

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

***Baccharis dracunculifolia* D.C.: DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA  
DE POPULAÇÕES**

**MARCELO RIGOTTI**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Horticultura.

BOTUCATU – SP

Fevereiro – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

***Baccharis dracunculifolia* D.C.: DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA  
DE POPULAÇÕES**

**MARCELO RIGOTTI**

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Agronomia – Área de Concentração em Horticultura.

BOTUCATU – SP

Fevereiro - 2011

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

Rigotti, Marcelo, 1968-  
R572b *Baccharis dracunculifolia* D.C. : diversidade genética e química de populações / Marcelo Rigotti. - Botucatu : [s.n.], 2011  
x, 94 f. : il. color., fots. color., mapas color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Agronomia, Botucatu, 2011

Orientadora: Márcia Ortiz Mayo Marques

Inclui bibliografia

1. Alecrim-do-campo. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Plantas aromáticas. 4. Marcadores moleculares. 5. Genética de populações. 6. *Baccharis dracunculifolia* D.C. I. Marques, Márcia Ortiz Mayo. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. III. Título.

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

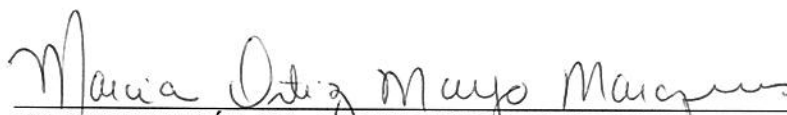
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: “*Baccharis dracunculifolia* D.C.: DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA DE POPULAÇÕES”

ALUNO: MARCELO RIGOTTI

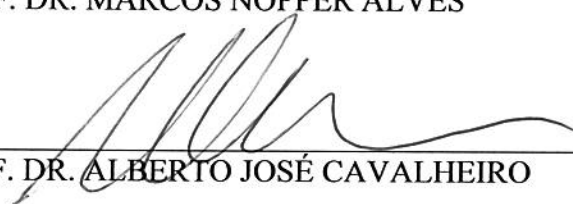
ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES

Aprovado pela Comissão Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES

  
\_\_\_\_\_  
PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MARIA DO CARMO VIEIRA

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. MARCOS NOPPER ALVES

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO

  
\_\_\_\_\_  
PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MAGNÓLIA APARECIDA SILVA DA SILVA

Data da Realização: 10 de fevereiro de 2011.

*Alecrim, Alecrim dourado*

*Que nasceu no campo*

*Sem ser semeado*

*Alecrim, Alecrim dourado*

*Que nasceu no campo*

*Sem ser semeado*

*Foi meu amor*

*Que me disse assim*

*Que a flor do campo é o alecrim*

*Foi meu amor*

*Que me disse assim*

*Que a flor do campo é o alecrim*

*Alecrim, Alecrim dourado*

*Que nasceu no campo*

*Sem ser semeado*

*Alecrim, Alecrim dourado*

*Que nasceu no campo*

*Sem ser semeado*

Cultura popular, meu filho de dois anos e seis meses adora esta musica...

Dedico à minha esposa, meu filho, minha mãe, meu pai e meus irmãos...

## **Agradecimento**

À minha querida orientadora Márcia Ortiz Mayo Marques, pela paciência e apoio sempre na busca de um melhor desempenho da minha parte.

À Maria Imaculada Zucchi e José Baldin Pinheiro, pelo apoio, orientação e positivismo.

À Capes, pela concessão da bolsa de doutorado e CNPq pelo auxílio financeiro ao projeto.

À Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP, Campus de Botucatu, pela estrutura fornecida à minha formação no doutorado.

Aos meus amigos Sônia, Camila, Emi, Danila, Felipe, Chrystian, Guiné, André, Caio, Reginaldo, Nelson, Ariane, Amaralina, Luciana, Bárbara, Ílio, Douglas, Mariele, Mauricio, Ângela, Andréa Carvalho, Raquel, Luchele, Rosângela, Luiza, Patrícia e Adriana.

Em especial à minha amiga Andréa Higuti, seu esposo e suas crianças.

Aos meus queridos professores da Horticultura Ana Maria Pereira, Antonio Ismael Cardoso, Elizabeth Orika Ono, Francisco Araújo Câmara, Giuseppina Pace Lima, João Domingos Rodrigues, Lin Chau Ming, Luiz Vitor do Sacramento, Marcia Ortiz Mayo Marques, Roberto Lyra Villas Boas, Rogério Lopes Vieites, Romy Goto e Sarita Leonel que em dedicação à sua vocação sempre procuraram dar o melhor de si para seus alunos.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais do Centro P&D de Recursos Genéticos Vegetais do IAC em Campinas: Márcia, Lenita, Maria Aparecida, Roselaine, Mônica, Marcos e Régia.

Aos amigos do Laboratório do Prof. Baldin do Departamento de Genética da ESALQ de Piracicaba, Marcelo Mattos Cavallari, Mariza, Miklos, Milene, Carlos Eduardo, Thiaguinho e Fátima.

Aos pesquisadores Marcos, Ílio, Glynn e Benício do Setor de Agrotecnologia do Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS .....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	X
1. RESUMO .....	1
2. SUMMARY .....	3
3. INTRODUÇÃO .....	5
4. OBJETIVOS .....	9
5. REVISÃO DE LITERATURA .....	10
5.1. O bioma Cerrado .....	10
5.2. Família Asteraceae e o Gênero <i>Baccharis</i> .....	13
5.3. A espécie <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	15
5.4. Aspectos genéticos e moleculares .....	19
6. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
6.1. Coleta do material vegetal .....	27
6.2. Secagem do material vegetal .....	29
6.3. Extração e análise da composição química dos Óleos Essenciais .....	30
6.4. Caracterização molecular via marcador microssatélite (SSR) .....	31
6.5. Extração e quantificação do DNA .....	31
6.6. Avaliação do polimorfismo .....	33
6.7. Metodologia de análise estatística dos dados .....	35
6.7.1. Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg .....	35
6.7.2. Desequilíbrio genotípico entre pares de <i>locus</i> .....	35
6.7.3. Diversidade genética .....	35
6.7.4. Estrutura genética .....	36
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
7.1. Resultados .....	37
7.1.1. Rendimento e Caracterização da composição química dos óleos essenciais das populações nativas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	37

7.1.2. Análise comparativa da composição química dos óleos essenciais das populações Botucatu, Dourados, Delfinópolis e Itahum. ....	42
7.2. Discussão .....	57
7.3. Caracterização molecular .....	58
7.3.1. Diversidade intrapopulacional .....	59
7.3.2. Estrutura genética .....	61
7.4. Discussão .....	63
8. CONCLUSÃO.....	66
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	68
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>		<b>Página</b>
1	Localização e caracterização dos fragmentos de cerrado em que as populações de <i>B. dracunculifolia</i> foram coletadas	29
2	Programação da reação de PCR para a amplificação dos <i>primers</i> de <i>B. dracunculifolia</i> .	34
3	Condições de temperatura, volumes de DNA, dos <i>primers</i> (F e R) e de MgCl <sub>2</sub> utilizadas para melhor amplificação dos <i>locus</i> utilizados na genotipagem das populações de <i>B. dracunculifolia</i> .	34
4	Composição química média (%) do óleo essencial das folhas de <i>B. dracunculifolia</i> nativas de Botucatu, Estado de São Paulo, Delfinópolis, Estado de Minas Gerais; Dourados e Itahum, Estado de Mato Grosso do Sul.	42
5	Substâncias majoritários (% relativa média) do óleo essencial dos indivíduos genotipados de <i>B. dracunculifolia</i> provenientes das populações, Botucatu (SP), Dourados (MS), Delfinópolis (MG) e Itahum (MS).	52
6	Sequências dos pares de <i>primers</i> que amplificaram <i>locus</i> microssatélites, com suas respectivas amplitudes alélicas, número de alelos, temperatura de anelamento, quantidade de cloreto de magnésio e dos <i>primers</i> .	58
7	Heterozigosidades e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para todas as populações por <i>locus</i> .	60
8	Frequência de alelos privados nas populações de <i>B. dracunculifolia</i>	61
9	Resumo das análises das populações com marcadores SSR, em que: <i>Ho</i> é heterozigosidade observada, <i>Hs</i> é diversidade genética intrapopulacional, <i>Ht</i> é diversidade genética total, <i>Dst</i> é diversidade interpopulacional, <i>Gst</i> é proporção da diversidade total interpopulacional e <i>Fis</i> é endogamia.	61
10	Distâncias genéticas de Nei (1972) calculadas entre as populações e distâncias geográficas.	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Representação da abrangência do Bioma Cerrado no território brasileiro.	10
2	Arbusto de <i>B. dracunculifolia</i> em fase vegetativa.	17
3	Inflorescência de <i>B. dracunculifolia</i>	18
4	Alteração causada por insetos galhadores	18
5	Localização das populações de <i>B. dracunculifolia</i> , Dourados (MS) e Itahum (MS), Botucatu (SP) e Delfinópolis (MG)	28
6	Perfil de gel de agarose 1% corados com Syber Safe, mostrando a quantificação de 30 acessos da população coletada em Itahum, Estado de Mato Grosso do Sul	33
7	Amplificação em gel de acrilamida	35
8	Rendimento dos óleos essenciais da população Botucatu	37
9	Rendimento dos óleos essenciais da população Dourados	38
10	Rendimento dos óleos essenciais da população Itahum	38
11	Rendimento dos óleos essenciais da população Delfinópolis	39
12	Comparação do rendimento dos óleos essenciais das quatro populações estudadas	40
13	Estrutura química dos monoterpenos e sesquiterpenos mais abundantes nos óleos essenciais dos acessos das populações de Botucatu/SP, Delfinópolis/MG, Dourados e Itahum/MT de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	41
14	Padrão de divergência química entre os indivíduos genotipados da espécie <i>B. dracunculifolia</i> (população de Botucatu) definido pela Análise de Componentes Principais, com base nos principais componentes do óleo essencial	44
15	Padrão de divergência química entre os indivíduos genotipados da espécie <i>B. dracunculifolia</i> (população de Dourados) definido pela Análise de Componentes Principais, com base nos principais componentes do óleo essencial	45
16	Padrão de divergência química entre os indivíduos genotipados da espécie <i>B. dracunculifolia</i> (população de Delfinópolis) definido pela Análise de Componentes Principais, com base nos principais componentes do óleo essencial	47
17	Padrão de divergência química entre os indivíduos genotipados da espécie <i>B. dracunculifolia</i> (população de Itahum) definido pela Análise de Componentes Principais, com base nos principais componentes do óleo essencial.	48
18	Padrão de divergência química entre os indivíduos genotipados das quatro populações de <i>B. dracunculifolia</i> definido pela Análise de Componentes Principais, com base nos principais	49

- componentes do óleo essencial
- 19 Padrão de divergência genética entre as populações de *B. dracunculifolia* definido pelo agrupamento UPGMA, a partir das distâncias genéticas de Nei (1972) 62
- 20 Análise de cluster utilizando genótipos multilocos (Evanno *et al.*, 2005), admitindo *admixture model*, contendo 3 populações (k=3), demonstradas pelas respectivas cores. Os indivíduos são representados por linhas verticais coloridas. A mesma cor em indivíduos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo cluster. As cores diferentes em um mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma que foi herdado de cada cluster. 63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

