa, comparado com as amostras de Campinas e Ubatuba. Além disso, foi detectada germinação tardia no experimento conduzido em substrato de mudas, ou seja, algumas cipselas germinaram após os 30 dias estabelecidos para a contagem do teste de germinação.

O estudo da biologia da *B. dracunculifolia*, a caracterização das populações naturais no estado de São Paulo, o armazenamento das sementes e a construção de um banco de germoplasma são especialmente importantes não só pelo ponto de vista comercial, mas também garantir a preservação da variabilidade genética deste representante da mata atlântica, contribuir para posteriores estudos dos compostos especializados medicinais e viabilizar o cultivo de variedades melhoradas geneticamente para exploração comercial de seus subprodutos, como o óleo essencial e a própolis verde.

4.3. Conservação e Diversidade das Populações Naturais

4.3.1 Avaliação da qualidade e quantidade de DNA

A qualidade visual das moléculas de DNA genômico foi bastante satisfatória e pode ser observada no gel apresentado na Figura 13, representada pelas amostras de DNA da subpopulação III de Campinas. As bandas do DNA genômico, apresentaram-se bem definidas, sem ocorrência de arraste, denotando a total integridade do DNA. Nenhuma presença de RNA foi verificada nos perfis eletroforéticos, demonstrando que o tratamento com RNase foi eficiente.



Figura 13. Perfil eletroforético dos DNAs genômicos extraídos de tecidos foliares de *B. dracunculifolia*. As quatro primeiras canaletas de cada gel apresentam um padrão de concentração de DNA conhecido (λ DNA USB), Campinas-SP.

4.3.1.1. Seleção, sequenciamento dos clones positivos e desenho de *primers*

A partir da biblioteca genômica construída foram obtidas sequências de boa qualidade a partir de 85 colônias, sendo que, em 40 delas não foram encontrados microssatélites (SSR), o que representa um índice de enriquecimento das colônias de 47,06%. No total foram identificados 52 microssatélites, sendo todos dinucleotídeos.

Posteriormente, sintetizou-se 27 pares de oligonucleotídeos que flanqueiam os motivos SSR. Os marcadores SSR sintetizados apresentaram porcentagem média de GC igual a 48,94%, amplificando produtos com tamanho médio de 205,30 pb, em temperatura de anelamento média de 60,94 °C. Dos 27 SSR sintetizados, 20 (74,07%) são classificados como simples e apenas sete (25,93%) são compostos.

Seis marcadores SSR sintetizados foram monomórficos e quatro apresentaram amplificação específica nos genótipos utilizados no estudo. Oito marcadores SSR polimórficos desenvolvidos neste estudo e três já sintetizados (BELINI et al., 2015 no prelo) foram utilizados para a caracterização genética das três populações do estudo em gradiente altitudinal (Tabela 10).

Tabela 10. Marcadores SSR sintetizados, com os respectivos motivos, amplitude alélica (SR), porcentagem de CG e classificação do motivo.

Locos	Sequência (5'-3')	Motivo	SR	%GC	Classificação
Bd 06	F: TGATCGGATGTGTGTGATGA R: GGCTTAGAACGTGGAGTGGT	(TG)6(CT)6	225-411	50,0	Composto
Bd 09	F: CGCGTGGACTAACCTGTATG R: AAATGGAAGTTGGGAACACG	(GT)7	138-295	45,3	Simples
Bd 13	F: CGTGGACTACCCACCTTCTC R: TCGTATCAACCTCCTAGCTGTG	(CA)7(CA)7	98-288	50,0	Composto
Bd 14	F: TGC GTTACACACATTGCTCA R: TCTTGCTTACGCGTGGACTA	(AC)10	135-288	47,5	Simples
Bd 16	F: TCTGCATAGGGCATT TTTGTG R: GCGAGGAAGAGAGAGATGGA	(CT)6(CT)10	201-381	50,0	Composto
Bd 17	F: AGGGTGTACCAACGGCTAAC R: TGCATAGTGATTCCGATAGATG	(AC)6	92-324	47,9	Simples
Bd 19	F: TTTT TAGGATCGCTCCACCA R: CTCAAGCTATGCATCCAACG	(TG)6	179-367	47,5	Simples
Bd 26	F: CTTCCCCTATTTGATGATGACA R: CGCGTGGACTAACTTGTCTTT	(AC)21(CA)9	195-432	44,3	Composto
Bd 04M*	F: TCCCGTGGTTGTTTCTTACA R: TCCGATACAGTTTATGGCTGT	(TCC)4(CTT)4	172-174	48,8	Composto
Bd 06M*	F: GCTGTCAATGATGCCACTA R: GCCAGACTTGAACCTTGTCC	(AC)7	220-240	47,5	Simples
Bd 10M*	F: TCATGGTTCATTGGTCTTGA R: CGAACAATTTGCCATTAAC	(TC)17	126-172	51,3	Simples
Bd 01**	F: GGTAACGGCGAGAGTGAGTT R: TCTCCCTCATT CATTGTACGG	(GT)6(GA)6	45-223	46,5	Composto
Bd 03**	F: GCACTGCCATAATCACAAGG R: GGATGGGTCCCTCATAATCAAA	(AC)17	126-371	48,8	Simples
Bd 10**	F: GCCTGGGTGGTACATATCATT R: GTCACAAGACGACCCCAAAT	(TG)6	107-301	47,5	Simples
Bd 11**	F: GAGGCTCGCTGTTAGGATTG R: GCATAATCGTTGATCGGAAA	(CA)7	129-350	46,2	Simples
Bd 21**	F: CTTACGCGTGGACTACATACG R: GGCGCGAATGAATGTAAAAT	(AC)9	07-229	48,8	Simples
Bd 24**	F: TGG AATGGACTTTTGGGAAG R: CGCGTGGACTAACCTGTATG	(AC)7	144-380		

*Marcadores já sintetizados; ** Marcadores monomórficos.

4.3.2 Variabilidade genética

Levando em conta a necessidade de preservação, cultivo sustentado e a carência de estudos genéticos de *B. dracunculifolia*, este trabalho pode contribuir para estudos futuros.

Dentre os 11 SSR que foram polimórficos, destacam-se Bd 06, Bd 13, Bd 16, Bd 26 e Bd 04M que apresentaram motivos compostos. O Bd 10M foi o marcador que apresentou o maior número total de alelos (7) e a maior amplitude alélica foi o Bd 19.

A distribuição das frequências alélicas para os 11 locos SSR comparando os genótipos amostrados nas três populações de *B. dracunculifolia* analisadas nesta pesquisa se encontra na Figura 14.

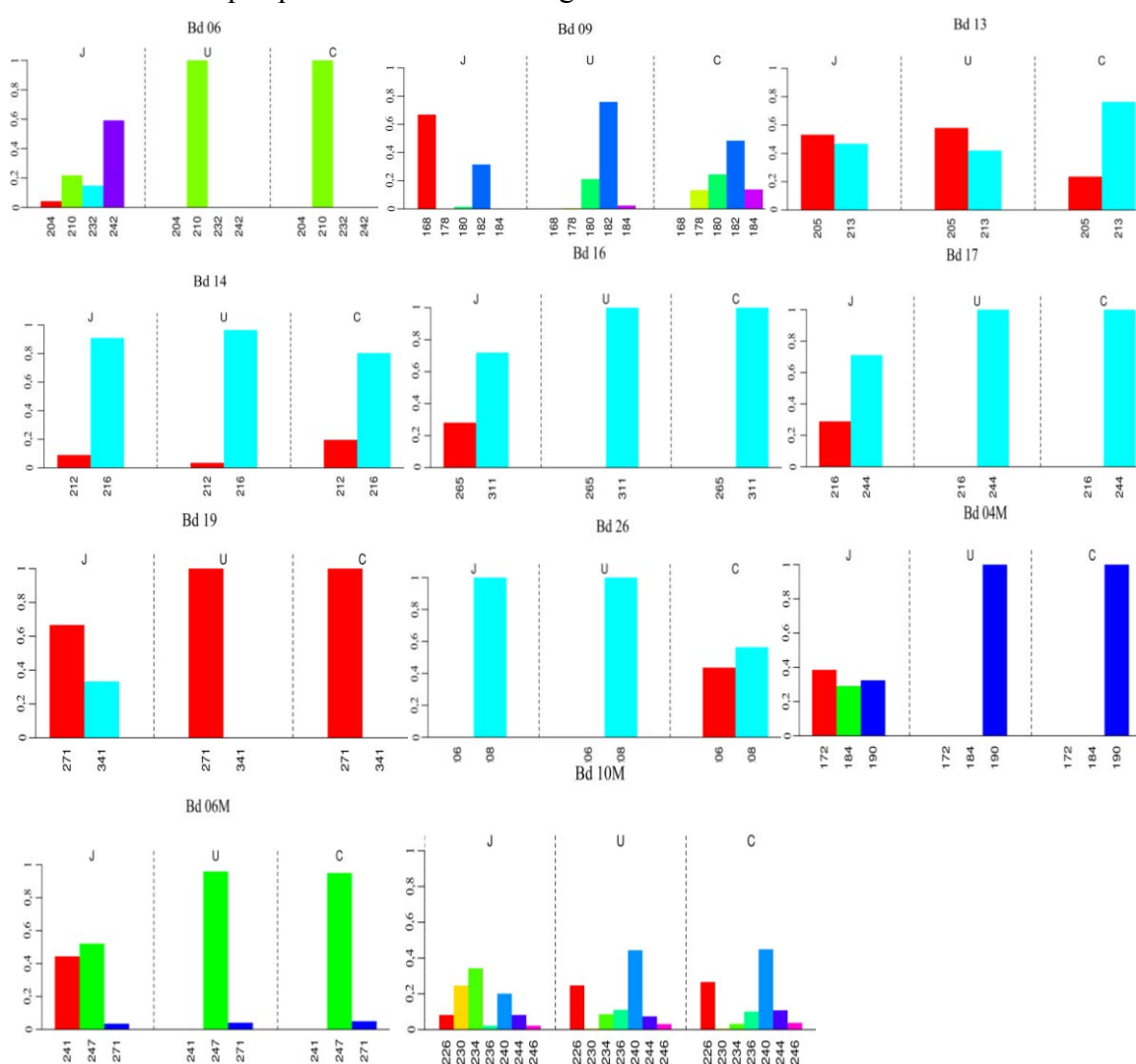


Figura 14. Distribuição das frequências alélicas para os 11 locos SSR, estimados para 278 indivíduos de *B. dracunculifolia*. O eixo y indica a frequência alélica e o x o número do alelo. J: Campos do Jordão; U: Ubatuba e C: Campinas, Campinas-SP.

As oscilações nas frequências alélicas, perdas e fixação de alelos, podem surgir devido à ação da deriva genética ou da seleção. No caso de marcadores moleculares neutros como SSR, essas oscilações se desenvolvem através de processos aleatórios. Dessa maneira, a análise das frequências alélicas é de grande importância, pois pode refletir melhor os efeitos aleatórios do que a maioria dos parâmetros utilizados no estudo de genética de populações, uma vez que tais parâmetros não refletem diretamente frequências alélicas eventualmente muito baixas (OLIVEIRA et al., 2002).

As análises realizadas com os 11 locos SSR nas três populações de *B. dracunculifolia* indicaram polimorfismo moderado, foi observado total de 34 alelos. A população de Campos do Jordão obteve a maior proporção de alelos 91,18%, seguida de Campinas 70,59% e Ubatuba 67,65%. O valor médio de alelos por loco, considerando cada população foi de 3,10.

O número total de alelos em cada população foi 31 para Campos do Jordão, 23 para Ubatuba e 24 para Campinas (Figura 15). Esses resultados corroboram com o único artigo que está no prelo, até então, sobre diversidade em banco de germoplasma com marcadores microssatélites para *B. dracunculifolia*, esse estudo caracterizou três populações e encontrou 38 alelos (BELINI et al., 2015 no prelo).

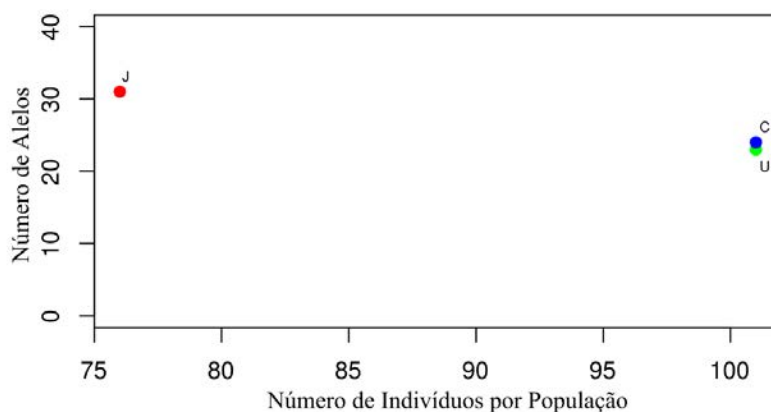


Figura 15. Número de alelos em cada população pelo número de indivíduos por população, Campinas-SP.