D.C. - De Candole  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
SSR - Simple Sequence Repeats  
AQ – Areia Quartzosa  
GPS - *Global Positioning System*  
CTAB - brometo de cetiltrimetilamonio  
TRIS - tris-hidroximetil-aminometano -  
EDTA - ácido etileno diamino tetracético  
IR – Índice de retenção  
RPM – Rotações por minuto  
ACP – Análise de Componentes Principais  
PCR – Polymerase Chain Reaction  
Bdr – *Primer de Bacharis dracunculifolia*  
PIC – Conteúdo de Informação Polimórfica  
Ho - Heterozigosidade observada  
He - Heterozigosidade esperada  
Hs -Diversidade genética intrapopulacional  
Ht - Diversidade genética total  
Dst - Diversidade interpopulacional  
Gst - Proporção da diversidade total interpopulacional  
UPGMA - *Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages*  
Fis - Endogamia  
Ta – Temperatura de anelamento  
A – Número de alelos  
bp – *billion part*  
pb – partes por bilhão  
mM – Mili molar  
 $\mu$  - Micro  
v - Volume  
 $\alpha$  - alpha  
 $\beta$  – beta  
 $\delta$  – delta  
 $\gamma$  - gama

***Baccharis dracunculifolia* D.C.: DIVERSIDADE GENÉTICA E QUÍMICA DE POPULAÇÕES.** Botucatu, 2011. 105p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Author: MARCELO RIGOTTI

Adviser: MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES

## 1. RESUMO

A espécie *Baccharis dracunculifolia*, popularmente conhecida como vassoura ou alecrim-do-campo, é amplamente utilizada na medicina caseira. A infusão de suas folhas é empregada para problemas hepáticos, disfunções estomacais e como anti-inflamatória. Estudos de literatura relatam o uso medicinal e religioso do “alecrim-do-campo” comercializado em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, assim como a utilização das folhas para feridas e o uso dos ramos, em decocto, como antifebril. Este trabalho objetivou a caracterização da composição química do óleo essencial e diversidade genética da *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) nativa do bioma Cerrado. Foram coletados, em média, 30 indivíduos em quatro populações naturais, sendo uma em Botucatu, estado de São Paulo, uma em Delfinópolis, no estado de Minas Gerais e duas em Dourados e Itahum, estado de Mato Grosso do Sul. A composição química do óleo essencial, extraído por hidrodestilação, foi analisada por meio de cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas. As substâncias majoritárias dos acessos coletados foram *trans*-nerolidol, *cis*- $\beta$ -guaieno, germacreno-D, *trans*-cariofileno, limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -mirceno, delta-cadineno,  $\beta$ -pineno e espatulenol. Esses componentes perfizeram uma média geral de 80,97% da composição química dos óleos essenciais nas quatro localidades. De acordo com a análise dos resultados a substância *trans*-nerolidol foi a que mais se destacou dentre os compostos presentes no óleo essencial da *B. dracunculifolia* em todas as populações. Entretanto, os acessos coletados em Itahum tiveram como componente principal o espatulenol seguido do *trans*-nerolidol. O estudo da diversidade

genética foi realizado por meio da análise do polimorfismo do DNA empregando marcadores microssatélite. Foram testados cinco *locus* microssatélites para a espécie revelando 48 alelos para as quatro populações estudadas. A maior parte da diversidade genética de *B. dracunculifolia* foi intrapopulacional, sendo a diversidade interpopulacional não expressiva.

**Palavras-chave:** *Baccharis dracunculifolia*, diversidade genética, óleo essencial, marcador molecular.

***Baccharis dracunculifolia* D.C.: CHEMICAL AND GENETIC DIVERSITY OF POPULATIONS.** Botucatu, 2011. 105p. Tese (Doutorado em Agronomia/ Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Author: MARCELO RIGOTTI

Adviser: MÁRCIA ORTIZ MAYO MARQUES

## 2. SUMMARY

The species *Baccharis dracunculifolia*, popularly known as “rosemary-of-field”, is widely used in folk medicine. The form of infusion of its leaves is used for liver problems, stomach disorders and as anti-inflammatory. Studies have reported the use of medical and religious "rosemary-of-field" sold in markets and fairs in Rio de Janeiro, as well as the use of leaves for wounds and the use of branches as decoction as antipyretic. This study aimed to characterize the chemical composition of essential oils and genetic diversity of native species *B. dracunculifolia* DC (Asteraceae) in the Cerrado biome. Were collected, on average, 30 individuals from four natural populations, one in Botucatu, in the state of São Paulo, a city of Delfinópolis in the state of Minas Gerais and two in Dourados and Itahum, state of Mato Grosso do Sul. The chemical composition of essential oil extracted by hydrodistillation, was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometer. The majority of accessions collected substances were *trans*-nerolidol, *cis*- $\beta$ -guaïeno, germacrene-D, *trans*-caryophyllene, limonene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -myrcene, delta-cadinene,  $\beta$ -pinene and spathulenol. These components amounted to an overall average of 80.97% of the chemical composition of essential oils in four locations. According to the analysis results of the substance *trans*-nerolidol was the most outstanding among which the present compounds in the essential oil of the species *B. dracunculifolia* in all populations. However, the accessions were collected in Itahum spathulenol as major components followed by the *trans*-nerolidol. The study of genetic diversity was performed by analyzing the DNA polymorphism using microsatellite markers. Five microsatellite *loci* were tested for the species revealed 48 alleles for the four populations

studied. Most of the genetic diversity of *B. dracunculifolia* was intrapopulation and interpopulation diversity is not significant.

**Keywords:** *Baccharis dracunculifolia*, genetic diversity, essential oil, molecular markers



### 3. INTRODUÇÃO

O reino vegetal tem provido um grande número de espécies com grande variedade de produtos naturais com diversas estruturas químicas e uma vasta gama de atividades biológicas, muitas das quais tem aplicação nas ciências da saúde (Kutney, 1999), assim como na fabricação de agroquímicos, flavorizantes, fragrâncias e aditivos em alimentos (Balandrin e Klocke, 1988).

As plantas representaram, durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. Atualmente, os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todas as novas drogas (Hostettmann *et al.*, 2003).

Dos 277 fármacos e nove associações constantes da relação de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS), 143 (51,5 %) são de origem sintética, 28 (10,1 %) de fontes vegetais, 20 (7,9 %) de animais, 20 (7,9 %) semi sintéticos, 20 (7,9 %) de origem microbiana, 24 (8 %) de fontes minerais, 14 (5 %) são vacinas e 8 (2,9 %) soros (OMS, 1991).

O Brasil é um dos países de maior diversidade genética vegetal, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (Nodari e Guerra 1999); entretanto, como consequência da revalorização mundial do uso de plantas medicinais, a pressão ecológica exercida sobre alguns desses recursos naturais tem sido grande nos últimos anos colocando em perigo a sobrevivência de muitas espécies medicinais nativas (Montanari Júnior, 2002). De

acordo com Sánchez e Valverde (2000) o comércio local de plantas medicinais leva à deterioração de populações naturais, tanto quanto a pressão extrativista da indústria farmacêutica.

No Brasil não tem sido diferente, os seus maiores biomas, Cerrado, Amazônia e Mata Atlântica sofrem uma destruição cada vez maior. Em um estudo recente do ano de 2002, concluiu-se que 55% do Cerrado já foram desmatados ou transformados pela ação humana (Machado *et al.*, 2004), a floresta da Mata Atlântica já perdeu mais de 93% de sua área (Myers *et al.*, 2000) e menos de 100.000 km<sup>2</sup> de vegetação remanesce. Na Amazônia mais de 67 milhões de hectares já foram desmatados (Homma, 2005).

A maioria dos compostos presentes nas plantas fazem parte do metabolismo primário. Além desses metabólitos, as plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários, os quais estão envolvidos na resistência contra pragas e doenças, na atração de polinizadores, na interação com micro-organismos simbióticos entre outros (Verpoorte *et al.*, 2000).

Produzidos pelos vegetais, os metabólitos secundários são formados por vários caminhos biossintéticos que produzem moléculas dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais, como, entre outros, ácidos graxos (gorduras) e seus ésteres, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e cetonas, compostos acetilênicos, alcalóides, compostos fenólicos, fenilpropanóides e terpenóides. Os fenilpropanóides e, especialmente, os terpenóides são os principais constituintes envolvidos nas interações planta-inseto (Mattos Alves, 2001).

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter 100 ou mais compostos orgânicos. Os terpenos encontrados com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos (Castro *et al.*, 2004). Constituem um dos mais importantes grupos de matérias-primas para as indústrias de alimentos, perfumaria e farmacêutica.

Na última década a própolis brasileira, também conhecida como própolis verde, tem atraído interesses comerciais e científicos. Estudos recentes relatam que parte dos constituintes químicos similares entre a planta e a própolis coletados no estado de São Paulo pertencem a *Baccharis dracunculifolia* (Park *et al.*, 2004).

Conhecida como “alecrim-do-campo” ou “vassourinha” é uma planta dióica arbustiva utilizada na medicina tradicional e produtora de óleos essenciais, distribuída em campos abertos em quase todo o Brasil, alcançando o Uruguai, Argentina, Paraguai e Bolívia (Espírito-Santo e Fernandes, 1998).

Estudos relativos à sua composição química têm revelado a presença de compostos importantes para a indústria farmacêutica como o sesquiterpeno trans-nerolidol e os monoterpenos limoneno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, que ainda podem ser utilizados como na quimiotaxonomia dessa espécie (Queiroga *et al.*, 1990).

Dentre os estudos sobre a atividade farmacológica de *B. dracunculifolia*, destacam-se: cariogênica (Leitão *et al.*, 2004), tripanomicida (Silva Filho *et al.*, 2004), anti-leucêmica (Fukuda, *et al.*, 2006), anti-mutagênica (Rezende, 2007), cicatrizante (Funari *et al.*, 2007), antiinflamatória (Menezes 2005), anti-úlcera gástrica (Lemos *et al.*, 2007) e imonumoduladora (Missima *et al.*, 2007).

Atualmente, as técnicas moleculares conquistaram grande importância para distinguir a estrutura genética, dentro e entre populações, e têm sido utilizados no esclarecimento dos padrões de fluxo gênico, dispersão e seleção (Cavers *et al.*, 2005). Dentre elas, os microssatélites têm sido indicados para estudos de variabilidade genética, cálculos de frequência alélica, desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos. A diversidade entre populações, fluxo de genes e outros parâmetros genéticos devem ser avaliados em estudos com populações de espécies nativas. O conhecimento de populações de espécies nativas tem sido construído com o advento dos marcadores moleculares. Os marcadores microssatélites têm sido usados em estudos de populações naturais (Collevatti *et al.*, 1999), além de estudo de genética de populações, uma vez que são de natureza co-dominante e constituem em uma das classes de marcadores moleculares polimórficos atualmente mais disponíveis (Ferreira e Gratapaglia, 1998).

Apesar do potencial uso farmacológico e aromático, o alecrim-do-campo não é cultivado; entretanto, essa espécie tem sofrido com a constante fragmentação do seu habitat, além de ser combatida como invasora. Estudos para conservação de plantas medicinais são de extrema importância à medida que a exploração desperta interesse da indústria e dos extrativistas; assim, torna-se necessário estabelecer diferentes estratégias de

manejo e conservação de *B. dracunculifolia* para manter a variabilidade genética e consequentemente assegurar a preservação dessa espécie.

#### 4. OBJETIVOS

##### **Geral:**

O presente trabalho teve como objetivo o estudo de populações naturais de *Baccharis dracunculifolia* coletadas no bioma Cerrado nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, sob o ponto de vista da diversidade genética e química dos óleos essenciais com a finalidade de contribuir com o conhecimento sobre a conservação e uso sustentável da espécie, assim como com programas de melhoramento genético vegetal.

##### **Específicos:**

- Analisar a composição química dos óleos essenciais de folhas dos acessos de *Baccharis dracunculifolia*;
- Avaliar a diversidade genética de populações de *Baccharis dracunculifolia*, usando marcador molecular microssatélite;
- Correlacionar a composição química do óleo essencial com a genética de populações.

## 5. REVISÃO DE LITERATURA

### 5.1. O bioma cerrado

O Cerrado é a segunda maior biodiversidade da América do Sul e o segundo maior bioma do Brasil, superado apenas pela Amazônia (Klink e Machado, 2005). Constitui-se na maior savana neotropical do mundo; e ocupa área estimada em cerca de 2 milhões de km<sup>2</sup>. Ocupa 24% da área total do território nacional (Lima e Silva, 2005), 204 milhões de hectares, estando presente em 13 estados brasileiros e no Distrito Federal (Figura 1).



**Figura 1** – Representação da abrangência do Bioma Cerrado no território brasileiro. Fonte: (Embrapa, 1999).

Está situado entre a zona equatorial e 23° latitude sul, sendo que a sua maior parte está no platô de blocos sedimentares ou cristalinos, cuja continuidade é quebrada por uma extensiva rede de depressões periféricas localizadas nas áreas entre os platôs. Ocupa extensa área contínua no Brasil Central e áreas disjuntas em outros biomas (Henriques, 2005). Faz contato com a floresta amazônica ao norte, a floresta Atlântica ao sul e sudeste, e com a caatinga da região semiárida do nordeste, com exceção apenas para os campos sulinos e ecossistemas costeiros e marinhos (Aguiar *et al.*, 2004). Existem partes de Cerrado na Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica, que são remanescentes de um processo histórico e dinâmico de contração e expansão das áreas de Cerrado e florestas, provocadas por alterações climáticas existentes no passado (Aguiar *et al.*, 2004). As três maiores bacias hidrográficas do continente Sul Americano (Felfili e Silva Junior, 2005), a Amazônica, do Paraná e a do São Francisco (Chaves, 2001) estão contidas nesse ambiente.

São mais frequentes no Cerrado as formações florestais, savanas lenhosas e campestres, formando várias fisionomias conhecidas por cerrado sentido restrito, cerradão, mata de galeria, campos e vereda (Felfili *et al.*, 2004). O cerrado sentido restrito ocupa aproximadamente 70% do bioma (Felfili e Silva Júnior, 2005). A disponibilidade de nutrientes e água, relacionadas ao clima sazonal, déficit de lençol de água e fogo têm sido considerados os principais determinantes da vegetação existente (Coutinho, 1990), que apresenta distintas fisionomias, incluindo desde campos com gramíneas com pouca ou nenhuma espécie herbácea ou plantas lenhosas maiores, os “campos limpos”, até florestas densas esclerófilas, que frequentemente têm um dossel inteiramente fechado (Silva e Bates, 2002).

Possui clima tropical úmido e tropical seco com pluviosidade média entre as regiões mais úmidas ao noroeste e sudeste e as áreas mais secas ao nordeste (Silva e Bates, 2002). O clima é sazonal, com invernos secos e verões chuvosos (Franco, 2005). A estação seca pode durar até seis meses, quando a camada superficial do solo tende a secar, mas as camadas mais profundas mantêm-se úmidas durante todo o ano (Eiten, 1972). Mudanças de pluviosidade, temperatura, fotoperíodo e ocorrência de fogo atuam na indução da floração, mas não como determinantes estritos (Oliveira, 1998).

A riqueza da diversidade biológica do cerrado brasileiro pode ser explicada pelo mosaico natural de ecossistemas (Aguiar *et al.*, 2004). Dias (1996) estima que

30% de todas as espécies que existem no Brasil compõem essa biota. De acordo com Mendonça *et al.* (1998), as espécies vegetais estão distribuídas em torno de 35% no cerrado sentido restrito, 30% são de mata de galeria, 25% de áreas campestres e 10% ainda não classificadas.

O cerrado apresenta uma biodiversidade rica e geralmente subestimada. Existem pelo menos 7 mil espécies reconhecidas de plantas vasculares, entre ervas, arbustos, árvores e lianas, valor superior ao de muitas outras floras mundiais (Mendonça *et al.*, 1998). Em decorrência do endemismo e da atual velocidade de devastação é considerado um dos mais importantes *hotspots* mundiais (Myers *et al.*, 2000), e com grau de endemismo que atinge 44% da sua flora, o cerrado é a mais rica savana tropical no mundo (Silva e Bates, 2002). Apresenta grande número de espécies endêmicas em todas as fisionomias (Felfili *et al.*, 2001).

De acordo com Myers *et al.* (2000), há 10.000 espécies de angiospermas. Há grande número de espécies com potencial econômico, das quais mais de 200 já têm algum uso econômico identificado, podendo ser alimentícias, ornamentais, forrageiras, apícolas, produtoras de madeira, cortiça, fibra, óleo, tanino e artesanato, e é o terceiro maior provedor de plantas medicinais no Brasil (Felfili *et al.*, 2004).

A destruição de habitats pela atividade antrópica é uma das ameaças mais evidentes aos ecossistemas naturais e têm aumentado dramaticamente nas últimas décadas e a ameaça aos ecossistemas tropicais é evidente (Trejo e Dirzo, 2000; Ghazoul e McLeish, 2001).

O avanço da agricultura, através da produção de grãos e pastagens para o gado de corte tem causado degradação pela ação do fogo e dos tratores, colocando em risco de extinção várias espécies de plantas nas últimas décadas, antes mesmo de serem estudadas (Aguiar *et al.*, 2004). As queimadas são empregadas tanto com o propósito de transformar áreas de cerrado em campos de cultura quanto o de manejar pastagens naturais ou pastagens artificiais (Coutinho, 1990). O fogo é capaz de causar a indução da floração e a suberização do tronco e ramos, resultando num isolamento térmico eficiente dos tecidos internos desses órgãos durante o fogo (Miranda *et al.*, 2002). O declínio da vegetação natural também tem ocorrido pelas atividades extrativistas exercidas por comunidades locais e indústrias farmacêuticas, além do extrativismo através das carvoarias, que destroem a vegetação, e



podem resultar em escassez dos recursos naturais (Felfili *et al.*, 2004). Há a estimativa de que 80% da vegetação original já tenha sido alterada (Myers *et al.*, 2000; Felfili *et al.*, 2004).

## 5.2. Família Asteraceae e o Gênero *Baccharis*

Asteraceae é a mais numerosa família de plantas vasculares, possui entre 1600–1700 gêneros, distribuídas em três subfamílias e 17 tribos e 24.000–30.000 espécies (Bremer 1994; Funk *et al.*, 2005). Representa aproximadamente 8% de todas as plantas com flores e é distribuída em todos os continentes exceto Antártica (Stevens, 2001, Funk *et al.*, 2005).

É a segunda mais representativa quanto ao número de espécies dentro da flora do cerrado com grande número de espécies e abundância (Brito, 1997; Mendonça *et al.*, 1998). É uma das famílias mais ricas em floras locais e regionais (Bremer, 1994), principalmente em ambientes abertos, com muitas espécies heliófilas e pioneiras. No Brasil existem pelo menos 1.900 espécies já descritas (Barroso, 1976).

São caracterizadas pelas inflorescências agrupadas em capítulos e o fruto do tipo aquênio podendo estar acompanhado dos papus, estruturas que facilitam a dispersão. Asteraceae podem possuir diversas formas, tais como: herbácea, suculenta, liana, epífita, raramente árvore, sendo cerca de 98% dos gêneros constituídos por plantas de pequeno porte (Joly, 1967). Mais recentemente a classificação tem sido dividida em dez subfamílias e trinta e cinco tribos (Baldwin *et al.*, 2002; Panero e Funk, 2002). Os metabólicos secundários, a morfologia da inflorescência e a plasticidade do hábito de crescimento são as características básicas dessa família (Hendry 1996; Stuessy e Garver, 1996).

A inflorescência especializada das Asteraceae, ou capítulos, e o mecanismo de polinização de suas flores evoluíram em conjunto, presumivelmente em resposta a vários processos evolutivos incluindo pressões pela herbivoria, polinização e/ou dispersão dos frutos (Ferrer e Good-Avila, 2007). Tem havido grande interesse no estudo da quimiosistemática e quimiotaxonomia baseado em metabólitos secundários de plantas superiores (Harborne e Williams, 1994; Alvarenga *et al.*, 2001), incluindo estudos das Asteraceae (Bohlmann, 1990; Spring e Buschmann, 1996). Esta família tem sido amplamente estudada quanto à sua composição química e atividade biológica; algumas espécies têm

proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas, entre outros (Zomlefer, 1994; Verdi *et al.*, 2005).

Basicamente, as espécies das Asteraceae biosintetizam poliacetilenos, flavonóides e terpenóides. As lactonas sesquiterpênicas são a classe de metabólitos secundários mais estudados, que são utilizados como marcadores taxonômicos (Seaman, 1982; Spring e Buschmann, 1996).

O gênero *Baccharis* (tribo Astereae) compreende aproximadamente 400 espécies distribuídas pelo México e América do Sul, especialmente Brasil, Argentina, Colômbia e Chile, ocupando as regiões mais elevadas (Malagarriga Heras, 1976; Nesom, 1990), classificadas em 28 grupos baseados em similaridades morfológicas (Barroso, 1976). A alta concentração de espécies no Brasil e nos Andes indica que uma dessas áreas é o provável centro de origem desse gênero (Verdi *et al.*, 2005).

É caracterizado principalmente pelo seu porte herbáceo ou arbustivo, com plantas perenes, de 0,5 a 4,0 m de altura, com ramos cilíndricos. São dióicas, com exceção de *B. monoica* (Barroso, 1976). São plantas de campo aberto, pioneiras e dominantes em capoeiras ou áreas alteradas (Verdi *et al.*, 2005). O sucesso da sua ampla distribuição reside na grande produção e dispersão de sementes a longa distância (Westman *et al.*, 1975). Várias espécies de *Baccharis* possuem tricomas na epiderme de folhas e caules, que acumulam terpenóides e outros compostos aromáticos, como flavonóides e derivados do ácido cumárico com a função de proteger a planta contra parasitas, competidores e predadores (Spring, 2000).

No Brasil, estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, com a maior parte delas localizadas na região sudeste do País (Barroso, 1976; Verdi *et al.*, 2005). Pelo menos 20% das espécies são utilizadas para fins medicinais, ou em menores proporções como alimentos ou como matéria prima para diferentes tipos de indústrias (Abad *et al.*, 2006).

Várias dessas espécies têm sido investigadas por sua importância química ou farmacológica por suas propriedades anti-inflamatórias (Cifuentes *et al.*, 2001; Parejo *et al.*, 2003; Tapia *et al.*, 2004). As plantas pertencentes a esse gênero têm sido utilizadas na medicina tradicional para tratar dores de cabeça, diabetes e desordens hepatobiliares (He *et al.*, 1996; Gene *et al.*, 1992). São consumidas principalmente na forma de chás, com indicações para males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes,

doenças na próstata, sendo também descritas como remédio para processo de desintoxicação do organismo (Verdi *et al.*, 2005).

Nos estudos de atividades biológicas destacam-se os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos e anti-inflamatórios (Faini *et al.*, 1982; Jarvis *et al.*, 1991). Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e/ou atividade biológica, encontram-se *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata* (Verdi *et al.*, 2005).

Várias espécies como *B. obtusifolia*, *B. latifolia* Pers., *B. pentlandii* D.C. e *B. subulata* Wedd, têm sido utilizadas na forma de decocção na medicina tradicional na América do Sul no tratamento de reumatismo, problemas do fígado, feridas e úlceras (Abad *et al.*, 2006).