Foram encontrados 11 alelos (Bd 06, Bd 09, Bd 16, Bd 17, Bd 19, Bd 26, Bd 04M e Bd 06M) com frequência inferior a 1%, sendo considerados alelos raros. A riqueza alélica média foi de 25,638 para todas as populações. Belini et al. (2015 no prelo), encontraram 17 alelos raros para três populações. Ammar et al. (2015)

estudando *Cynara cardunculus*, também da família Asteraceae, encontraram de 2 a 16 alelos raros em seis populações.

A Figura 16 mostra a riqueza alélica das populações, que leva em conta o tamanho amostral de cada uma delas, o mesmo ranqueamento observado em relação ao número de alelos fica ainda mais evidenciado. Campos do Jordão apresentou a maior riqueza alélica média (2,81) devido aos locos Bd 10M (6,99) e Bd 06M (4,00), seguida de Campinas (2,15) representado pelos locos Bd 10M (6,68) e Bd 09 (4,00) e a menor riqueza alélica média encontrada foi de Ubatuba (2,03) e os locos que contribuíram foram Bd 10M (6,66) e Bd 09 (3,62).

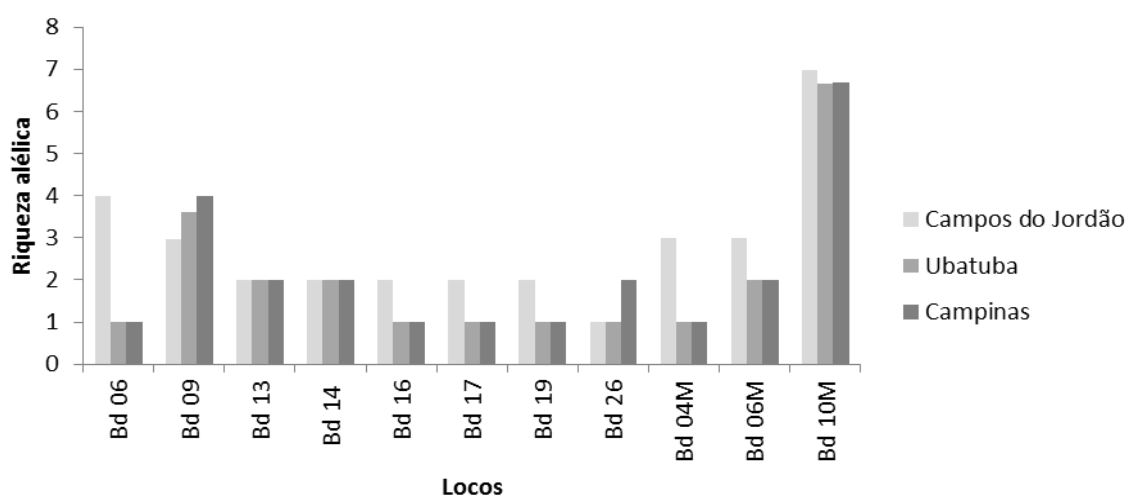


Figura 16. Riqueza alélica (R) dos 11 locos nas três populações de *B. dracunculifolia*, Campinas-SP.

Os marcadores SSR desenvolvidos para o presente estudo apresentaram, em média, diversidade genética intermediária. O loco Bd 16 apresentou a menor diversidade (0,135) enquanto o loco Bd 10M foi o mais polimórfico, com valor de H_E igual a 0,729 (Tabela 11). Esses resultados foram menores e semelhantes aos encontrados por alguns autores estudando diversas espécies da família Asteraceae, Ammar et al. (2015) para *Cynara cardunculus*, encontraram H_E de 0,63 a 0,74; Habber (2008) estudando *Lychnophora pinaster*, observou de 0,599 a 0,918.

A população de Campos do Jordão apresentou maior diversidade genética H_E (0,446), seguida de Campinas (0,239) e de Ubatuba (0,157). As populações do presente estudo não estão na mesma proporção antropogênica, pois Campos do Jordão possui maior variabilidade genética que Campinas e Ubatuba.

Foi observado diferença significativa quanto aos valores médios de heterozigosidade esperada ou diversidade genética de Nei entre todas as populações como pode ser observado na figura 17.

Tabela 11. Heterozigosidade esperada (H_E) por loco e por população de *B. dracunculifolia*.

Locos	Campos do Jordão	Ubatuba	Campinas	Média
Bd 06	0,578	0,000	0,000	0,193
Bd 09	0,453	0,378	0,669	0,500
Bd 13	0,498	0,487	0,361	0,449
Bd 14	0,164	0,068	0,315	0,182
Bd 16	0,404	0,000	0,000	0,135
Bd 17	0,411	0,000	0,000	0,137
Bd 19	0,444	0,000	0,000	0,148
Bd 26	0,000	0,000	0,492	0,164
Bd 04M	0,662	0,000	0,000	0,221
Bd 06M	0,530	0,079	0,095	0,235
Bd 10M	0,767	0,716	0,703	0,729
Média	0,446	0,157	0,239	

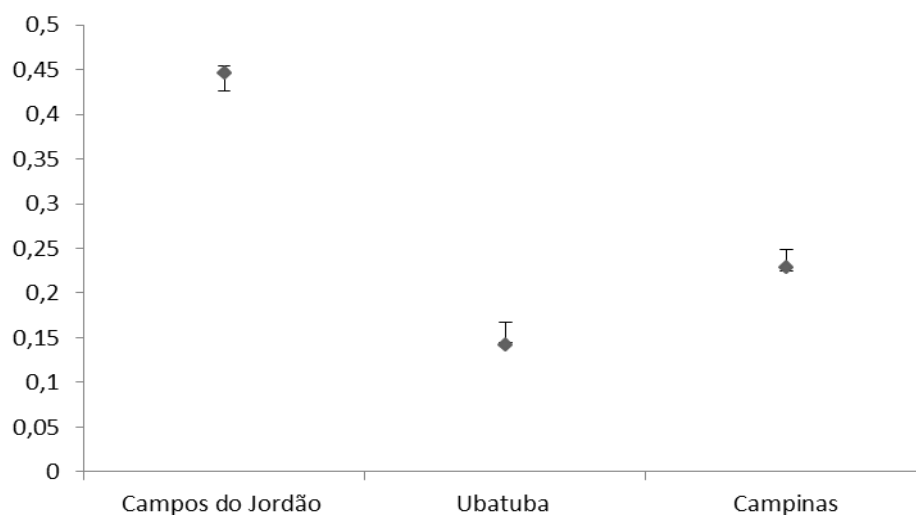


Figura 17. Intervalo de confiança a 95% das médias populacionais de *B. dracunculifolia* de heterozigosidade esperada (H_E), Campinas-SP.

A frequência de heterozigotos foi superior na população de Campos do Jordão ($H_O = 0,363$), seguido de Campinas ($H_O = 0,178$) e de Ubatuba ($H_O = 0,119$) (Tabela 12). Foi observado diferença significativa entre todas as populações (Figura 18).

A heterozigosidade média esperada em Equilíbrio de Hardy Weiberg H_E (0,272) foi, relativamente, maior do que a heterozigosidade observada H_O (0,212), em todas as populações, indicando certo nível de endogamia nas 3 populações estudadas, confirmadas através do valor médio de F_{IS} (0,286). A população de Campinas apresentou o maior F_{IS} (0,257), seguida da população de Ubatuba (0,244) e de Campos do Jordão (0,187) (Tabela 13), todavia não foram significativamente diferentes, como pode ser observado na Figura 19. Entretanto, Belini et al. (2015 no prelo), encontraram excesso de heterozigotos nas três populações estudadas de *B. dracunculifolia*.

A presença de alelos nulos pode causar viés na heterozigosidade observada em relação H_E em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). A ocorrência de alelos nulos acarreta no aumento da homozigose aparente e redução da heterozigose aparente, visto que indivíduos heterozigotos poderão ser interpretados como homozigotos.

Foram detectadas a presença desses alelos nos locos Bd 06, Bd 16, Bd 17 e Bd 26, o que pode ser uma das causas para esses locos não estarem em EHW, além de outros fatores como a presença de endogamia intrapopulacional. Também foram observados valores médios de F_{IS} na maioria dos locos, o que favorecem a interpretação de que os genótipos analisados são endogâmicos, provavelmente devido ao cruzamento de indivíduos aparentados nas subpopulações, uma vez que a espécie é dióica.

Tabela 12. Heterozigosidade observada (H_o) por loco e por população de *B. dracunculifolia*.

Locos	Campos do Jordão	Ubatuba	Campinas	Média
Bd 06	0,296	0,000	0,000	0,099
Bd 09	0,046	0,388	0,564	0,332
Bd 13	0,365	0,247	0,270	0,294
Bd 14	0,180	0,070	0,392	0,214
Bd 16	0,562	0,000	0,000	0,187
Bd 17	0,579	0,000	0,000	0,193
Bd 19	0,667	0,000	0,000	0,222
Bd 26	0,000	0,000	0,000	0,000
Bd 04M	0,486	0,000	0,000	0,162
Bd 06M	0,347	0,082	0,100	0,176
Bd 10M	0,463	0,519	0,633	0,538
Média	0,363	0,119	0,178	

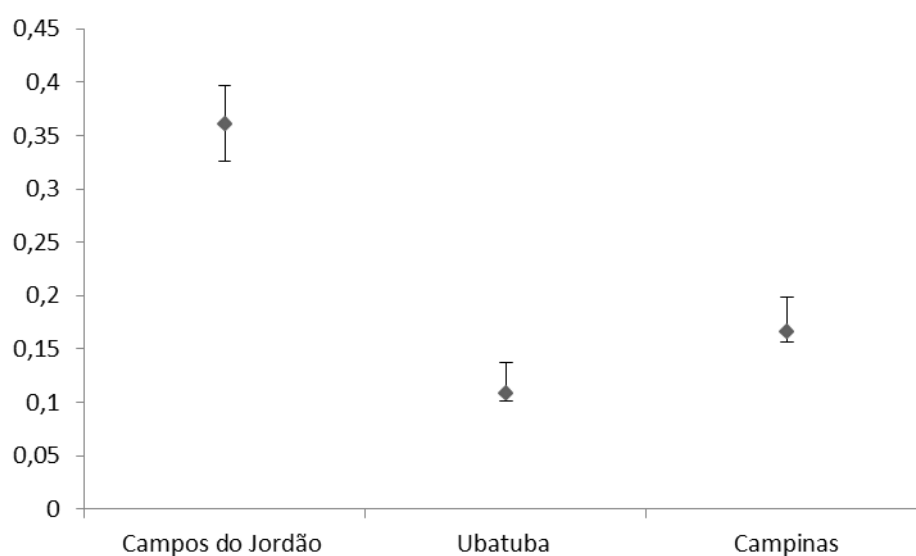
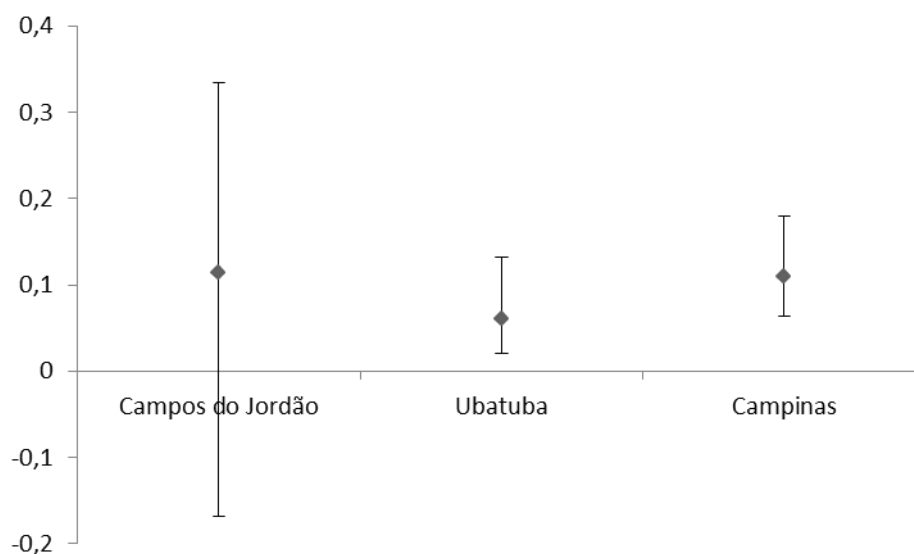


Figura 18. Intervalo de confiança a 95% das médias populacionais de *B. dracunculifolia* de heterozigosidade esperada (H_E), Campinas-SP.

Tabela 13. Coeficiente de endogamia (F_{IS}) por loco e por população de *B. dracunculifolia*.

Locos	Campos do Jordão	Ubatuba	Campinas	Média
Bd 06	0,489	NA	NA	0,163
Bd 09	0,898	-0,025	0,157	0,343
Bd 13	0,267	0,493	0,252	0,337
Bd 14	-0,099	-0,036	-0,244	-0,126
Bd 16	-0,391	NA	NA	-0,130
Bd 17	-0,407	NA	NA	-0,136
Bd 19	-0,500	NA	NA	-0,167
Bd 26	NA	NA	1	0,333
Bd 04M	0,265	NA	NA	0,088
Bd 06M	0,345	-0,043	-0,053	0,083
Bd 10M	0,396	0,275	0,099	0,257

**Figura 19.** Intervalo de confiança a 95% das médias populacionais de *B. dracunculifolia* de coeficiente de endogamia (F_{IS}).