A *B. genistelloides* é comumente utilizada para uma variedade de doenças, tais como problemas digestivos e do fígado, malária, úlceras, diabetes, anemia, diarreia e inflamações urinárias (Melo *et al.*, 2001)

### **5.3. A espécie *Baccharis dracunculifolia***

A *Baccharis dracunculifolia* D.C. (De Candolle), Asteraceae, é popularmente conhecida como “vassoura, alecrim-do-campo, alecrim vassoura, carqueja, chilca, cilca, erva-de-são-joão-maria, suncho, thola, vassoureira ou vassourinha”, é amplamente utilizada na medicina caseira. A planta já foi muito utilizada na confecção de vassouras rústicas, de onde vem um de seus nomes populares, e por ser uma planta que cresce espontaneamente em campos de criação de gado (Takeda e Farago, 2001).

A forma de infusão de suas folhas é empregada para problemas hepáticos, disfunções estomacais, cansaço físico, inapetência, afecções febris, debilidade orgânica e como anti-inflamatória (Budel *et al.*, 2004). Estudos de literatura relatam o uso medicinal e religioso do “alecrim-do-campo” comercializado em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro (Azevedo e Silva, 2006), assim como a utilização das folhas para feridas e o uso dos ramos, em decocto, como antifebril (Rodrigues e Carvalho, 2001).

Esta planta (Figuras 2 e 3) é um arbusto com ocorrência no Brasil, Uruguai, Argentina, Paraguai e encontrada também nos altos vales da Bolívia, chegando até 3.280 m de altitude (Cassel *et al.*, 2000). É uma planta dióica com as inflorescências

masculinas e femininas em indivíduos separados, 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. Os frutos são denominados cipselas ou aquênios, sendo que, o mais adequado é o uso do termo cipsela, conforme Marzinek *et al.* (2008). Os pápus são bem desenvolvidos e o carpópódio distinto, onde se dá a abscisão do fruto no momento da dispersão (Bremer, 1994). Através da avaliação das cipselas maduras, Júlio (2008) encontrou 44% de sementes bem desenvolvidas.

A polinização das flores de *B. dracunculifolia*, é realizada principalmente por abelhas da espécie *Apis mellifera* L (Werpachowski *et al.*, 2004; Alencar *et al.*, 2005).

A fenologia floral é diferente entre os sexos, com flores masculinas produzindo inflorescências mais cedo que as flores femininas. Entretanto na fase de maturação dos frutos, o número de inflorescências suportado por indivíduos com flores femininas é maior que nas flores masculinas no final da estação reprodutiva. Esta etapa ocorre durante a estação seca, onde a exigência de recursos pelas flores femininas é maior, e o estresse hídrico pode ser responsável pela grande mortalidade destas plantas (Espírito-Santo e Fernandes 1998).

Por sua alta taxa de germinação e a rapidez com que isso ocorre em condições favoráveis (20°C em presença de luz), apresenta características próprias de plantas invasoras e colonizadoras por produzir um grande número de aquênios (Klein e Felipe, 1992) e uma alta capacidade de crescimento natural. Crescem principalmente em áreas de cerrado que encontram-se sujeitas à variados níveis de perturbação antrópica, tais como pastagens e áreas em processo de sucessão (Bastos, 2001); essas áreas estão localizadas em paisagens agrícolas que apresentam fragmentos de cerrado. É considerada espécie invasora de campos e pastagens abandonadas, adaptando-se facilmente a solos ácidos e pobres em nutrientes (Leitão *et al.*, 2004). O fim das chuvas coincide com a floração, apresentando pico no mês de novembro (Espírito-Santo e Fernandes, 1998).

A *B. dracunculifolia* tem sido objeto de numerosos estudos entomológicos, pela sua riqueza de insetos herbívoros e galhadores (Figura 4) onde já foi

descrita a ocorrência de 17 tipos de galhas (Arduin e Kraus, 2001, Espírito-Santo *et al.*, 2003).

Destaca-se, ainda, por sua típica relação com a abelha *Apis mellifera* (Bastos, 2001). De acordo com Alencar *et al.* (2005), Park *et al.* (2004) e Kumazawa *et al.* (2003), Funari *et al.* (2007), *B. dracunculifolia* é a principal fonte botânica da própolis “verde” produzida no Sudeste brasileiro.



**Figura 2** – Arbusto de *B. dracunculifolia* em fase vegetativa, Dourados – MS. Fonte: Rigotti, 2009.



**Figura 3** – Inflorescência de *B. dracunculifolia*. Fonte: Rigotti, 2009.



**Figura 4** – Alteração causada por insetos galhadores. Fonte: Rigotti, 2009.

O óleo essencial do alecrim-do-campo tem como significativos os teores de *trans*-nerolidol e espatulenol (Loayza *et al.*, 1995). Germacreno-D e o biciclogermacreno (14%) estão entre os principais compostos do óleo essencial em conjunto com o  $\delta$ -cadineno (13%) e germacrona (5%) coletados em Cochabamba, Bolívia por Loayza *et al.* (1995). Ferracini *et al.* (1995); identificaram em plantas masculinas e femininas os compostos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno,  $\alpha$ -terpineol, *trans*-cariofileno, aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -cadineno, espatulenol, nerolidol e globulol. Cassel *et al.* (2000), encontraram *trans*-nerolidol e espatulenol como componentes principais em óleos essenciais obtidos pelo processo de extração supercrítica pelo CO<sub>2</sub> em plantas coletadas no município de Campestre da Serra, RS em junho de 1999. Fabiane *et al.*; (2008) encontraram os compostos  $\beta$ -pineno, *trans*-nerolidol, limoneno e espatulenol com majoritários em plantas coletadas no Sudeste do Paraná de fevereiro a maio de 2006, extraídos por hidrodestilação. Maróstica Júnior *et al.*; (2008); extraíram o óleo essencial por hidrodestilação de plantas coletadas no Sudeste e encontraram:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno,  $\alpha$ -terpineol, *trans*-cariofileno, aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -cadineno, espatulenol, nerolidol, globulol, mirceno, linalol,  $\gamma$ -muuroleno, *cis*- $\beta$ -guaiano,  $\delta$ -cadineno, *epi*- $\alpha$ -cadinol.

Parreira *et al.* (2010) encontraram atividade leishmanicida e esquistossomicida para o óleo essencial. O óleo essencial também foi sugerido para o tratamento de úlceras gástricas por Massignani *et al.* (2009). Klopell *et al.* (2007); comprovaram a atividade antiulcerogênica do *trans*-nerolidol.

#### 5.4. Aspectos genéticos e moleculares

Quantificar a diversidade existente e procurar explicá-la em relação à origem, organização e manutenção, é o foco principal da genética de populações. A variabilidade genética em populações é de grande importância para a área de genética e taxonomia. Os estudos em populações naturais devem ser direcionados para a quantificação da variação existente e na diferenciação dos níveis de variabilidade das populações. Os fatores que influenciam na distribuição da variabilidade genética abrangem o tamanho efetivo da população, a distribuição geográfica da espécie, o modo de reprodução, o mecanismo de dispersão de sementes e o tipo de comunidade onde a espécie é frequente (Hamrick, 1983).

A quantificação dos níveis de variabilidade dentro das populações e a caracterização do nível de estruturação genética entre populações são as questões básicas no estudo da variação genética em populações naturais de uma espécie (Hamrick, 1983). O entendimento da forma como a variabilidade encontra-se disseminada dentro de populações é dada a partir da interpretação de índices de diversidade como: porcentagem de *locus* polimórficos (P); o número médio de alelos por *locus* observados (A); diversidade gênica ou heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e a heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) sob equilíbrio de Hardy-Weinberg e índice de fixação (f) (Hamrick, 1983; Robinson, 1998).

A diversidade genética é definida como a riqueza de espécies dentro de um ecossistema e também como o nível de variabilidade gênica contida dentro de cada população (Nei, 1972), pode ser medida pelo nível de heterozigosidade esperada nas proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg, independente de efeitos de migração, seleção, mutação ou sistema reprodutivo. A heterozigosidade é uma mensuração adequada para quantificar a variação, porém, também considera a frequência de heterozigotos como um significativo indicador da diversidade genética, uma vez que cada heterozigoto carrega alelos diferentes, Weir (1996). No entanto, a heterozigosidade esperada, ou diversidade gênica, como proposto por Nei (1972), é uma avaliação mais adequada por representar a variação em populações de espécies autógamas e alógamas. De acordo com Hamrick (1989), a diferenciação entre as populações é aumentada pela seleção e deriva genética, sendo que, espécies com intenso movimento de pólen e sementes têm menor diferenciação do que espécies com fluxo gênico restrito.

A organização dos níveis de diversidade entre e dentro de populações é decorrente de fatores que afetam o comportamento dos alelos na população como seleção natural, migração, deriva genética e mutação, estando fortemente associada aos aspectos autoecológicos e demográficos das populações (Loveless e Hamrick, 1984). A fim de diferenciar a estrutura genética das populações naturais várias abordagens têm sido utilizadas como a análise da diversidade em populações subdivididas, segundo Nei (1972) e a estatística F (Wright, 1951 e 1978).

A compreensão dos processos evolutivos dentro das populações de plantas naturais tem progredido graças aos estudos da organização da variabilidade ou



estrutura genética das populações, que tem como objetivo a melhoria das estratégias de domesticação, manejo e conservação dessas espécies (Carthew, 1993).

A estrutura genética é a distribuição não aleatória de alelos e genótipos dentro da espécie (Hamrick, 1983); ou a forma como a variabilidade genética é disseminada entre e dentro dos níveis hierárquicos de subdivisão de uma espécie (Brown, 1978). O desenvolvimento e a manutenção da estrutura genética acontecem devido às interações de uma união complexa de fatores evolucionários, como modificações no conjunto gênico, organização dessas variações dentro de genótipos, distribuição espacial dos genótipos, sistema de reprodução, dispersão das progênies, seleção, deriva, mutação, eventos casuais e processos de crescimento, mortalidade e reposição dos indivíduos que darão origem a futuras populações (Loveless e Hamrick, 1984).

O desenvolvimento e a utilização de marcadores moleculares para a detecção e exploração do polimorfismo do DNA é um dos mais significativos avanços no campo da genética molecular. Esta tecnologia levou a um grande aumento no conhecimento da genética e da compreensão da estrutura e do comportamento dos genomas de diversas espécies. Um marcador genético é uma sequência de genes ou DNA com um local conhecido em um cromossomo e associado a um determinado gene ou característica, são marcas que diferenciam genótipos e são herdadas de acordo com as leis de herança Mendeliana (Lefebvre e Chèvre, 1995). Pode ser descrito como uma variação, que pode surgir devido à mutação ou alteração no *loci* do genoma, que pode ser observado.

Entre vários marcadores moleculares disponíveis atualmente os microssatélites ou SSR (repetição simples da sequência) são muitas vezes escolhidos por uma variedade de aplicações devido à sua natureza multialélica, herança codominantes, abundância relativa e cobertura ampla do genoma (Gupta e Varshney 2000).

Os marcadores microssatélites são repetições seriadas de pequenas sequências de DNA, muitas vezes altamente polimórficas. São úteis na seleção assistida por marcadores de características desejáveis ao qual estão ligados, portanto, são os marcadores empregados para estudos de mapeamento do genoma (Kappes *et al.*, 1997). Esses marcadores estão sendo mais utilizados em vários tipos de estudos genéticos, principalmente devido à sua reprodutibilidade e simplicidade técnica, à pequena quantidade de DNA requerida, ao baixo custo, ao grande poder de resolução e aos altos níveis de polimorfismo (Caixeta *et al.*, 2006).

Os microssatélites são os que mais se aproximam do marcador ideal, tendo uma ampla aplicabilidade em estudos de parentesco, fluxo gênico e estrutura genética de populações naturais, devido ao fato de apresentarem um padrão de herança mendeliana aliado às elevadas taxas de polimorfismo, capazes de gerar alto conteúdo informativo (Rafalski *et al.*, 1996). Têm sido muito utilizados em estudos de genética de populações de espécies silvestres, face à robustez, confiabilidade, praticidade operacional (Ferreira e Grattapaglia, 1998), por serem os marcadores mais informativos geneticamente e por serem considerados variantes geneticamente neutros (Grattapaglia, 1999).

Diversos exemplos de trabalhos bem sucedidos com marcadores microssatélites na pesquisa da variabilidade e estrutura genética de populações naturais de plantas foram descritos na literatura:

Collevatti *et al.*; (2001); estudaram 314 indivíduos em mais de 10 populações de *Caryocar brasiliense*. O estudo foi conduzido em populações fragmentadas nas localidades de Brasília – DF (três populações), Campo Grande – MS, Caldas Novas - GO, Parque Nacional Grandes Sertões Veredas – MG, Itirapina - SP, Rondonópolis – MT, Porto Nacional – TO e Uruaçu – GO. Os indivíduos apresentaram diferenciação genética significativa. Este estudo se baseou na variação em 10 *locus* microssatélites e comparou a heterozigiosidade e as estimativas de endogamia para populações contínua e fragmentada e discutiu as consequências para a conservação. O número de alelos por *locus* variou de 20 a 27 e a heterozigiosidade esperada e a heterozigiosidade observada variou de 0,129-0,924 e 0,067 a 1,000, respectivamente.

Zucchi *et al.*, (2003), estudando a Cagaita (*Eugenia dysenterica*), encontraram 10 *primers* desenvolvidos para a espécie *Eucalyptus* sp, que foram utilizados para estudar 10 populações naturais de Cagaita, mostrando o potencial da utilização de *primers* entre espécies diferentes. O material, representado por 116 matrizes foi coletado no Estado de Goiás e os resultados indicaram um potencial para a transferibilidade de *locus* de SSR desenvolvidos em *Eucalyptus* para a Cagaita. Ainda de acordo com os resultados, a espécie tem tendência à alogamia, sendo que a alta diversidade genética entre as populações detectada com marcadores SSR, indica ser este o marcador mais sensível para detectar a estrutura populacional.

Martins (2005), estudando populações naturais de *Solanum lycocarpum*, pode observar que as mesmas eram fundadas por um número elevado de origens diversas. As áreas da pesquisa foram localizadas na região Sudeste do estado de Goiás e apresentavam vegetação de cerrado bem preservado e conexão com outras áreas preservadas próximas ou com matas ciliares e corredores de fauna, pois permitiam o trânsito de animais entre os fragmentos de cerrado em áreas de Reserva Legal e Áreas de Preservação Permanente das fazendas. Os iniciadores que amplificam as regiões de microssatélites para *S. lycocarpum* foram utilizados do gênero *Capsicum*, ambos Solanaceae, perfazendo um total de 206 iniciadores. Destes, 17 geraram fragmentos em *S. lycocarpum*, ou seja, 8,29% de transferência. Dos 17 *locus* que amplificaram em *S. lycocarpum*, doze pares foram selecionados para síntese de iniciadores que apresentaram fragmentos mais consistentes e indícios de polimorfismo. Os indivíduos coletados nesse trabalho foram estudados com seis *locus* de microssatélites nucleares, sendo observados 30 alelos. O polimorfismo foi muito reduzido, para a maioria dos *locus*, sendo que apenas em um *locus* apresentou número elevado de alelos (17), como esperado para marcadores microssatélites.

Silva *et al.*; (2007), avaliaram sete populações de *Oryza glumaepatula*, originárias da Bacia Hidrográfica da Amazônia. A partir dos sete *locus* utilizados foram amplificados 35 alelos em sete populações de *O. glumaepatula*, num total de 117 indivíduos. Neste trabalho, os autores observaram elevada diferenciação interpopulacional e elevado nível de endogamia em grande parte influenciada pelo sistema reprodutivo devido ao predomínio da autofertilização (autogamia), o fluxo gênico entre populações foi praticamente nulo o que contribuiu para o elevado nível de divergência interpopulacional. Os autores citam que o uso de marcadores microssatélites promoveu suficiente precisão dos resultados, apesar do pequeno número amostrado de indivíduos, permitindo, assim, a definição de estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*.

Raposo (2007); encontrou em populações naturais de *Carapa guianensis* grande variabilidade genética dentro das populações e significativa divergência genética entre as populações. Foram avaliados indivíduos adultos no município de Porto Acre e em Rio Branco e utilizados sete *locus* polimórficos de microssatélites que permitiram observar 42 alelos em ambas as populações, sendo que as estimativas dos parâmetros genéticos foram muito próximas entre elas. Não foi encontrada endogamia e a taxa de

alogamia foi alta. A maior variabilidade genética foi encontrada dentro das populações e a divergência genética entre as populações foi estatisticamente significativa e em relação à variabilidade intrapopulacional, foram encontrados 85 alelos na população Rio Branco.

Cavallari (2008), estudou a estrutura genética de nove populações distribuídas em quatro ecossistemas da espécie arbórea *Caesaria sylvestris* por meio da amostragem de 376 indivíduos. Através de uma biblioteca enriquecida em microssatélites, foram obtidos dez pares de iniciadores (*primers*) microssatélites específicos para *C. sylvestris*. Estes foram utilizados para o estudo da estrutura genética dos indivíduos das populações estudadas divididos em duas variedades. Foi observado que as populações que abrigam as duas variedades possuem maior diversidade genética. O fluxo gênico detectado entre os ecossistemas foi baixo. A diversidade genética amostrada encontra-se dentro de cada população e as diferenças genéticas entre as variedades são maiores do que as diferenças entre os ecossistemas ou populações. De acordo com este trabalho as variedades são unidades evolutivas distintas, que trocam informação genética nos ecótonos e em outras poucas localidades onde se encontram e hibridizam.

Haber (2008); trabalhou com três populações da espécie *Lychnophora pinaster*, oriundas dos municípios de Lavras e Carrancas, Estado de Minas Gerais, onde foi constatado que a maior variabilidade genética ocorreu dentro das populações, enquanto que as populações apresentaram uma porcentagem de endogamia, com pequena taxa de autofecundação e com alta taxa de cruzamento, sugerindo sistema de reprodução misto, com tendência à alogamia. O estudo da variabilidade populacional realizou-se pela análise de polimorfismo do DNA com marcadores microssatélite. Os *locus* SSR desenvolvidos foram eficientes para a detecção da variabilidade genética nesta espécie, confirmando o elevado conteúdo de informação genética desse marcador.

Nazareno (2009) estudou populações naturais de *Ficus citrifolia* e *Ficus eximia*, em fragmentos de florestas semidecíduas no Estado de São Paulo; marcadores microssatélites desenvolvidos em espécies de *Ficus* foram transferidos e caracterizados em *F. citrifolia* e *F. eximia*. Pode-se observar neste trabalho que a perda e a fragmentação de habitat reduzem a riqueza alélica dessas espécies. Entretanto, essas duas espécies apresentam elevada variabilidade genética, ausência de endogamia, presença de alelos raros e

exclusivos em suas populações e uma alta distribuição da variabilidade genética intrapopulacional.

Moreno *et al.* (2009), com *Hymenaea stigonacarpa* chegou a conclusão que os indivíduos eram aparentados e que com a finalidade de conservação era necessário coletar as sementes a partir de árvores maternas distantes, no mínimo, 750 m entre si. O estudo foi realizado em duas áreas de Cerrado do Estado de São Paulo nos municípios de Itirapina (68 indivíduos) e Assis (47 indivíduos). Para o estudo das duas populações, foram utilizados cinco *locus* microssatélites cloroplastidiais (cpSSR) universais. A população de Itirapina apresentou um único haplótipo, indicando um forte efeito fundador. Por sua vez, a população de Assis, apresentou seis haplótipos com uma diversidade haplotípica moderada, demonstrando que a mesma foi fundada por pequeno número de linhagens maternas.

Em relação à utilização de marcadores microssatélites, Hedrick (1999), relaciona três pontos que merecem ser levados em consideração: a heterozigosidade tende a ser alta dentro das populações, o que acaba produzindo baixa diferenciação, entre elas, os *locus* são extremamente sensíveis à redução do tamanho populacional podendo gerar, portanto, elevadas distâncias genéticas; e, como os marcadores são neutros, as diferenças estatísticas significantivas podem não estar correlacionadas com diferenças biológicas expressivas, tanto pela falta de correlação entre os *locus* adaptativos e os *locus* altamente variáveis, como também pelo poder estatístico intrínseco desses *locus*, que é bastante elevado. A ocorrência de alelos nulos é também limitação importante deste tipo de marcador, que ocorre devido a mutações, inserções ou deleções no sítio de anelamento do iniciador que podem impedir a amplificação de uma parte dos alelos. Esses alelos não amplificados podem provocar uma estimativa errônea do número de genótipos homozigotos presentes na população (Pemberton *et al.*, 1995).

Outra questão limitante para o uso dos microssatélites está relacionada ao seu desenvolvimento, como o grande volume de trabalho necessário para o desenvolvimento de *primers* específicos para os *loci* de microssatélites de cada espécie. É imprescindível a construção de uma biblioteca genômica, hibridização com sondas repetitivas, sequenciamento, busca de microssatélites, desenho e síntese de *primers* (Oliveira *et al.*, 2006).

Entretanto é possível aproveitar *primers*, denominados heterólogos, que foram desenvolvidos para uma espécie e empregá-los nas demais espécies do gênero (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. Coleta do material vegetal

Foram realizadas coletas de *B. dracunculifolia* em quatro fragmentos de Cerrado, uma no Estado de São Paulo, na fazenda Edgardia no município de Botucatu, uma no Estado de Minas Gerais, município de Delfinópolis e duas no Estado de Mato Grosso do Sul, uma na rodovia que liga Dourados a Ponta Porã e outra no distrito de Itahum, ambas no município de Dourados (Figura 5, Tabela 1).

A área da Fazenda Edgardia pertence à Unesp/Botucatu, a vegetação típica é classificada como Floresta Estacional Semidecidual (Veloso, 1992), ocorrendo na área remanescentes florestais pouco alterados ou que passaram por vários níveis de perturbações antrópicas. Também são encontradas no local Formação Pioneira Aluvial e Savana (Cerrado *sensu lato*) (Ortega e Engel, 1992). A precipitação média anual é de 1530 mm, com temperatura média anual de 20,3°C. O solo de maior predominância é a areia quartzosa (AQ) (Jorge e Sartori, 2002).

As duas áreas localizadas no município de Dourados possuem clima da região do tipo Cwa (mesotérmico úmido, com verão chuvoso), de acordo com a classificação de Köppen (Mato Grosso do Sul, 1990), com precipitações médias anuais de 1500 mm. As temperaturas médias variam de 18°C a 25°C nos meses mais frios e mais quentes, respectivamente (Peixoto, 2002). O solo é do tipo Latossolo Vermelho distroférico (Embrapa, 1999), textura argilosa, originalmente sob vegetação de Cerrado.

O município de Delfinópolis, sudoeste de Minas Gerais, tem como clima predominante o tipo Cwa, conforme a classificação climática de Köppen. A temperatura

média anual está em torno de 20,7°C, enquanto a precipitação média anual é de 1426,3 mm. Os solos são extremamente variáveis, incluindo Cambissolos, Latossolo Vermelho-Amarelo e Latossolo Vermelho-Escuro.

De acordo com a classificação pelo sistema internacional de Koeppen, o clima do tipo CWa é constituído pela letra “C” que significa que a temperatura média do mês mais frio é inferior a 18°C. A letra “w” significa que a região tem uma média pluviométrica menor que 30 mm no mês mais seco e o “f” significa mais que 30 mm de chuva no mês mais seco. Quanto à temperatura a subdivisão é em “a” e “b” respectivamente, com mais e menos 22°C como temperatura média do mês mais quente (Setzer, 1966).