4.3.3 Estrutura Populacional

Os valores das estimativas do F_{ST} (0,304) e R_{ST} (0,414) indicam que existem fortes indícios de estruturação na amostra total. Belini et al. (2015 no prelo), observaram valores menores de F_{ST} (0,052) e R_{ST} (0,074) para as populações de Ouro Fino (estado de Minas Gerais, 908 m de altitude) e Franca (estado de São Paulo, 1040 m de

altitude), apesar das populações serem de dois estados brasileiros, as altitudes foram próximas, o que pode explicar a baixa estruturação das populações.

A Tabela 14 mostra que as estimativas das estatísticas F de Weir e Cockerham e do R_{ST} obtidas foram significativamente diferente de zero.

Tabela 14. Estimativa das estatísticas F de Weir e Cockerham, e R_{ST} nas três populações de *B. dracunculifolia*.

	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}	R_{ST}
Estimativa	0,463	0,286	0,304	0,414
Limite inferior (IC 95%)	0,429	0,071	0,256	-
Limite superior (IC 95%)	0,495	0,556	0,351	-

Ubatuba apresenta os menores valores de F_{ST} par a par em relação às demais populações, enquanto em Campos do Jordão podemos observar os maiores valores de F_{ST} par a par (Tabela 15). Em função do alto valor de F_{ST} detectado no estudo e da distância geográfica, provavelmente não existe fluxo gênico significativo entre as populações. Segundo Wright (1978), para valores de F_{ST} iguais ou acima de 0,25, considera-se que existe diferenciação grande; valores entre 0,15 a 0,25 indicam diferenciação mediana. Não foi observado fluxo gênico entre as populações de *B. dracunculifolia* estudadas, visto as distâncias entre elas, sendo Campinas e Ubatuba a maior distância.

Tabela 15. Matriz de F_{ST} par a par entre as três populações de *B. dracunculifolia* analisadas.

	Campos do Jordão	Ubatuba	Campinas
Campos do Jordão			
Ubatuba	0,359		
Campinas	0,354	0,144	

No teste exato de Fisher para aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) apresentado na Tabela 16, as populações cujos genótipos não aderiram as proporções de EHW podem estar sujeitas às consequências da deriva genética, endogamia ou a presença de alelos nulos.

Tabela 16. *p*-valor do Teste Exato de Fisher para verificação de aderência ao EHW por loco e por população. $\alpha = 0,0005$ (correção de Bonferroni sobre 99 combinações). Valores com asterisco são os locos que aderem às proporções esperadas. NA indica que os respectivos locos são monomórficos

	Campos do Jordão	Ubatuba	Campinas
Bd 06	0,0000	NA	NA
Bd 09	0,0000	0,0002	0,0000
Bd 13	1,0000*	1,0000*	0,0195*
Bd 14	0,0004	NA	NA
Bd 16	0,0002	NA	NA
Bd 17	0,0422*	0,0000	0,0201*
Bd 19	0,0001	NA	NA
Bd 26	NA	NA	0,0000
Bd 04M	0,0000	1,0000*	1,0000*
Bd 06M	0,0000	NA	NA
Bd 10M	0,0000	0,0000	0,0000

O teste aplicado é considerado conservador devido à correção de Bonferroni para vários testes, o que consiste em dividir o nível nominal de probabilidade do teste (5%) pelo número de testes (n° populações amostradas x n° locos) (BAJAY, 2014). Dessa forma, o nível nominal ajustado de probabilidade assume valores muito baixos para a rejeição da hipótese de nulidade. Todavia, os resultados do teste exato se mostraram mais confiáveis que testes baseados em χ^2 ou razão de verossimilhança, quando a análise envolve amostras pequenas e locos multialélicos, nos quais a ocorrência de classes genotípicas de baixa frequência é muito comum.

Para verificar se os desvios do EHW se devem a presença de alelos nulos aplicou-se o algoritmo de Brookfield (1996), com maiores valores para frequência de alelos nulos indicam que há carência de heterozigotos enquanto os valores negativos ou próximos de zero indicam ausência de alelos nulos. Após a análise deste resultado, sugere-se que as populações não estão em EHW para os locos Bd 06 e Bd 26 devido à presença de alelos nulos (Tabela 17).

Alelos nulos ocorrem devido a mutações na região de anelamento do *primer* levando a observação de excesso de homozigotos, logo, mesmo se a região de interesse (amplicon do SSR) for uma forma alternativa de alelo, ela não seria identificada, pois não foi possível amplificar aquele fragmento.

Tabela 17. Teste de algoritmo de Brookfield (1996) para os locos nas populações de *B. dracunculifolia* para verificar presença de alelos nulos.

	Bd06	Bd09	Bd14	Bd16	Bd17	Bd13	Bd19	Bd26	Bd6M	Bd4M	Bd10M
F _O	0,246	0,206	-0,019	-0,010	-0,011	0,159	-0,011	0,274	0,105	0,161	0,152
F _M	0,245	0,207	-0,020	-0,010	-0,011	0,158	-0,011	0,272	0,103	0,160	0,150
2,5%	0,188	0,150	-0,028	-0,015	-0,017	0,107	-0,018	0,217	0,064	0,109	0,105
97,5%	0,305	0,264	-0,012	-0,005	-0,006	0,208	-0,006	0,330	0,152	0,216	0,196

F_O: frequência de alelos nulos observada; F_M: frequência mediana de alelos nulos.

Para maior eficiência da informação obtida com a caracterização destes locos microssatélites, é necessário que eles sejam independentes. Portanto, para constatar isto foi realizada análise de desequilíbrio de ligação e foi encontrado significativo desequilíbrio de ligação nos pares de locos Bd 16 e Bd 17, Bd 17 e Bd 06M, Bd 16 e Bd 09, Bd 16 e Bd 06. Logo, realizou-se as análises de estruturação subsequentes excluindo-se os locos Bd 16, Bd 17 devido à redundância e os locos Bd 26 e Bd 06 pela frequência de alelos nulos.

O programa STRUCTURE 2.2 (PRITCHARD et al., 2000) foi utilizado para agrupar as subpopulações em “clusters” de acordo com a abordagem bayesiana. Utilizou-se o modelo “admixture model” com frequências alélicas correlacionadas. O estimador de Evanno et al., 2005 (Figura 20) foi usado para indicar o valor de K que melhor acomoda a diversidade alélica observada. As subpopulações, de Campos do Jordão, 1 e 2 são delimitadas geneticamente (Figura 21). Foi observada diferenciação na população Campos do Jordão, a maior altitude, em metade dos genótipos da primeira área e todos encontrados na segunda.

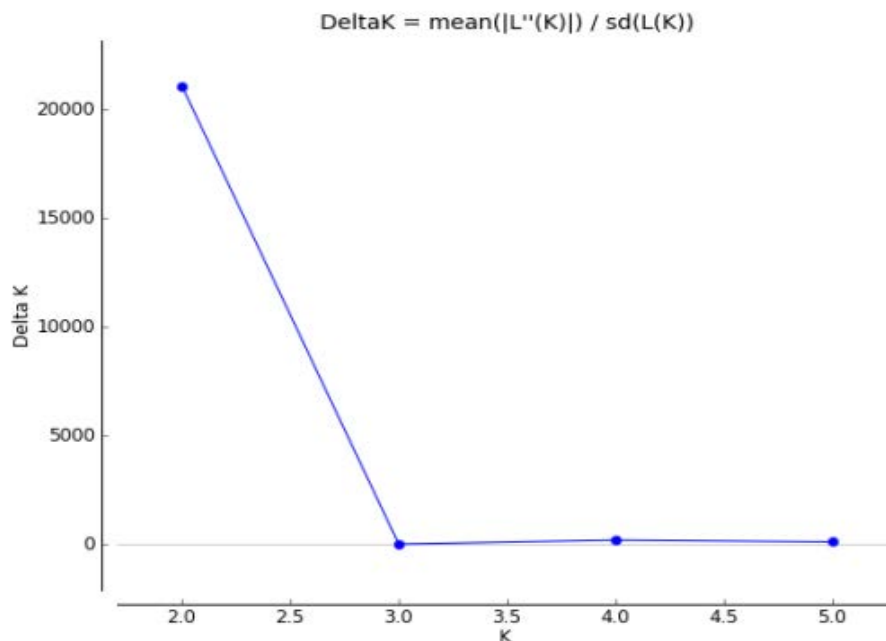


Figura 20. Delta K de Evanno (Evanno et al., 2005) que indica que $K = 2$ acomoda melhor os dados, Campinas-SP.

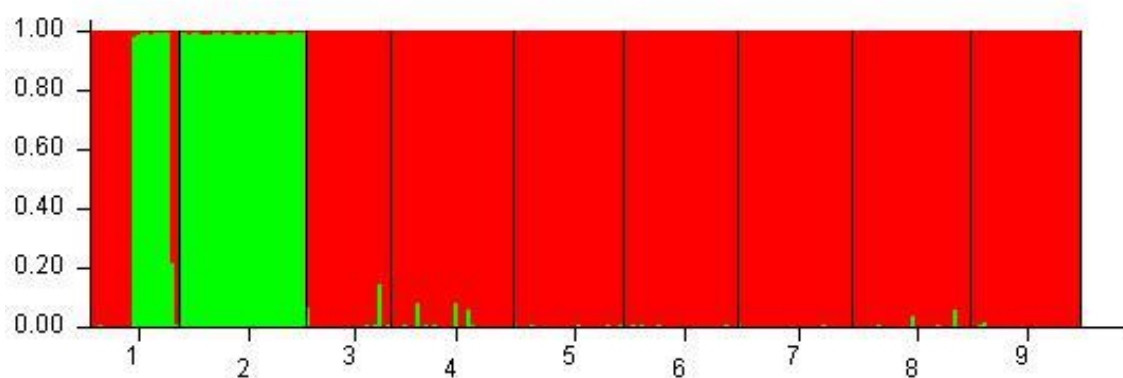


Figura 21. 1-3 Campos do Jordão, 4-6 Ubatuba; 7-9 Campinas. Análise bayesiana de agrupamento utilizando genótipos multilocos (Evanno et al., 2005), admitindo admixture model, contendo 2 populações ($k=2$), demonstradas pelas respectivas cores. As subpopulações são representadas por linhas verticais coloridas. A mesma cor em subpopulações diferentes indica que elas pertencem ao mesmo cluster, Campinas-SP.

O resultado da análise de coordenadas principais mostrou maior diferenciação para Campos do Jordão em relação às demais populações. A população de Ubatuba foi a que apresentou menor diversidade genética evidenciada pela menor distribuição dos indivíduos. Além disso, as populações de Ubatuba e Campinas compartilham semelhanças (Figura 22).

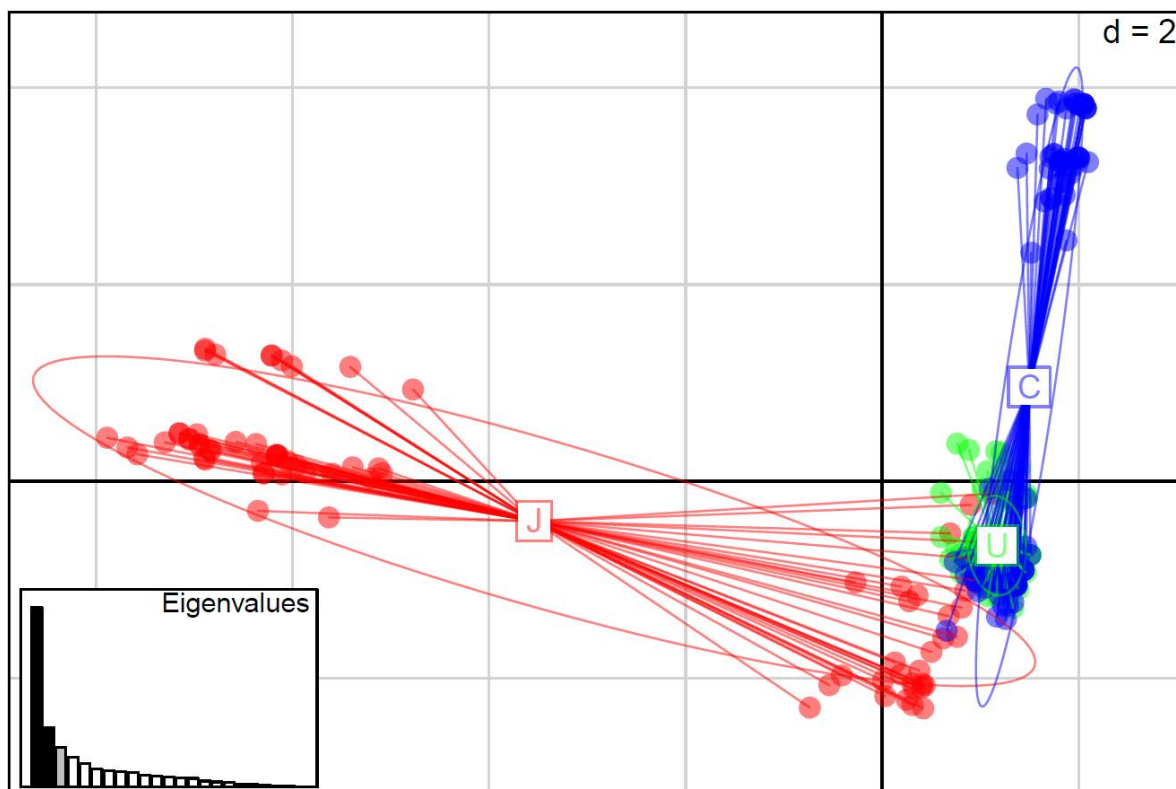


Figura 22. Análise das coordenadas principais (PCoA) de três populações de *B. dracunculifolia* indicando que as diferentes cores são conjuntos genéticos específicos, Campinas-SP.

A análise de agrupamento (Figura 23) também mostra semelhança entre as frequências alélicas de Campinas e Ubatuba e que Campos do Jordão é a população mais diferenciada das demais.

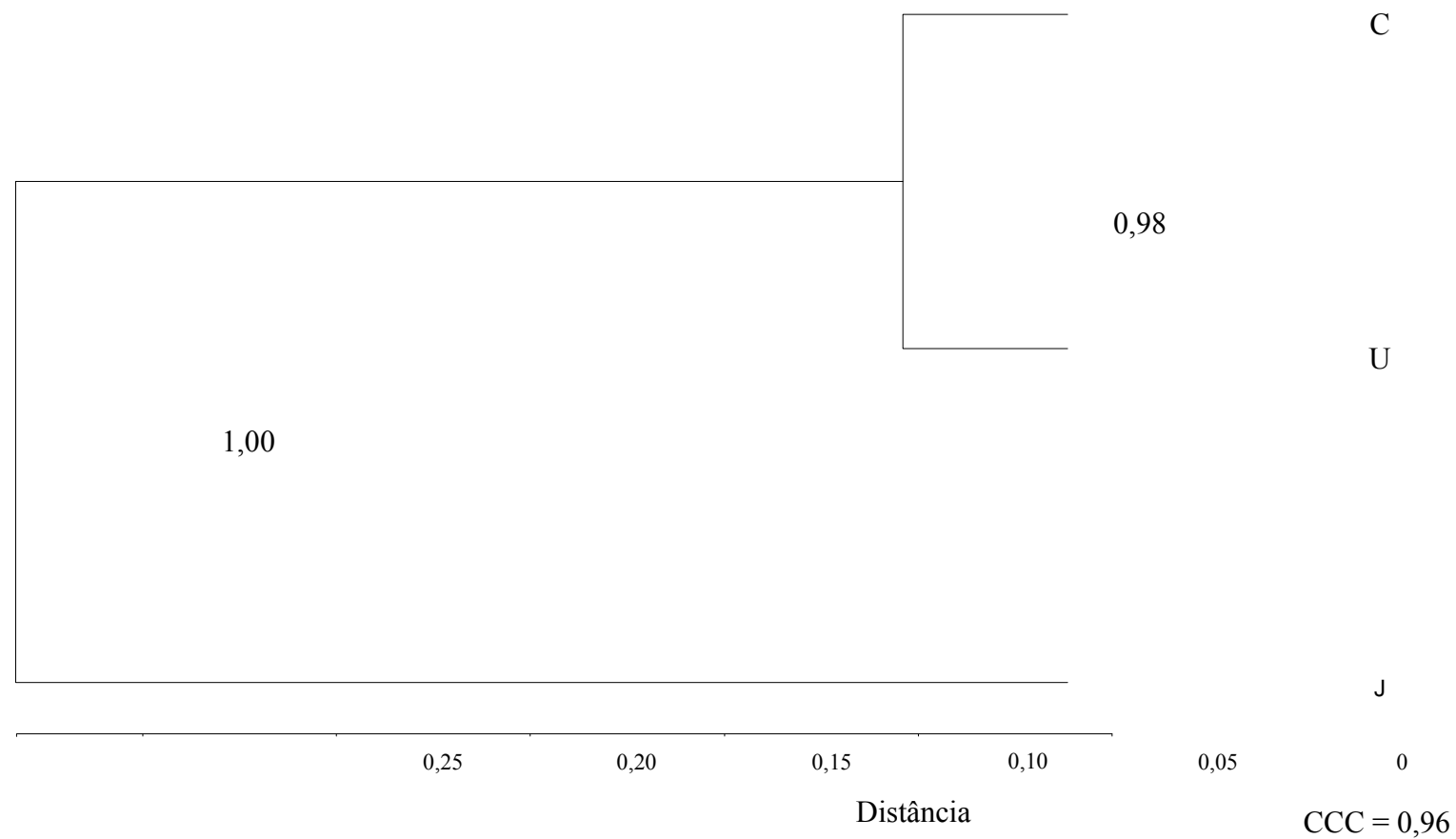


Figura 23. Padrão de divergência genética entre 3 populações *B. dracunculifolia*, definido pelo agrupamento UPGMA, com base na distância genética de Nei (1978). Coeficiente de correlação cofenética = 0,96, Campinas-SP.

As matrizes das distâncias geográficas foram comparadas com as matrizes de distâncias genéticas, quando as distâncias geográficas são baixas (Campos do Jordão e Ubatuba) não há correlação positiva entre o aumento dessas distâncias e o aumento da distância genética. No entanto, com o aumento da distância (Campinas e Ubatuba, Campinas e Campos do Jordão) a correlação entre a distância geográfica e a distância genética é alta e positiva (Figura 24).

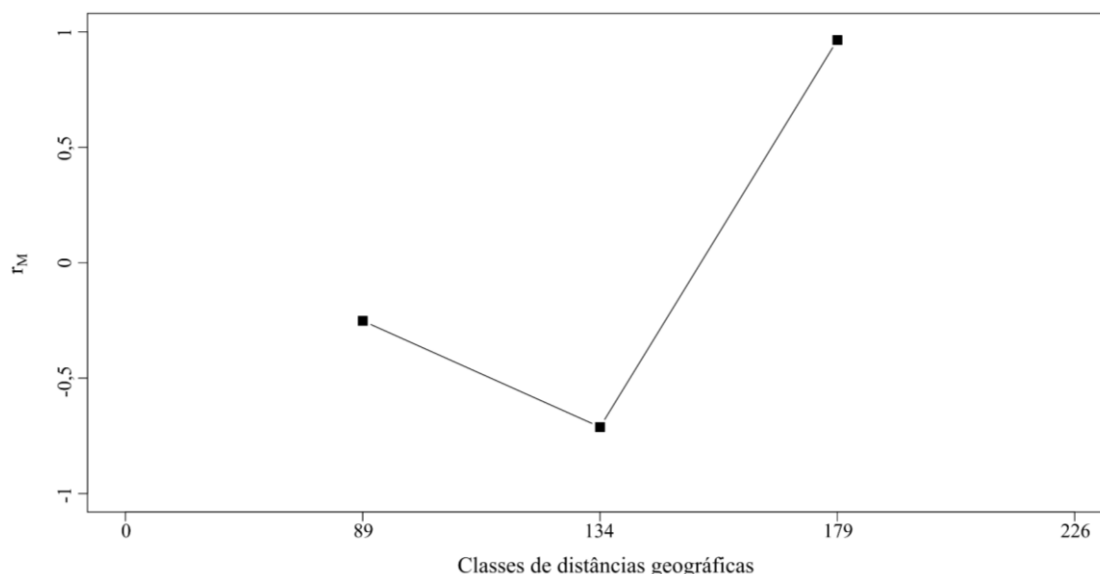


Figura 24. Correlograma de Mantel das distâncias geográficas e genéticas das três populações naturais de *B. dracunculifolia*. Correlação matricial de Pearson = 0,65, Campinas-SP.

Como *B. dracunculifolia* possui sementes de característica ortodoxa e cuja viabilidade pode ser mantida por longos períodos quando armazenadas nas condições ideais é sugerido planejamento de coleta de sementes provenientes dos dois grupos formados, enfatizando que a população de Campos do Jordão, a maior altitude do estado de São Paulo, por se diferenciar de Campinas e de Ubatuba, como observado nos grupos genéticos obtidos pelo STRUCTURE, PCoA e dendrograma, merece atenção maior, já que a diversidade presente pode estar comprometida, pois a espécie se desenvolve em áreas degradadas e alteradas que por não estarem protegidas, podem deixar de existir. Assim é de suma importância à conservação, *in situ* e *ex situ*, dessas populações estudadas, para que haja material para atividades futuras de pesquisa, restauração ecológica, cultivo e melhoramento genético. Estes grupos podem ser o ponto de início para a conservação do germoplasma da espécie.

4.4. Óleo Essencial das Populações Naturais

4.4.1 Rendimento dos óleos essenciais das populações naturais

Conforme os resultados apresentados nas figuras 25, 26 e 27, pode-se observar que em média, as populações de Ubatuba apresentaram a melhor média de rendimento (0,88%), com destaque para o indivíduo 19 de 2012 com rendimento de 2,83%, superior a todos os indivíduos em relação às três populações estudadas, seguidas das de Campinas (0,79%), com destaque para o indivíduo 25 de 2012 com rendimento de 1,75%; e com menor porcentagem de rendimento foi Campos do Jordão (0,46%), com destaque para o indivíduo 21 de 2012 com rendimento de 1,40%. Esses resultados foram superiores aos encontrados por Figueiredo et. al (2012) estudando a mesma espécie, os quais variaram de 0,17 a 0,27%. Também foram superiores quando comparados aos resultados de Agostini et al. (2005) que encontraram maior rendimento para *B. articulata* (0,5%) e menor para *B. semiserrata* (0,01%).

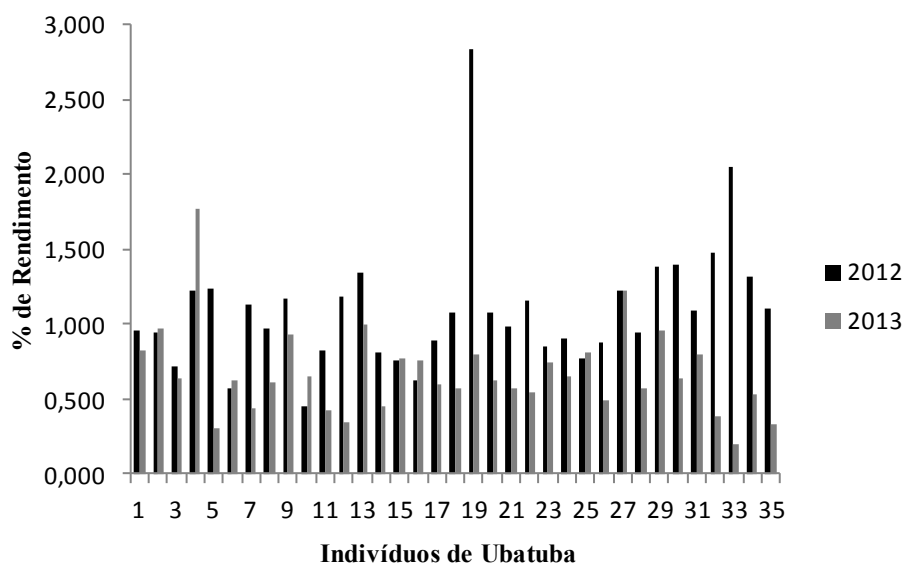


Figura 25. Rendimento de óleo essencial de *B. dracunculifolia* das populações naturais de Ubatuba, Campinas-SP.

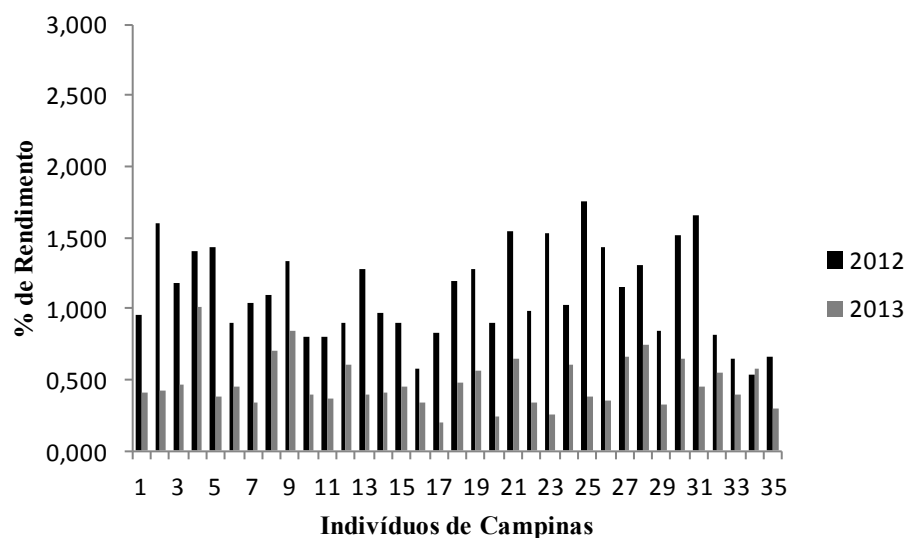


Figura 26. Rendimento de óleo essencial de *B. dracunculifolia* das populações naturais de Campinas 2012 e 2013, Campinas-SP.