**Figura 5** – Localização das populações de *B. dracunculifolia*, Dourados (MS) e Itahum (MS), Botucatu (SP) e Delfinópolis (MG). Fonte Google Earth 2012.



**Tabela 1** – Localização e caracterização dos fragmentos de cerrado em que as populações de *B. dracunculifolia* foram coletadas.

<i>Localidade</i>	<i>Município</i>	<i>Data Coleta</i>	<i>Número acessos</i>	<i>Coordenadas geográficas</i>	<i>Altitude</i>
Fazenda Experimental Edgardia	Botucatu, SP.	24/10/08	30	22°47'30"S 48°22'30"O	691m
Rodovia BR 463.	Dourados, MS.	05/01/09	30	22°14'56"S 54°53'49"O	411m
Rodovia MS 270.	Distrito de Itahum, Dourados, MS.	01/02/09	32	22°08'09"S 55°08'20"O	487m
Propriedade particular	Delfinópolis, MG.	12/04/09	30	20°32'58"S 46°56'45"O	796m

O método das coletas consistiu em percorrer uma extensão de cada uma das áreas fragmentadas, coletando-se material vegetal de todos os indivíduos de *Baccharis dracunculifolia* avistados até que o número de 30 acessos fosse atingido. Procurou-se conduzir a coleta de amostras dos indivíduos na parte central, evitando-se a coleta nas margens dos fragmentos. De cada indivíduo, foram coletadas aproximadamente 15 folhas jovens para a extração de DNA, e armazenadas em tubos tipo *Falcon* com capacidade de 15 mL, com sílica gel, até o transporte para o laboratório onde ficaram armazenadas a uma temperatura de -20°C. Foram coletados de cada acesso, em média cinco ramos terminais com pelo menos 30 cm de comprimento, todos na fase vegetativa para serem posteriormente utilizadas para a extração dos óleos essenciais.

A determinação da localização geográfica do lugar de coleta e de cada acesso (altitude, latitude e longitude) foi medida através de GPS (*Global Positioning System*) (e-trex, Garmin®).

## 6.2. Secagem do material vegetal

Após a coleta, as folhas de *Baccharis dracunculifolia* foram separadas dos caules, colocadas em bandejas e secas em estufa com circulação de ar e temperatura controlada de 40°C. Foram realizadas pesagens diárias subsequentes, até que a massa seca se mantivesse constante. O material seco foi armazenado em sacos de papel até o momento da extração dos óleos essenciais por hidrodestilação.

A secagem do material vegetal foi conduzida de acordo com os locais de coleta, a população de Botucatu no Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrônomicas da Unesp, Botucatu, as populações de Dourados e Itahum no Laboratório de Plantas Medicinais na Universidade Federal da Grande Dourados e a população de Delfinópolis no Laboratório de Produtos Naturais no Instituto Agronômico de Campinas.

### **6.3. Extração e análise da composição química dos óleos essenciais.**

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, em aparato tipo Clevenger por duas horas, a massa vegetal média foi de 50 g por acesso, posteriormente, foram armazenados em frascos de vidro transparente devidamente identificado e mantidos no freezer a 4°C até a análise da composição química. O rendimento foi calculado por meio da relação da massa do óleo essencial obtido com a massa de material vegetal seco utilizado na extração.

Os óleos essenciais foram quantificados por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC), dotado de coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), hélio como gás de arraste (1,7 mL/min), injetor a 240°C, detector a 230°C e o seguinte programa de temperatura: 80°C - 150°C, 6°C/min; 150°C - 190°C, 2°C/min; 190°C - 280°C, 10°C/min; 280°C (6 min.) e split 1/20. As análises foram realizadas em triplicata.

Após a análise por CG-DIC, os óleos essenciais foram analisados em cromatógrafo em fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), operando a 70 eV. Uma série homologa de n-alcenos (C<sub>9</sub>H<sub>20</sub> - C<sub>25</sub>H<sub>52</sub> Sigma Aldrich, 99%); foi utilizada para o cálculo dos índices de retenção, aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (Van den Dool e Kratz, 1963).

A identificação das substâncias dos óleos essenciais foi baseada em comparações dos tempos de retenção, índices de retenção (IR), dos espectros de massas das substâncias com a biblioteca do sistema CG-EM (Nist 62.lib) e literatura Adams (1995).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com auxílio do programa estatístico SANEST (Zonta e Machado, 1985). Para realização das análises, considerou-se cada

indivíduo um tratamento, com três replicatas de injeção e; cada composto químico foi considerado uma variável.

A Análise de Componentes Principais (ACP) apresentada por Morgano *et al.* (1999), por meio do software Pirouette® 3.02 (Infometrix, WA, 2001), foi utilizada para a verificação da análise multivariada.

#### **6.4. Caracterização molecular via marcador microsatélite (SSR)**

A caracterização molecular dos acessos de *Baccharis dracunculifolia* foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética na Escola Superior de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (ESALQ/USP).

As folhas dos materiais vegetais foram colocadas em cadinho de porcelana e em seguida adicionado nitrogênio líquido, e então maceradas com um pistilo até a obtenção um pó fino. Este material foi colocado em tubo de *Eppendorf* de 2,0 mL e armazenado separadamente em freezer a -20°C, para posterior extração dos DNAs.

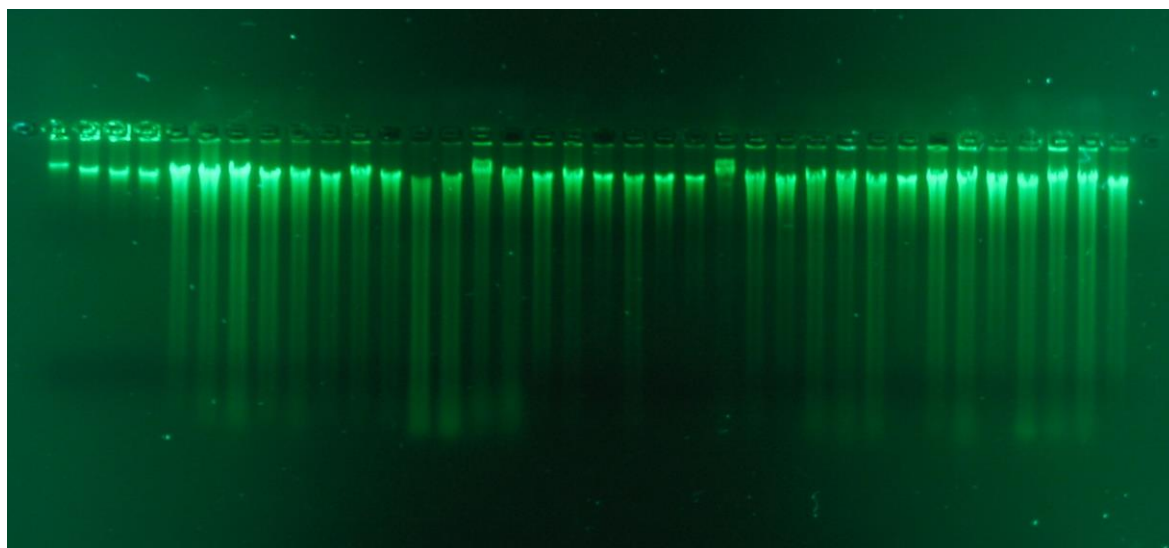
#### **6.5. Extração e quantificação do DNA**

Para a caracterização e estudo da estrutura genética populacional de *Baccharis dracunculifolia*, o DNA dos acessos foi extraído seguindo o protocolo CTAB, adaptado; (Doyle e Doyle, 1990).

Os tubos contendo o material vegetal foram identificados para cada acesso de cada população, e adicionados 1000 µL de tampão de extração, pré-aquecido a 65°C. O tampão utilizado foi o CTAB 3% (brometo de cetiltrimetilamonio), contendo: TRIS (tris-hidroximetil-aminometano) - HCl 0,1 M pH 8,0; NaCl 1,2 M; CTAB 3%; EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 30 mM pH 8,0 e mercaptoetanol a 3%. Os tubos foram pré-aquecidos a 65°C, os quais foram fechados e agitados para ressuspender o tecido no tampão, sendo posteriormente levados ao banho-maria (65°C) por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo *Eppendorf*. Depois que o sobrenadante foi transferido para outro tubo marcado foram adicionados 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), os tubos agitados por 5 minutos invertendo-os no mínimo 20 vezes até fazer uma emulsão homogênea, e a seguir centrifugados por 15 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos tubos também com as

mesmas identificações, sendo adicionados, nesta etapa, cerca de 70% (v/v) do volume ( $\approx 500 \mu\text{L}$ ) de isopropanol gelado, invertendo suavemente os tubos até formar um precipitado. Os tubos foram centrifugados durante 15 minutos a 10000 rpm. O máximo de sobrenadante foi descartado e o precipitado seco à temperatura ambiente e em seguida adicionados 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (v/v) para lavar o precipitado, deixando-o imerso por 5 a 10 minutos. Os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 10000 rpm; em seguida, adicionados 500  $\mu\text{L}$  de etanol 95% (v/v) para lavagem do precipitado. A seguir, os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 12000 rpm; foi retirado o máximo do etanol e o *pellet* seco em temperatura ambiente. Para ressuspender o *pellet* foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) em cada amostra as quais foram então armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$ . Para assegurar que a quantidade das amostras fosse suficiente para todas as etapas da pesquisa foi realizada a extração de DNA em duplicata.

A fim de avaliar a qualidade e concentração do DNA extraído, foi realizada a quantificação em gel de agarose 0,8%. Para tal procedimento, utilizou-se uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  da suspensão final do DNA em TE acrescidos de 1,5  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol para o carregamento do gel, o qual foi corado com *Syber safe*. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal de acrílico, em temperatura ambiente e voltagem de 110 V, amperagem de 470 A por 120 minutos. A quantificação foi realizada por meio de comparações entre o tamanho e a intensidade da bandas do DNA com as bandas de concentrações conhecidas de DNA-padrão do *fago*  $\lambda$  (40, 80, 100 e 200 ng) e ainda um *ladder* de 100 pb. O DNA das amostras foi diluído com adição de 1  $\mu\text{L}$  de RNase ( $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), deixando-a em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  por uma hora, para se obter uma concentração final de 10 ng/ $\mu\text{L}$  a fim de se padronizar as reações de PCR, Figura 6.



**Figura 6** - Perfil de gel de agarose 0,8% corados com *Syber Safe*, mostrando a quantificação de 30 acessos da população coletada em Itahum, Estado de Mato Grosso do Sul.

#### **6.6. Avaliação do polimorfismo**

Depois de padronizadas as concentrações do DNA, foram feitas a avaliações do polimorfismo das populações. Para este trabalho foram testados 13 pares de *primers* desenvolvidos para a espécie, sendo selecionados 5 deles para a genotipagem.

Para aprimorar as condições ideais de amplificação para cada *primer*, foram obtidas diversas reações de PCR testes, utilizando cinco indivíduos de *B. dracunculifolia*, um de cada população, variando as condições de temperatura de anelamento (55 a 65°C), volumes de DNA (1,0 - 3,0  $\mu$ L), dos *primers* com concentração de 10  $\mu$ M (1,0 - 4,0  $\mu$ L) e de MgCl<sub>2</sub> a 50  $\mu$ M (0,375 - 1,5  $\mu$ L), seguindo a programação demonstrada na Tabela 2, realizada em termociclador BIO-RAD My Cycler.