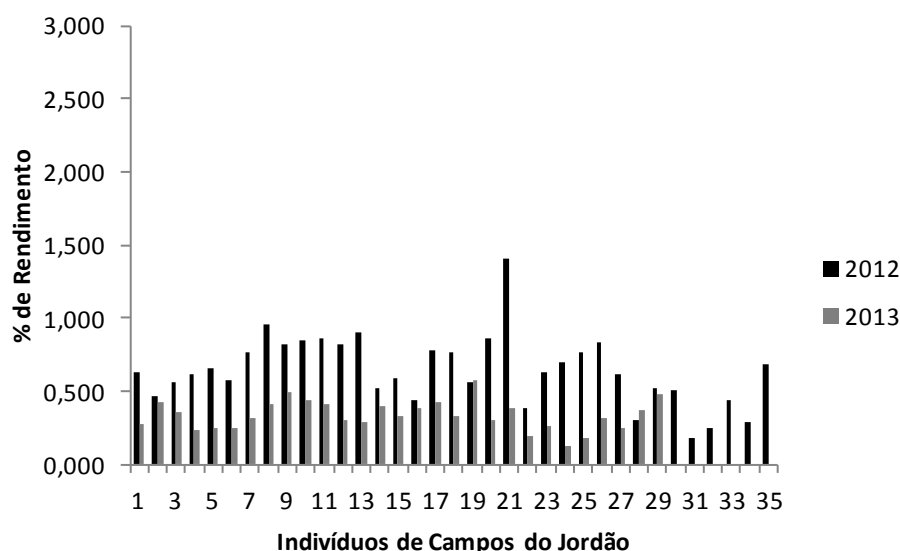


Figura 27. Rendimento de óleo essencial de *B. dracunculifolia* da população natural de Campos do Jordão, Campinas-SP.

4.4.2 Caracterização da composição química dos óleos essenciais das populações naturais

Por meio da análise da composição química dos óleos essenciais das três populações naturais de *B. dracunculifolia*, verificou-se 56 constituintes no total e somente oito desses foram comuns às populações coletadas nos anos de 2012 e 2013. Destes, dois pertencem à classe dos monoterpenos (limoneno e β -pineno) e cinco dos sesquiterpenos (*trans*-nerolidol, espatulenol, δ -cadineno, *trans*-cariofileno e α -humuleno) (Tabela 18). Analisando os compostos dentro das populações, o limoneno, nas populações de Campinas 2012 e 2013, apresentou a maior variação (0,3 a 21,4 e 0,5 a 16,7,

respectivamente), seguidas de Campos do Jordão (0,2 a 1,1 e 1,3 a 15,9) e Ubatuba (1,8 a 9,6 e 0,4 a 10,7). Para o composto β -pineno as populações seguiram a mesma tendência do limoneno. Os sesquiterpenos também diferenciaram dentro das populações. O *trans*-nerolidol teve maior variação dentro de Campos do Jordão, principalmente para a população de 2012 (1,3 a 52,3). A população de Campos do Jordão 2012 é a mais homogênea em compostos, possui a maior variação de *trans*-nerolidol e maior proporção relativa máxima de espatulenol (Tabela 18).

O *trans*-nerolidol foi a substância majoritária para todas as populações independente do período de coleta (variando de 21,6 a 40,8%), seguido do espatulenol (10,8 a 22,6%), limoneno (0,2 a 6,7%), β -pineno (0,2 a 5,6%), δ -cadineno (0,1 a 2,9%), *trans*-cariofileno (0,1 a 2,6%), 1-epi-cubenol (0,4 a 0,9%) e α -humuleno (0,3 a 3,3%) (Tabela 19).

As populações, em média, de Ubatuba 2013 e Campinas 2012 apresentaram maior proporção relativa de *trans*-nerolidol: 40,8% e 39,7%, respectivamente. A porcentagem relativa média de espatulenol foi superior para Ubatuba 2012 (22,6%) e menor para Campinas 2012 (10,8%).

Quando analisada a classe dos monoterpenos, os óleos essenciais da população de Campinas 2013 apresentaram a maior proporção relativa média de limoneno (6,7%), seguida de Campos do Jordão 2013 (6,0%) e de Campinas 2012 (5,1%). Para o β -pineno, Campos do Jordão 2013 obteve a maior proporção relativa (5,6%), seguida de Campinas 2013 (3,9%) e de Ubatuba 2013 (2,3%).

Todos os óleos essenciais avaliados tiveram em média, maior porcentagem relativa de sesquiterpenos oxigenados (75,0% Ubatuba 2013, 70,1% Ubatuba 2012, 67,5% Campinas 2012, 63,0% Campinas 2013, 59,5% Campos do Jordão 2012 e 50,3% Campos do Jordão 2013), esses resultados corroboram com o estudo realizado por Sforcin et al. (2012) para a mesma espécie. Inúmeras atividades biológicas já foram comprovadas para as substâncias sesquiterpênicas, o que pode indicar o óleo essencial de *B. dracunculifolia* uma fonte potencial de produtos aromáticos, sanitizantes, farmacêuticos e terapêuticos (LIMBERGER et al., 2004; ARRUDA et al., 2005; MACEDO et al., 2002).

Tabela 18. Composição química (%) do óleo essencial da parte aérea de *B. dracunculifolia* das populações naturais de Campinas, Campos do Jordão e Ubatuba coletadas nos anos de 2012 e 2013, Estado de São Paulo.

Componentes	IR _{exp}	Campinas				Ubatuba				Campos do Jordão			
		% relativa em área								12		13	
		Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
santolina trieno	908	-	-	-	-	-	-	0,2	2,4	-	-	-	-
α -tujeno	930	-	-	0,1	0,7	tr	tr	-	-	-	-	-	-
α -pineno	939	1,5	4,7	0,2	7,0	0,1	0,8	-	-	0,2	7,3	0,2	6,5
sabineno	975	tr	tr	-	-	tr	tr	-	-	0,2	1,9	-	-
β -pineno	979	0,1	6,6	0,3	20,3	4,7	10,4	0,3	8,8	0,3	2,7	0,7	14,9
mirceno	990	0,3	2,5	0,2	2,5	tr	tr	0,2	1,3	-	-	0,2	2,2
p-cimeno	1024	0,1	7,5	0,2	3,9	tr	tr	-	-	-	-	-	-
limoneno	1029	0,3	21,4	0,5	16,7	1,8	9,6	0,4	10,7	0,2	1,1	1,3	15,9
linalol	1096	0,2	1,2	0,3	1,4	tr	tr	0,2	0,6	0,2	1,3	-	-
<i>trans</i> -pinocarveol	1139	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	3,2	0,3	3,0
<i>trans</i> -sabinol	1142	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	1,1	0,2	0,2
pinocarvona	1164	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	2,2	0,2	1,2
terpinen-4-ol	1177	0,2	0,4	-	-	0,2	0,8	-	-	0,3	5,6	-	-
α -terpineol	1188	-	-	0,3	0,9	tr	tr	0,3	0,3	0,4	2,0	0,2	0,8
mirtenol	1195	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	1,5	0,2	3,5
<i>trans</i> -carveol	1216	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	1,8	-	-
carvona	1243	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	9,2	-	-
acetato de nerila	1361	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	1,7	-	-
α -copaeno	1374	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,7	-	-
β -elemeno	1390	0,3	0,8	-	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -cariofileno	1419	0,8	7,1	0,2	3,6	tr	tr	0,9	2,7	0,8	6,3	0,6	3,1
aromadendreno	1441	tr	tr	0,3	3,1	0,3	0,7	0,3	0,6	1,0	1,1	-	-

α -humuleno	1454	0,4	1,4	0,3	0,9	0,6	1,4	0,3	1,1	0,7	10,4	0,2	0,9
óxido de cabreuva B	1464	0,4	1,6	0,2	1,9	-	-	0,3	1,2	0,4	1,6	-	-
óxido de cabreuva D	1480	0,61	1,7	0,2	1,4	1,3	3,0	0,2	1,1	0,8	1,1	-	-
amorfa 4,7 (11) dieno	1481	-	-	0,2	7,1	0,2	2,4	0,3	7,5	-	-	-	-
germacreno D	1485	0,6	13,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	4,6
<i>trans</i> -muurolo-4(14),5-dieno	1493	-	-	-	-	1,1	6,9	-	-	-	-	-	-
biciclogermacreno	1500	0,3	10,3	1,2	9,5	0,6	6,9	1,5	5,1	1,2	5,3	0,4	5,2
α -muurolo	1500	tr	tr	0,4	9,6	tr	tr	-	-	0,3	3,8	-	-
γ -cadineno	1513	0,5	1,4	0,3	3,3	0,4	1,4	-	-	0,5	1,9	0,5	0,9
δ -cadineno	1523	1,0	4,7	0,5	3,3	0,6	4,7	0,9	2,6	0,3	1,2	0,4	2,8
<i>trans</i> -nerolidol	1563	24,5	53,3	11,6	48,6	8,8	55,2	15,5	57,5	1,3	52,3	6,3	38,5
espatulenol	1578	5,6	20,9	5,3	27,4	11,3	41,7	11,9	33,6	8,7	53,7	14,6	40,1
óxido de cariofileno	1583	2,2	6,3	2,6	6,1	-	-	2,7	6,5	2,9	19,1	3,5	11,7
globulol	1590	-	-	0,2	3,8	3,2	8,9	-	-	0,5	4,5	tr	tr
viridiflorol	1592	tr	tr	-	-	0,2	3,0	tr	tr	-	-	-	-
salvial-4(14)-en-1-ona	1594	-	-	-	-	-	-	tr	tr	-	-	-	-
ledol	1602	0,8	2,4	-	-	0,3	3,2	-	-	-	-	0,5	1,7
β -oplopenona	1607	-	-	tr	tr	-	-	0,3	1,0	-	-	-	-
humuleno epóxido II	1608	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	2,7	-	-
1-epi-cubenol	1628	0,4	0,9	0,2	1,5	0,3	1,2	0,2	0,8	0,5	4,9	0,3	1,1
muurolo-4,10(14)-dien-1- β -ol	1631	0,3	1,4	-	-	0,7	2,0	-	-	-	-	-	-
epi- α -cadinol	1640	1,2	4,7	-	-	0,7	6,8	-	-	-	-	-	-
epi- α -muurolo	1642	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	1,8	-	-
α -muurolo	1646	-	-	0,9	4,0	0,5	1,4	0,5	2,9	0,5	2,0	1,6	5,0
cubenol	1646	-	-	0,4	3,2	-	-	0,9	2,6	1,2	1,4	0,4	1,1
α -cadinol	1654	1,6	7,0	-	-	1,3	6,0	tr	tr	0,6	1,8	-	-
α -santalol	1675	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5	2,4	-	-
kusinol	1680	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	4,7
germacra-4(15),5,10 (14)-trien-1- α -ol	1686	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	2,7	-	-

eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol	1688	0,7	3,7	-	-	2,3	5,5	-	-	1,1	7,1	-	-
shibunol	1689	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4	1,1	-	-
<i>cis</i> -farnesol	1715	-	-	0,3	1,0	-	-	0,4	1,4	0,4	2,6	0,4	2,6
<i>trans</i> -farnesol	1741	-	-	-	-	-	-	0,3	0,4	-	-	-	-

*IR_{exp}: índice de retenção; tr: traço; -: ausência de substância; Mín.: porcentagem mínima; Máx.: porcentagem máxima.

Tabela 19. Composição química média (%) do óleo essencial da parte aérea de *B. dracunculifolia* das populações naturais de Campinas, Campos do Jordão e Ubatuba coletadas nos anos de 2012 e 2013, Estado de São Paulo.

Componentes	IR _{exp}	Campinas		Ubatuba		Campos do Jordão	
		% relativa em área					
		2012	2013	2012	2013	2012	2013
santolina trieno	908	-	-	-	0,9	-	-
α -thujeno	930	-	0,1	tr	-	-	-
α -pineno	939	1,5	1,5	0,4	-	0,9	1,6
sabineno	975	tr	-	tr	-	0,4	-
β -pineno	979	1,8	3,9	1,8	2,3	0,2	5,6
mirreno	990	0,9	0,8	tr	0,4	-	0,5
p-cimeno	1024	0,5	0,1	tr	-	-	-
limoneno	1029	5,1	6,7	1,9	4,1	0,2	6,0
linalol	1096	0,6	0,3	tr	0,1	0,2	-
<i>trans</i> -pinocarveol	1139	-	-	-	-	0,2	0,8
<i>trans</i> -sabinol	1142	-	-	-	-	0,1	tr
pinocarvona	1164	-	-	-	-	0,5	0,4
terpinen-4-ol	1177	0,3	-	0,1	-	2,1	-
α -terpineol	1188	-	0,2	tr	tr	0,8	0,3
mirtenol	1195	-	-	-	-	0,6	1,0
<i>trans</i> -carveol	1216	-	-	-	-	0,9	-
carvona	1243	-	-	-	-	3,6	-
acetato de nerila	1361	-	-	-	-	0,1	-
α -copaeno	1374	-	-	-	-	0,2	-
β -elemeno	1390	0,5	-	tr	-	-	-
<i>trans</i> -cariofileno	1419	2,6	1,3	tr	1,6	0,1	1,2
aromadendreno	1441	tr	1,1	0,2	0,2	Tr	-
α -humuleno	1454	0,7	0,5	0,8	0,6	3,3	0,3
óxido de cabreuva B	1464	1,0	0,6	-	0,6	0,7	-
óxido de cabreuva D	1480	1,1	0,7	0,8	0,6	Tr	-
amorfa 4,7 (11) dieno	1481	-	2,3	0,9	3,3	-	-
germacreno D	1485	4,9	-	-	-	3,0	1,9
<i>trans</i> -muurolo-4(14),5-dieno	1493	-	-	3,4	-	-	-
biciclogermacreno	1500	4,9	4,5	3,2	3,3	-	1,9
α -muuroleno	1500	tr	2,2	tr	-	1,5	-

γ-cadineno	1513	0,9	0,6	0,4	-	0,7	0,2
δ-cadineno	1523	2,9	2,2	2,0	1,6	0,1	1,5
<i>trans</i> -nerolidol	1563	39,7	33,4	32,7	40,8	24,0	21,6
espatulenol	1578	10,8	18,3	22,6	19,6	19,6	18,1
óxido de cariofileno	1583	3,5	4,5	-	4,0	5,4	4,7
globulol	1590	-	0,8	5,3	-	0,9	tr
viridiflorol	1592	tr	-	0,8	tr	-	-
salvial-4(14)-en-1-ona	1594	-	-	-	tr	-	-
ledol	1602	1,7	-	1,9	-	-	-
β-oplopenona	1607	-	0,2	-	0,4	-	-
humuleno epóxido II	1608	-	-	-	-	0,2	-
1-epi-cubenol	1628	0,6	0,7	0,6	0,4	0,9	0,5
muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol	1631	0,8	-	1,2	-	-	-
epi-α-cadinol	1640	2,7	-	2,0	-	-	-
epi-α-muurolol	1642	-	-	-	-	0,8	-
α-muurolol	1646	-	2,0	0,8	1,2	1,0	1,9
cubenol	1646	-	1,0	-	1,7	tr	0,7
α-cadinol	1654	3,7	-	2,9	tr	1,0	-
α-santalol	1675	-	-	-	-	0,6	-
kusinol	1680	-	-	-	-	-	2,3
germacra-4(15),5,10 (14)-trien-1-α-ol	1686	-	-	-	-	0,8	-
eudesma-4(15),7-dien-1-β-ol	1688	1,9	-	3,4	-	3,4	-
shiobunol	1689	-	-	-	-	0,2	-
<i>cis</i> -farnesol	1715	-	0,8	-	0,7	-	0,5
<i>trans</i> -farnesol	1741	-	-	-	0,1	-	-
% de Identificação		95,6	91,3	90,1	88,5	79,2	73,5
Monoterpenos hidrocarbonetos		9,8	13,1	4,1	7,7	1,7	13,7
Monoterpenos oxigenados		0,9	0,5	0,1	0,1	9,1	2,5
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		17,4	14,7	10,9	10,6	8,9	7,0
Sesquiterpenos oxigenados		67,5	63	75	70,1	59,5	50,3
Desvio Padrão		7,8	6,9	7,7	9,3	5,1	5,6

*IR_{exp}: índice de retenção; tr: traço; -: ausência de substância.

Utilizou-se da Análise de Componentes Principais (PCA) como ferramenta para análise exploratória e de reconhecimento de padrões, para verificar se as populações estudadas nas três altitudes formariam diferentes padrões de óleo essencial, e também, analisaram-se as características quantitativas dos padrões, o que permitiu extrair informações pertinentes a respeito do perfil químico do óleo essencial, revelando existência de tendências intrínsecas subjacentes aos dados, com formação de três agrupamentos, cada um correspondendo as populações de *B. dracunculifolia* em relação às altitudes.

A Figura 28A-B, apresenta a projeção dos pontos experimentais nos eixos definidos pelas duas primeiras componentes principais, que exprimiram 72,08% da variação original dos dados (CP1: 46,66% e CP2: 25,42%); suficiente para sustentar a hipótese alternativa da existência de divergência química interpopulacional no óleo essencial de *B. dracunculifolia*, sob o ponto de vista quantitativo.

A tabela 20 apresenta a divergência química interpopulacional do óleo essencial, sob o ponto de vista qualitativo, pois cada população foi formada por grupos distintos de compostos químicos minoritários. Apesar de serem pouco estudados, os compostos minoritários presentes nos óleos essenciais também exercem um papel importante nas funções biológicas dos metabólitos secundários, por exemplo, o óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*, mostrou maior efeito antifúngico que o composto isolado β -pineno, indicando um efeito sinérgico entre os fitoquímicos presentes no óleo essencial avaliado. O efeito sinérgico do β -pineno com outros compostos (canfeno, linalol, felandreno, limoneno, p-cimeno, etc) pode exercer maior atividade antifúngica (MOREIRA et. al, 2007). Segundo Purnhagen (2010) as substâncias presentes em menor quantidade contribuem para a ação biológica dos terpenos possivelmente pelo sinergismo entre os componentes.

O gráfico de dispersão indica que, dos constituintes que foram identificados, nas populações de Campinas e Ubatuba dos anos de 2012 e 2013, os espécimes estão correlacionados com o acúmulo de sesquiterpenos. Nas populações de Campos do Jordão dos anos de 2012 e 2013, os espécimes correlacionaram com o acúmulo de sesquiterpenos e monoterpenos.

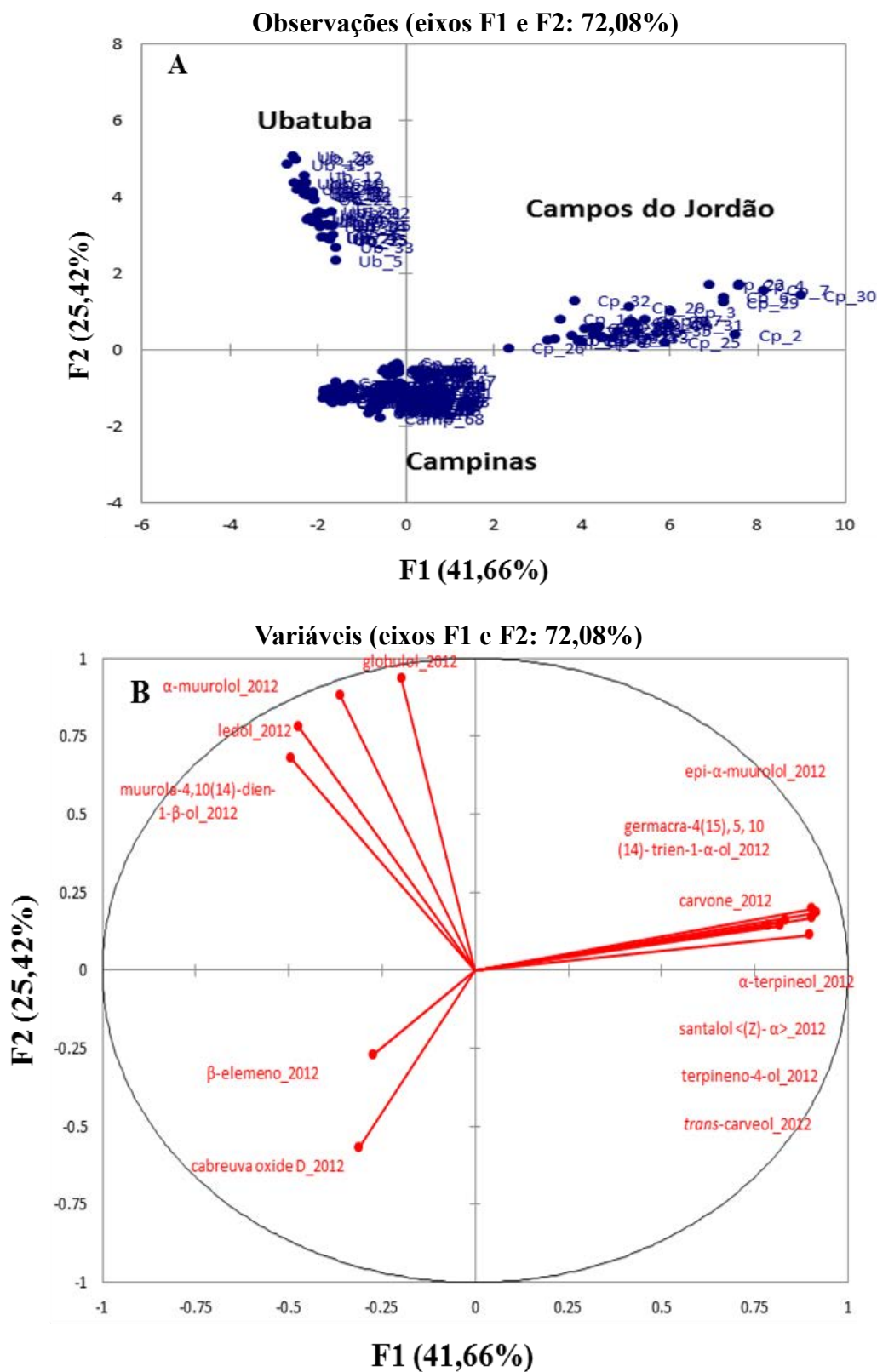


Figura 28 A-B. Dispersão das seis populações de *Baccharis dracunculifolia* em três grupos pela PCA A. Dispersão dos três componentes principais da PCA, espécimes de populações naturais de Campinas, Ubatuba e Campos do Jordão B.

Tabela 20. Divergência química interpopulacional da PCA, sob o ponto de vista qualitativo.

Ubatuba	Campinas	Campos do Jordão
globulol_2012	β -elemeno_2012	epi- α -muurolol_2012
α -muurolol_2012	óxido de cabreuva D_2012	germacra-4(15), 5, 10(14)-trieno-1 α -ol_2012
ledol_2012		carvona_2012
muurola-4,10(14)-dieno-1 β -ol_2012		α -terpineol_2012
		α -santalol-(Z)_2012
		terpineno-4-ol_2012
		<i>trans</i> -carveol_2012

Para confirmação das tendências reveladas *a priori* (PCA), foi conduzida provação através do método supervisionado de Análise Discriminante (LDA) (Figura 29 A-B). Foi estimada a medida de significância do lambda de Wilks para validação da hipótese alternativa.

As funções F1 e F2 foram responsáveis por descrever os respectivos 88,75% e 11,25% (total de 100%) da variabilidade contida nos dados originais e foram observados alguns acessos de Campinas com comportamento atípico, ou seja, inseridos na linha do eixo das populações de Ubatuba. *A posteriori*, constatou que os agrupamentos químicos coadunaram-se com as tendências reveladas pela análise exploratória (PCA), mesmo que alguns acessos interligaram as elipses das populações de Campinas e de Ubatuba, formaram três grupos, podendo ser visualizados pela figura 29 B. Dessa forma, sugere que a diversidade química do óleo essencial das populações de *B. dracunculifolia* sofre a influência da altitude, em especial para os compostos químicos das populações de Campos do Jordão (Figura 29 A-B). Sendo as populações de Campos do Jordão as mais isoladas. Portanto a interação genótipo x ambiente favorece a expressão dos genes para a síntese dos componentes do óleo essencial de *B. dracunculifolia*. O teste estatístico do Lambda de Wilks ($p < 0,05$) revelou existência de variação sistemática (Lambda: 0,001; F Valor observado: 46,035; F Valor crítico: 1,524; GL1: 26; GL2: 390; p-valor: $< 0,0001$; alfa: 0,05), ou seja, comprovou que a divergência interespecífica na composição química do óleo essencial da espécie, sob o ponto de vista quantitativo, é significativa. Logo a hipótese alternativa pôde ser aceita. Santana (2013) comparou o perfil químico de três populações de *B. reticularia*, pela análise discriminante e, encontrou três perfis para as populações estudadas.