**Tabela 2** – Programação da reação de PCR para a amplificação dos *primers* de *B. dracunculifolia*.

<i>Etapa</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo (min.)</i>
1	96°C	2
2	94°C	1
3	TA°C*	1
4	72°C	1
5	30 vezes etapas 2 a 4	
6	72°C	7
7	15°C	∞

\*TA – temperatura de anelamento

As reações de amplificação por PCR foram processadas em um volume final de 15 µL, contendo 1,5 µL de Buffer 10X, 1,5 µL de dNTP 2,5 mM (0,150 mM final), 1,0 µL de Taq polimerase Invitrogen, 0,375 µL de BSA, 2 µL de DNA e os volumes de MgCl<sub>2</sub> e dos *primers* estabelecidos para cada *primer* (Tabela 3), completando-se o volume com água Milli-Q (q.s.p.), variando a temperatura de anelamento.

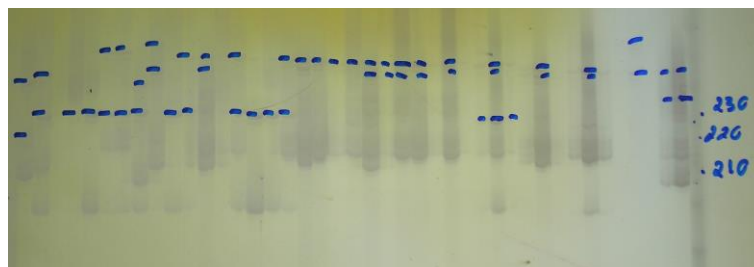
**Tabela 3** – Condições de temperatura, volumes de DNA, dos *primers* (F e R) e de MgCl<sub>2</sub> utilizados para melhor amplificação dos *locus* utilizados na genotipagem das populações de *B. dracunculifolia*.

<i>Nº Primer</i>	<i>TA°C</i>	<i>MgCl<sub>2</sub> (50mM.mg)</i>	<i>Primer (10µg/µL)</i>	<i>DNA (µg/µL)</i>
Bdr4	65	0,45	0,6	2
Bdr6	65	0,40	0,6	2
Bdr7	60	0,45	0,6	2
Bdr8	65	0,45	0,6	2
Bdr10	60	0,45	0,6	2

TA – Temperatura de anelamento.

Após a amplificação, os fragmentos foram separados em gel de poliacrilamida desnaturante 7%, contendo 8 M de uréia e 5X TBE (Tris-base; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O) em corrida com 1X TBE a 90 V por 4 h, aplicado em cuba de eletroforese vertical grande, modelo Hoefer SQ3 Sequencer (Pharmacia Biotech). A coloração dos géis, para visualização dos produtos de amplificação foi feita com nitrato de prata e, para a genotipagem, utilizou-se de um marcador de peso molecular padrão (*ladder 10 bp* –

Invitrogen®) para comparação das bandas obtidas. Fragmentos amplificados de diferentes tamanhos foram considerados alelos diferentes; (Figura - 7).



**Figura 7** – Amplificação em gel de acrilamida, população Itahum (MS).

## **6.7. Metodologia de análise estatística dos dados**

### **6.7.1. Teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg**

As frequências gênicas ou alélicas e genóticas em cada *locus* foram obtidas a partir da leitura dos dados nos géis de poliacrilamida. Desvios das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg em cada *locus* microssatélite foram avaliados por meio do teste exato de Fisher, utilizando o programa TFPGA (Miller, 1997).

### **6.7.2. Desequilíbrio genotípico entre pares de *locus***

O teste de desequilíbrio genotípico entre pares de *locus* foi avaliado com uso do programa GDA (Lewis e Zaykin, 2000), por meio da média composta de desequilíbrio de ligação de Burrows (Weir, 1979). Também foi utilizado o programa FSTAT (Goudet, 1995), para marcadores microssatélites nucleares. Para essa metodologia, genótipos de dois *locus* são associados várias vezes e a estatística é recalculada em um novo agrupamento de dados. A probabilidade (valor do  $p$ ) é avaliada como a proporção das estatísticas obtidas nos agrupamentos de dados aleatórios que é maior ou igual ao observado. O número de aleatorizações é fixado pelo grau de significância selecionado ( $\alpha = 0,01$ ), bem como pelo número de indivíduos e *locus*.

### **6.7.3. Diversidade genética**

O programa STRUCTURE 2.3.2 (Pritchard *et al.*, 2000) foi usado para agrupar indivíduos em “*clusters*” de acordo com a abordagem bayesiana. Esta análise permite

as observações de indivíduos migrantes ou pertencentes a mais de uma região geográfica ou a zonas híbridam, permitindo atribuir indivíduos a “*clusters*”, a partir de seu genótipo multiloco (Baldoni *et al.*, 2006).

Foi utilizado o modelo “admixture model” com frequências alélicas correlacionadas. Os estimadores de Evanno *et al.* (2005) e Pritchard *et al.* (2000) foram usados para indicar o valor de K que melhor acomoda a diversidade alélica observada.

#### **6.7.4. Estrutura genética**

A estrutura genética das populações foi avaliada em termos da decomposição da diversidade genética total em seus componentes inter e intrapopulacionais, conforme preconizado por Nei (1972) e com base no procedimento de análise de variância de frequências alélicas descrito em Weir (1996).

Os parâmetros relacionados acima foram estimados com o auxílio do programa GDA (Lewis e Zaykin, 2000). O parâmetro  $R_{ST}$ , mais adequado para estimação da divergência genética entre as populações quando se utilizam marcadores microssatélites, foi estimado com uso do programa  $R_{ST}$  Calc (Goodman, 1997).

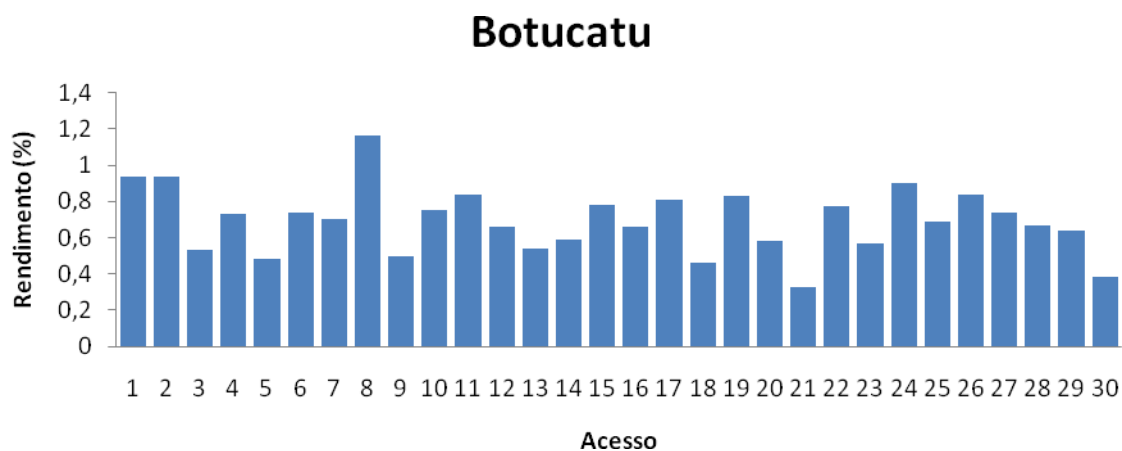


## 7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1. Resultados

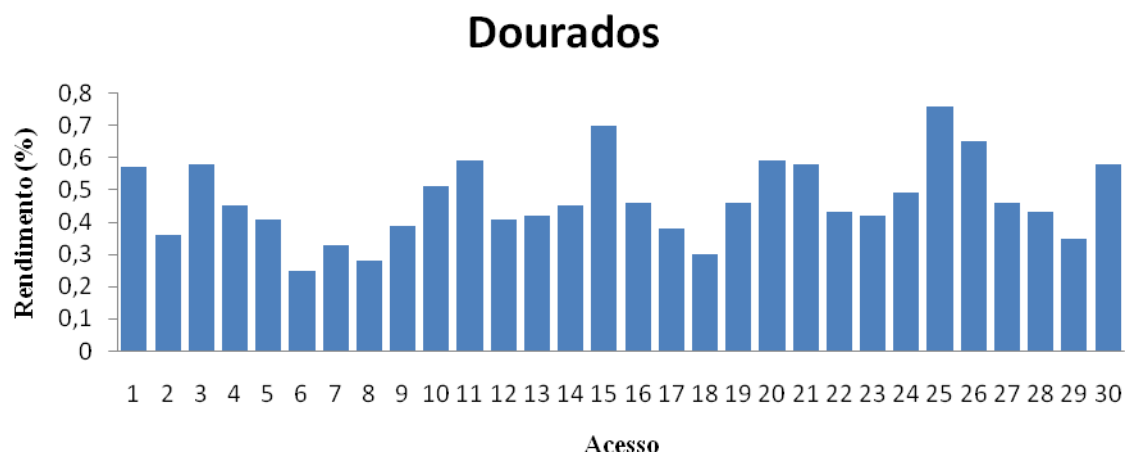
#### 7.1.1. Rendimento e caracterização da composição química dos óleos essenciais das populações nativas de *Baccharis dracunculifolia*

Os rendimentos dos óleos essenciais da população Botucatu variaram de 0,33% para o acesso 21 e 1,16% para o acesso 8 (Figura 8).



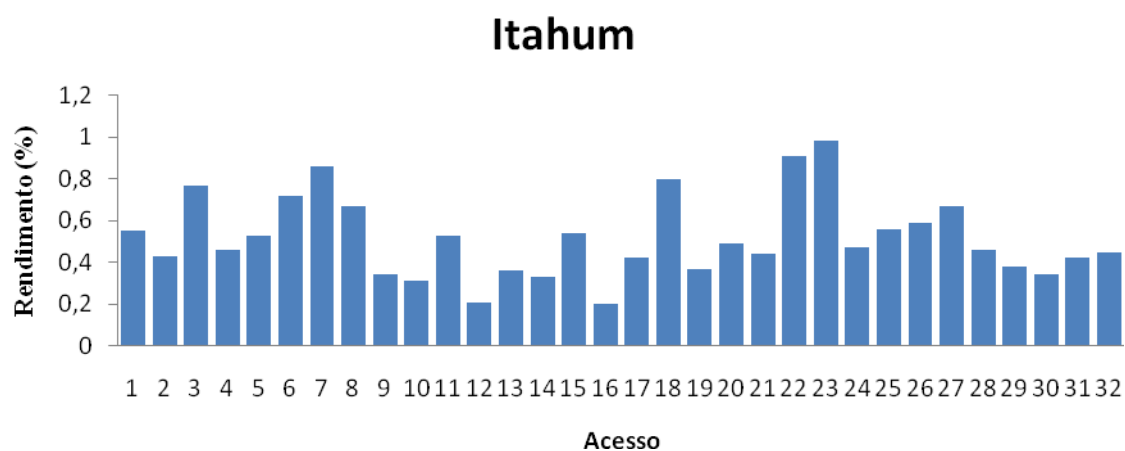
**Figura 8** – Rendimento dos óleos essenciais dos acessos de *B. dracunculifolia* da população de Botucatu (SP).

Na população de Dourados o rendimento dos óleos essenciais variou de 0,25% para o acesso 6 e 0,76% para o acesso 25 (Figura 9).