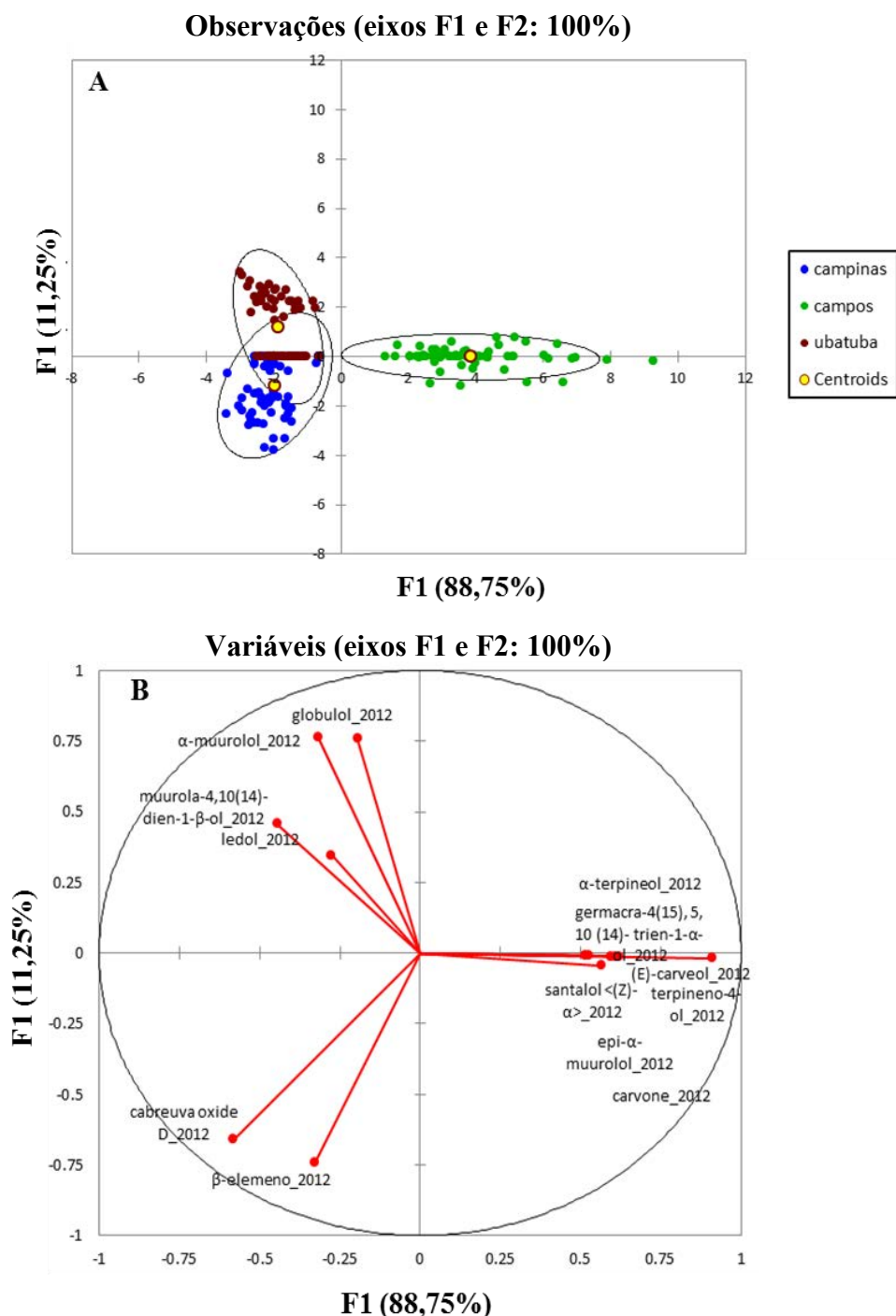


Figura 29 A-B. Centroides das funções discriminantes para caracterização química do óleo essencial das seis populações de *B. dracunculifolia* A, Diagrama vetorial exibindo as correlações negativas e positivas das 50 variáveis do primeiro e segundo fator oriundo da Análise Discriminante Linear B.

A importância de se conservar a diversidade interpopulacional de *B. dracunculifolia*, bem como seus ecossistemas de ocorrência para a segurança de programas futuros relacionados à produção agrícola e à conservação de recursos genéticos e de

fitofármacos deve ser ressaltada, uma vez que se trata de uma espécie com potencial e de atual importância socioeconômica.

5. CONCLUSÕES

Os óleos essenciais das seis populações naturais estudadas, neste trabalho, em gradiente altitudinal dos anos de 2012 e 2013, foram constituídos de 56 compostos, sendo, somente, oito constituintes comuns a todas as populações, destes, dois pertencem à classe dos monoterpenos (limoneno e β -pineno) e cinco dos sesquiterpenos (*trans*-nerolidol, espatulenol, δ -cadineno, *trans*-cariofileno e α -humuleno). As populações estudadas estão bem estruturadas quimicamente sugerindo que há a influência da altitude, sendo as populações de Campos do Jordão as mais isoladas.

Os 11 marcadores microsatélites desenvolvidos para o presente estudo apresentaram, em média, diversidade genética intermediária. O loco Bd 16 apresentou a menor diversidade, enquanto o loco Bd 10M foi o mais polimórfico. A população de Campos do Jordão apresentou maior diversidade genética, seguida de Campinas e de Ubatuba.

O rendimento, em média, de óleo essencial do teste de procedências e progênies foi satisfatório, juntamente com a produtividade do óleo essencial em kg/1000m². A característica de rebrota da massa fresca, em média das progênies, foi superior para a população de Campinas, seguida de Ubatuba e de Campos do Jordão, entretanto não diferiram estatisticamente entre si.

Todas as populações estudadas estavam localizadas em áreas degradadas e vulneráveis com risco de extinção justificando a preocupação em conservá-las, além disso, Campos do Jordão se sobressaiu por ter apresentado características químicas e genéticas diferenciadas. Assim se faz necessário à conservação *in situ* e *ex situ* dessas populações estudadas, para que haja restauração ecológica, cultivo sustentável e melhoramento genético em pesquisas futuras, visto a atual e crescente importância socioeconômica de *B. dracunculifolia*.

6. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Illinois, USA: Allured Publishing Corporation, 2007. 698 p.

AGOSTINI, F.; SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M. R.; ZATTERA, F.; WASUM, R.; SERAFINI, L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 3, p.215-220, Jul/Set, 2005.

AMMAR, I. B.; SONNANTE, G.; DRIDI, B. A. M.. Genetic variability in wild cardoon (*Cynara cardunculus* L. var. *sylvestris*) revealed by SSR markers and morphological traits. **Scientia Horticulturae**, v. 185, p.76-81, Março, 2015.

ARAÚJO, A. P. A.; CARNEIRO, M. A. A.; FERNANDES, G. W. Efeitos do sexo, do vigor e do tamanho da planta hospedeira sobre a distribuição de insetos indutores de galhas em *Baccharis pseudomyrriocephala* Teodoro (Asteraceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 487-490, Dez, 2003.

ARAÚJO, G. da S. **Seleção de progênies e estimativas de parâmetros genéticos em *Ageratum conyzoides* L. (ASTERACEAE) para caracteres morfo-agronômicos**. 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, 2010.

ARRUDA, D.C.; D'ALEXANDRI, KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 5, p. 1679-1687, 2005.

ASCARI, J.; NUNES, D. S.; MARQUES, M. B.; TARDIVO, R. C.; FILHO, V. C.; JUNIOR, A. W., 2006, Florianópolis, SC. **Composição química do óleo essencial de *Baccharis uncinella* DC**. Florianópolis, SC: Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC, Julho/2006.

BAJAY, M. M. **Diversidade e estrutura genética de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. em áreas em processo de restauração florestal e remanescentes de Mata**

Atlântica. 2014. 148 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade de São Paulo: “Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2014.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. Role of temperature and light in the germination ecology of buried seeds of weedy species of disturbed forests. I. *Lobelia inflata*. **Canadian Journal of Botany**, v. 70, n. 3, p. 589-592, 1992.

BASTOS, E., M., A., F. **Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no Estado de Minas Gerais, Brasil**. 2001. 137 f. Tese (Doutorado em Entomologia)-Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

BELINI, C. M. B.; FIGUEIRA, G. M.; ZUCCHI, M. I.; BAJAY, M. M.; HABER, L. L.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; VIEIRA, M. A. R. Medicinal and Aromatic Plant Collection of *Baccharis dracunculifolia* DC. Germplasm Bank. **Acta Horticulturae**, 2015 no prelo.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. 2.ed. Viçosa, BR: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 453p.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V. **Melhoramento de Plantas**. 5. Ed. - Viçosa, BR: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 529p.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P. J. L.; RISTERUCCI, A. M.; BAURENS, F. C. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, Les Ulis, France, v. 54, n. 4, p.277-288, 1999.

BROOKFIELD, J. F. Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 3, p. 453-455, Junho, 1996.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. 2. ed. França: Lavoisier Publishing, 1995. 819p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA, SECRETARIA DA DEFESA AGROPECUARIA. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.p. 399.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A., M.; FARAGO, P. V.; MATZENBACHER, N. I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I - Estudos botânicos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. João Pessoa, v. 15, n. 3, p. 268-271, Jul-Set/2005.

CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. Armazenamento de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. F. EX. Moore. São Paulo, **Acta bot. bras.** v. 17, n. 4, p. 609-617, Out-Dez/2003.

CARNEIRO, M., A., A.; FERNANDES, G., W. As relações conflituosas entre plantas e insetos, Herbivoria, **Ciência Hoje**. v. 20, p. 32-35, 1996.

CARVALHO, N., M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588p.

CARVALHO, L., R.; SILVA, E., A., A.; DAVIDE, A., C. Classificação de Sementes Florestais Quanto ao Comportamento no Armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Lavras, MG, v. 28, n. 2, p.15-25, 2006.

CASSEL, E.; FRIZZO, C. D.; VANDERLINDE, R.; ATTI-SERAFINI, L.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Extraction of *Baccharis* Oil by Supercritical CO₂. Montevideo,Uruguai, **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 39, p. 4803-4805, 2000.

ETTORI, L. C.; SATO, A. S.; SHIMIZU, J. Y. Variação genética em procedências e progênies mexicanas de *Pinus maximinoi*. **Revista do Instituto Florestal**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2004.

EVANNO, G.; REGNAUT S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Mol Ecol.**, Lausanne, Switzerland, v. 14, p. 2611–2620, 2005.

FABIANE, K. C.; FERRONATTO, R.; SANTOS, A. C. dos; ONOFRE, S. B. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae), **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 197-203, 2008.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v. 164, p. 1567–1587, Aug/2003.

FELIPPE, G. M.; SILVA, J. C. S. Estudos de germinação em espécies do cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, Rio de Janeiro, v. 7, p. 157-163, 1984.

FERRACINI, V., L. **Óleos Essenciais de *Baccharis* e sua interação com insetos polinizadores**. 1995, 205f. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

FERREIRA, A. G.; CASSOL, B.; ROSA, S. G. T. da; SILVEIRA, T. S.; STIVAL, A. L.; SILVA, A. A. Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. v. 15, n. 2, p. 231-242. São Paulo, 2001.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Recife, v. 6, p. 36-41, 2008.

FERREIRA, S. C.; OKANO-CARVALHO, R. M.; NAKAJIMA, J. N. A Família Asteraceae em um Fragmento Florestal. **Revista Rodriguésia**, Viçosa, Minas Gerais, Brasil., v. 60, n. 4, p. 903-942, 2009.

FERRONATTO, R. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.

FLORÃO, A. et al. Essential oils from *Baccharis* species (Asteraceae) have antiinflammatory effects for human cells. **Journal of Essential Oil Research**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 561-570, 2012.

FIGUEIREDO, P. M. S.; FABRI, E. G.; AMARAL, A. L. L. do. Extração de óleos essenciais de plantas aromáticas do banco de germoplasma do IAC. **6º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**. n.12113. Jaguariúna, 2012.

FRIZZO, C. D.; SERAFINI, L. A.; LAGUNA, S. E.; CASSEL, D. L.; DELACASSA, E. Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis dracunculifolia* DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 99-106, Mar-Abr/2008.

GALINDEZ, G., BIGANZOLI, F., ORTEGA-BAES, P., SCOPEL, A. L. Fire responses of three co-occurring Asteraceae shrubs in a temperate savanna in South America. **Plant Ecology**. v. 202, p. 149-158, Nov/2009.

GALVÃO, L. C. D. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Streptococcus mutans* and their Antiproliferative Effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2012, n. 1, p. 1-12, 2012.

GILBERTI, L., H. **Potencial para o uso da espécie nativa, *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) na fitorremediação de áreas contaminadas por arsênio**. 2012. 77 p. Tese (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Minas Gerais, 2012.

GIORDANI, S. C. O.; SILVEIRA, S. A. O. **Efeito da temperatura de armazenamento na longevidade de sementes de Vernoniae (Asteraceae)**. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil. p. 1-2, 2007.

GOLDSTEIN, D. B.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites: Evolution and applications**. 368 p. Oxford: Oxford University Press, Jun/1999.

GOMES, V.; FERNANDES, G. W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 421-427, Out-Nov/2002.

GOUDET, J. **Estimation and tests of hierarchical F-statistics**. Lausanne, Switzerland, 46 p., 2014.

GRATTAPAGLIA, D. Marcadores moleculares em espécies florestais: *Eucalyptus* como modelo. In: NASS, L.; VALOIS, A., C., C.; MELO, I., S.; VALADARES-INGLIS, M., C. **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p. 967-994. 2001.

GRUBER, B.; ADAMACK, A. T. Landgenreport: a new R function to simplify landscape genetic analysis using resistance surface layers. **Molecular Ecology Resources**, DOI: 10.1111/1755-0998.12381, v. 15, Set/2015.

GUO, S.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**. v. 48, p. 361–372, Jun/1992.

HABER, L. L. **Caracterização da diversidade genética via marcador microsatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.** 2008. 138 p. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2008.

HERRERA, C. M.; BAZAGA, P. Adding a third dimension to the edge of a species' range: altitude and genetic structuring in mountainous landscapes. **Heredity**, v. 100, p. 275–285, Mar/2010.

HEYWOOD, V., H. **Flowering plants of the world**. Oxford University Press: New York, 335 p., Nov/1993.

HOLM, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. **Scandinavian Journal of Statistics**. v. 6, n. 2, p. 65-70, 1979.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v. 23, p. 1801-1806, Jul/ 2007.

JARVIS, B., B.; MOKHTARI-REJALI, N.; SCHENKEL, E., P.; BARROS, C., S.; MATZENBACHER, N., I. Trichothecene mycotoxins from brazilian *Baccharis* species. **Phytochem**, v. 30, p. 789-797, 1991.

KAGEYAMA, P. Y. **Varição genética em progênies de uma população de *Eucalyptus grandis* (Hill) Maiden**. 1980. 125 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1980.

KAMVAR, Z.; LARSEN, M.; KANASKIE, A.; HANSEN, E.; GRÜNWARD N. Spatial and temporal analysis of populations of the sudden oak death pathogen in oregon forests. **Phytopatholog**, v. 105, n. 7, p. 982-989, 2015.

KIRST, M.; CORDEIRO, C. M.; REZENDE, G. D. S. P.; GRATTAPAGLIA, D. Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. **Journal of Heredity**, Washington, v.96, n. 2, p. 161–166, 2005.

KLEIN, A. L.; FELIPPE, G. M. **Germinação de ervas invasoras: escarificação e luz**. Anais do 8º Congresso da SBSP, p.47-56, 1992.

KLOPELL, F. C.; LEMOS, M.; SOUSA, J. P. B.; COMUNELLO, E; MAISTRO, E. L.; BASTOS, J. K. et al. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Z. Naturforsch**, v. 62, p. 537–542, Jul-Ag/2007.

LIMBERGER, R. P. et al. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H; JEAN, F. I. Essential Oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**, João Pessoa, v. 38. n. 2, p. 381-389, Abr-Jun/1995.

LUCAS, N. M. C.; ARRIGONI, M. F. Germinação de aquênios de *Canavalia rosea* (Sw) DC (Fabaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. v. 15, p. 105-112, 1992.

MACEDO, C., S. et al. Characterization of the isoprenoid chain of coenzyme Q in *Plasmodium falciparum*. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 207, n. 1, p. 13-20, 2002.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MATESANZ, S.; GIMENO, T. E.; CRUZ, M. de la.; ESCUDERO, A.; VALLADARES, F. Competition may explain the fine-scale spatial patterns and genetic structure of two co-occurring plant congeners. **Journal of Ecology**, v. 99, p. 838-848, Maio/2011.

MASSIGNANI, J. J. et al. Antiulcerogenic Activity of the Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* on Different Experimental Models in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p. 1355–1360, Out/2009.

MCLAFFERTY, F. W.; STAUFFER, D. **The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data**, v. 1-6, John Wiley Sons, New York, 1989.

MEDEIROS, A. C. S.; EIRA, M. T. S. **Comportamento Fisiológico, Secagem e Armazenamento de Sementes Florestais Nativas**. Circular Técnica 127, Embrapa, Colombo, PR, 2006.

MELO, A.T. O.; COELHO, A. S. G.; PEREIRA, M. F.; BLANCO, A. J. V.; FRANCESCHINELLI, E. V. Genética da Conservação de *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. (Meliaceae) em fragmentos florestais de mata atlântica na Apa Fernão Dias. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 39, n. 2, p. 365-374, 2015.

MEYER, S. E.; ALLEN, P. S.; BECKSTEAD, J. Achen germination regulation in *Bromus tectorum* (Poaceae) and its ecological significance. **Oikos**, v. 78, p. 475-485, 1997.

MOLT, O.; TRKA, A. 1983. **Parfum Kostmet.** 64: 488. apud Verdi LG, 2005.

MONTEIRO, P. P. M.; RAMOS, F. A. Beneficiamento e quebra de dormência de aquênios em cinco espécies florestais do cerrado. **Revista Árvore**. v.21, 169-174, 1997.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VAN DINGENEN, M. A.; TRAJANO, V. N. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential oil and beta-pinene on the growth of dematiaceous moulds. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38. n. 1, p.33-38, 2003.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. Michigan: Reference Publications, 2000.

NAKAJIMA, J. et al. **Asteraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB55>). Acesso em: 03.06.2015.

NAMKOONG, G. **Introduction to quantitative genetics in forestry**. Washington, USDA, 342 p., 1979.

NEGREIROS, D.; ESTEVES, D.; FERNANDES, G. W.; BERBARA, R. L. L.; OKI, Y.; VICHATO, M.; CHALUB, C. Growth-survival tradeoff in the widespread tropical shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) in response to a nutrient gradient. **Tropical Ecology**. v. 55, p. 167-176, 2014.

OLIVEIRA, A. F.; CARVALHO, D.; ROSADO, S. C. S. Taxa de cruzamento e sistema reprodutivo de uma população natural de *Copaifera langsdorffii* Desf. na região de Lavras (MG) por meio de isoenzimas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, p. 331-338, 2002.

OWEN, S. M.; PEÑUELAS, J. Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 10, p. 420-426, 2005.

PAQUETTE, S. R. **Useful functions for (batch) file conversion and data resampling in microsatellite datasets**. 25 p., 2012.

PARK, Y. K.; Paredes-Guzman, J. F.; Aguiar, C. L.; Alencar, S. M.; Fujiwara, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern

Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

PARREIRA, N. A. et al. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemical and Biodiversity**, Zurich, v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.

PURNHAGEN, L.R.P. **Estudo fitoquímico e antibacteriano do óleo essencial de *Baccharis uncinella* DC. do Município de Campo Alegre – SC.** 2010. 69 p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Regional de Blumenau – FURB, Blumenau, 2010.

RAJORA, O. M.; MOSSELER, A. Challenges and opportunities for conservation of forest genetic resources **Euphytica**, Wageningen, v.118, n.2, p.197–212, 2001.

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

R CORE TEAM. **Writing R extensions.** v 3.2.1, 167p. 2015.

RISTERUCCI, A. M.; GRIVET, L.; N'GORAN, J., A., K.; PIERETTI, I.; FLAMENT, M., H.; LANAUD, C. A high density linkage map of *Theobroma cacao* L. Theor. **Applied Genetics**. v. 101, p. 948–955, Out/2000.

RITLAND, K. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. **Evolution**, Lancaster, v. 43, n. 4, p. 848-859, 1989.

RODARTE, L. H. O.; FERNANDES, G. W.; OLIVEIRA, J. A. Características físico-químicas de solos naturais e em áreas degradadas por atividades de construção rodoviária em campo rupestre. **In: Anais do 3º Encontro Ibero-Americano de Unidades Ambientais do Setor de Transportes.** Florianópolis. 1998.

ROHLF, F. J. **NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. version 1.8. New York: Exeter Software, 1989.

ROSENBERG, N. A. DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. **Mol Ecol.**, Los Angeles, EUA, v. 4,n. 1, p. 37–138, 2004.

SAMPAIO, P. T. B.; RESENDE, M. D. V.; ARAÚJO, A. J. Estimativas de parâmetros genéticos e métodos de seleção para o melhoramento genético de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 11, p. 2243-2253, 2000.

SANTANA, A. M. S.; CARVALHO, R. I. N. Viabilidade e Capacidade de Armazenamento de sementes de Carqueja Coletadas em Três Municípios no Paraná. **Scientia Agraria**. v. 7, n. 1-2, p. 15-20, 2006.

SANTANA, H. C. D. de. **Caracterização química do óleo essencial de *Baccharis reticularia* DC. (Asteraceae) em função de diferentes procedências e da sazonalidade no Distrito Federal**. 2013. 73 p. Dissertação de Mestrado. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2013.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. de M.; BAKER, D.; ROCHA NETO, O. **Descrição de sistema e métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 6 p., 2004.

SAS INSTITUTE INC., **SAS/STAT ® User's Guide**, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1999.

SEBBENN, A. M. et al. Variação genética entre e dentro de procedências e progênies de *Araucaria angustifolia* no sul do estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 109-124, 2003.

SEBBENN, A. M.; ZANATTO, A. C. S.; MORAIS, E. Conservação genética *ex situ* de *Gallesia gorarema* Vell. Moq. no Estado de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 14, n. 2, p. 95-104, 2002.

SFORCIN, J. M.; et al. ***Baccharis dracunculifolia*: uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira**. São Paulo: Editora UNESP, 103 p., 2012.

SHI, M-M; MICHALSKI, S. G.; CHEN, X-Y; DURKA, W. Isolation by Elevation: Genetic Structure at Neutral and Putatively Non-Neutral Loci in a Dominant Tree of Subtropical Forests, *Castanopsis eyrei*. **PLOS ONE**, v. 6, p.1-8, 2011.

SHIMIZU, J., Y.; KAGEYAMA, P., Y.; HIGA, A., R. **Procedimentos e recomendações para estudos de progênies de essências florestais**. Curitiba: EMBRAPA – URPFCs, Série Documentos, 11, p. 33, 1982.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification**. San Francisco: W.H. Freeman, 573p., 1973.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 01, p. 71-78, 2002.

SILVA, F.; PARK, K. J.; MAGALHÃES, P. M.; MARTINS, G. N.; GAMA, E. V. S. Avaliação do teor de óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em diferentes embalagens durante o armazenamento. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 54-58, 2013.

SILVA, R. F.; BIZZO, H. R.; REZENDE, C. M.; SANTANA, H.; VIEIRA, R. F.; ALVES, R. B. N. **Estudo da composição química do óleo essencial das folhas de *Baccharis reticularia* DC. (Asteraceae) extraído por destilação por arraste a vapor**. Congresso Latino Americano por cromatografia e técnicas relacionadas. 528 p. 2012.

SLATKIN, M. A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencie. **Genetics**, v. 139, p.457-462, 1995

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, p. 939-966, 2001.

SOUZA, S. G. A.; VARELA, V. P. Tratamentos prégerminativos em aquênios de faveira orelha de macaco (*Enterolobium schomburgkii*, Benth.). **Acta Amazonica**, Amazonas, v. 19, p. 19-26, 1989.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5. ed. rev. atual. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS; UFSC, 2003.

STEINBAUER, M. J.; IRL, S. D. H.; BEIERKUHNLEIN, C. Elevation-driven ecological isolation promotes diversification on Mediterranean islands. **Acta Oecologica**. v. 47, p. 52-56, 2013.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. A regeneração de uma floresta tropical montana após corte e queima, São Paulo. *Revista Brasileira de Biologia* v. 59, p. 239-250, 1999.

TAKAKI, M. Communication – New proposal of classification of seeds based on forms of phytochrome instead of photoblastism. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p. 104-108, 2001.

TEKETAY, D. Germination ecology of *Acacia negrii*, an endemic multipurpose tree from Ethiopia. **Journal of Tropical Ecology**, v. 38, p. 39-46, 1997.

TEKETAY, D.; GRANSTRÖM, A. Germination ecology of forest species from the highlands of Ethiopia. **Journal of Tropical Ecology**, v. 14, p. 793-803, 1997.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 10, n. 7, p. 967-981, 2000.

VALOIS, A. C. C.; SALOMÃO, A. N.; ALLEM, A. C. **Glossário de recursos genéticos vegetais**. Documentos, 22. Brasília: Embrapa-SPI: Embrapa Cenargen, 62p., 1996.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ D. J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. Chromatography**, v. 11, 463-467, 1963.

XAVIER, V. B. **Investigação sobre compostos voláteis de espécies de *Baccharis* nativas do Rio Grande do Sul**. 2011. 104 p., Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2011.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis - a thin layer chromatography atlas. 2. ed. Berlin: **Springer**, 384 p., 1995.

WEI, X.; MENG, H.; JIANG, M. Landscape Genetic Structure of a Streamside Tree Species *Euptelea pleiospermum* (Eupteleaceae): Contrasting Roles of River Valley and Mountain Ridge. **PLoS ONE**. v. 8, e66928, 2013.

WEIR, B.; COCKERHAM, C. Estimating F statistics for the analysis of population structure. **Evolution**. v. 38, n. 6, p. 1358–1370, 1984.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p. 97-159, 1931.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4 ed. Prentice- Hall, New Jersey, 663 p., 1999.

7. APÊNDICE

Apêndice 1. Populações de *B. dracunculifolia* estudadas, número de amostras (No) por população e suas respectivas médias de informações geográficas.

População	No. de amostras	Latitude	Longitude	Altitude
Campinas	105	S22°45'44.49"	47°07' 48.8"W	680 m
Ubatuba	105	S23°23'47.43"	44°24' 55.14"W	02 m
Campos do Jordão	105	S22°76'30.40"	45°52' 41.36"W	1620 m
Total	315			

Apêndice 2. Cromatogramas, pelo CG-FID, do óleo essencial de três indivíduos de *B. dracunculifolia* das populações naturais de Campinas, Ubatuba e Campos do Jordão, respectivamente.