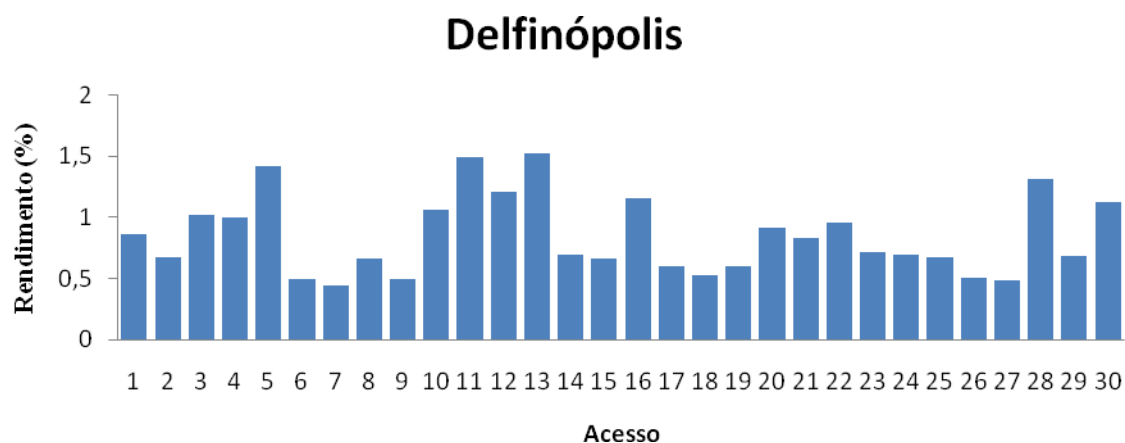
**Figura 9** – Rendimento dos óleos essenciais dos acessos de *B. dracunculifolia* da população de Dourados (MS).

O rendimento dos óleos essenciais da população Itahum variou de 0,20% para o acesso 16 e 0,98% para o acesso 23 (Figura 10).



**Figura 10** – Rendimento dos óleos essenciais dos acessos de *B. dracunculifolia* da população de Itahum (MS).

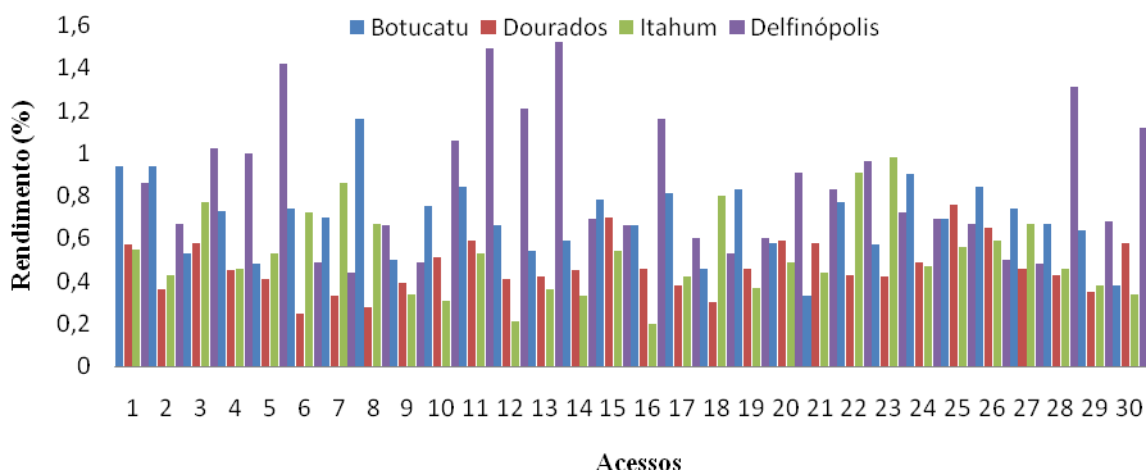
Na população Delfinópolis o rendimento dos óleos essenciais variou de 0,44% para o acesso 7 e 1,52% para o acesso 13 (Figura 11).



**Figura 11** – Rendimento dos óleos essenciais dos acessos de *B. dracunculifolia* da população de Delfinópolis (MG).

O rendimento dos óleos essenciais de todos os acessos das populações estudadas mostra que a população de Delfinópolis foi a que apresentou o maior rendimento médio, correspondendo a 0,85%. O rendimento médio nas outras populações foi de 0,69% para Botucatu; 0,47% para Dourados e 0,52% para Itahum (Figura 12).

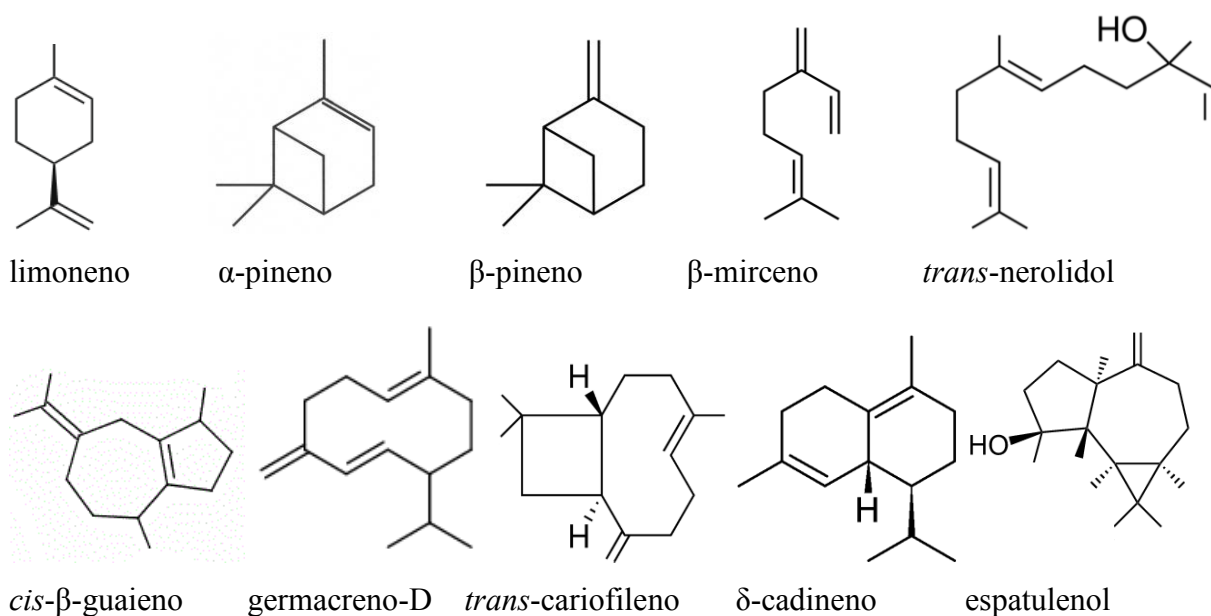
Esses valores são inferiores aos obtidos por Fabiane *et al.* (2008), para folhas de *B. dracunculifolia* coletados no Estado do Paraná entre fevereiro e maio de 2006 (1,4%). Sousa *et al.* (2009) encontraram para populações cultivadas em Campinas, Estado de São Paulo, produção semelhante com rendimento de óleo essencial variando de 0,31% a 0,70%. Budel *et al.*; (2004) obtiveram rendimento de 0,8% de óleo essencial no mês de fevereiro de 2002 na região de Vila Velha, Ponta Grossa, Estado do Paraná. Siqueira *et al.* (1986), analisando óleos essenciais de plantas no Rio Grande do Sul, encontraram 0,25%. Loayza *et al.* (1995) encontrou rendimento entre 0,16 a 0,32% em plantas coletadas na Bolívia e Weyerstahl *et al.*, (1996) analisando o óleo essencial de vassoura encontrou 0,5 a 1%.



**Figura 12** – Comparação do rendimento dos óleos essenciais das populações de *B. dracunculifolia*.

Foi efetuada a composição de todos os acessos de todas as populações de *B. dracunculifolia* e o dados encontram-se no Anexo 1.

Por meio da análise da composição química dos óleos essenciais dos acessos de *B. dracunculifolia* provenientes das populações nativas de Botucatu (SP), Delfinópolis (MG), Dourados e Itahum (MS) verificaram-se dez constituintes comuns a todos os acessos, os quais são responsáveis por aproximadamente 81,0% da constituição dos óleos essenciais. Destes, quatro pertencem à classe dos monoterpenos (limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno,  $\beta$ -mirceno) e seis dos sesquiterpenos (*trans*-nerolidol, *cis*- $\beta$ -guaiano, germacreno-D, *trans*-cariofileno  $\delta$ -cadineno, espatulenol), cujas estruturas estão demonstradas na Figura 13.



**Figura 13** – Estrutura química dos monoterpenos e sesquiterpenos mais abundantes nos óleos essenciais dos acessos das populações de Botucatu/SP, Delfinópolis/MG, Dourados e Itahum/MS de *Baccharis dracunculifolia*.

De acordo com a composição química média dos óleos essenciais dos acessos das quatro populações; (Tabela 4), observa-se a predominância dos sesquiterpenos, onde o *trans*-nerolidol foi a majoritária para as populações de Botucatu (SP), Dourados (MS) e Delfinópolis, correspondendo a 28,23%; 26,13% e 38,64%, respectivamente. Essa variação foi significativa para a população de Itahum (MS) onde a proporção relativa do *trans*-nerolidol foi 22,68%. Assim como na população de Itahum, a porcentagem relativa do espatulenol foi expressiva para a população de Dourados, correspondendo a 19,70% da composição química, quando comparada a Botucatu (7,69%) e Delfinópolis (9,08%).

Em relação à classe dos monoterpenos, a população de Botucatu foi a que apresentou a maior proporção relativa (35,29%), seguida por Itahum (29,23%), Dourados (22,00%) e Delfinópolis (20,69%). Dentre os monoterpenos, o limoneno e o  $\beta$ -pineno são as substâncias mais abundantes para as quatro populações, variando de 9,85% (Dourados/MS) a 13,69% (Botucatu/SP) para o limoneno e 5,30% (Delfinópolis/MG) a 12,86% (Itahum/MS) para o  $\beta$ -pineno (Tabela 4).

**Tabela 4** – Composição química média (%) do óleo essencial das folhas de populações nativas de *B. dracunculifolia* de ocorrência em Botucatu, Estado de São Paulo, Delfinópolis, Estado de Minas Gerais; Dourados e Itahum, Estado de Mato Grosso do Sul.

Substância	População			
	Botucatu	Delfinópolis	Dourados	Itahum
$\alpha$ -pineno	6,29 *aA	3,46 *bB	2,52 *cB	4,07 *bcB
$\beta$ -pineno	12,28 *abA	5,30 *aA	8,93 *bcAB	12,86 *cB
$\beta$ -mirreno	3,03 *aA	1,26 *bB	0,70 *cB	1,25 *bB
limoneno	13,69 *aA	10,67 *abA	9,85 *bA	11,05 *abA
<i>trans</i> -cariofileno	2,14 *bB	3,29 *cC	1,67 *bcBC	1,18 *aA
germacreno- <i>D</i>	3,21 *bB	4,40 *cC	1,10 *cC	0,76 *aA
<i>cis</i> - $\beta$ -guaieno	4,51 *aA	4,56 *bB	3,85 *aA	1,84 *aA
$\delta$ -cadineno	2,68 *aA	2,56 *cC	1,98 *bBC	1,28 *aAB
<i>trans</i> -nerolidol	28,23 *bB	38,64 *bB	26,13 *bB	22,68 *aA
espatulenol	7,69 *bB	9,08 *aA	19,70 *aA	23,50 *bB
<b>Total identificado</b>	<b>83,75</b>	<b>83,22</b>	<b>76,43</b>	<b>80,47</b>
Monoterpenos	35,29	20,69	22,00	29,23
Sesquiterpenos	48,46	62,53	54,43	51,24

\*Teste de tukey para médias de populações. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significancia indicado: 5% (letra minúscula), 1% (letra maiúscula).

### 7.1.2. Análise comparativa da composição química dos óleos essenciais das populações Botucatu, Dourados, Delfinópolis e Itahum.

A Análise de Componentes Principais (ACP) foi aplicada à composição química dos óleos essenciais para as dez substâncias mais abundantes de todos os acessos coletados (Tabela 5).

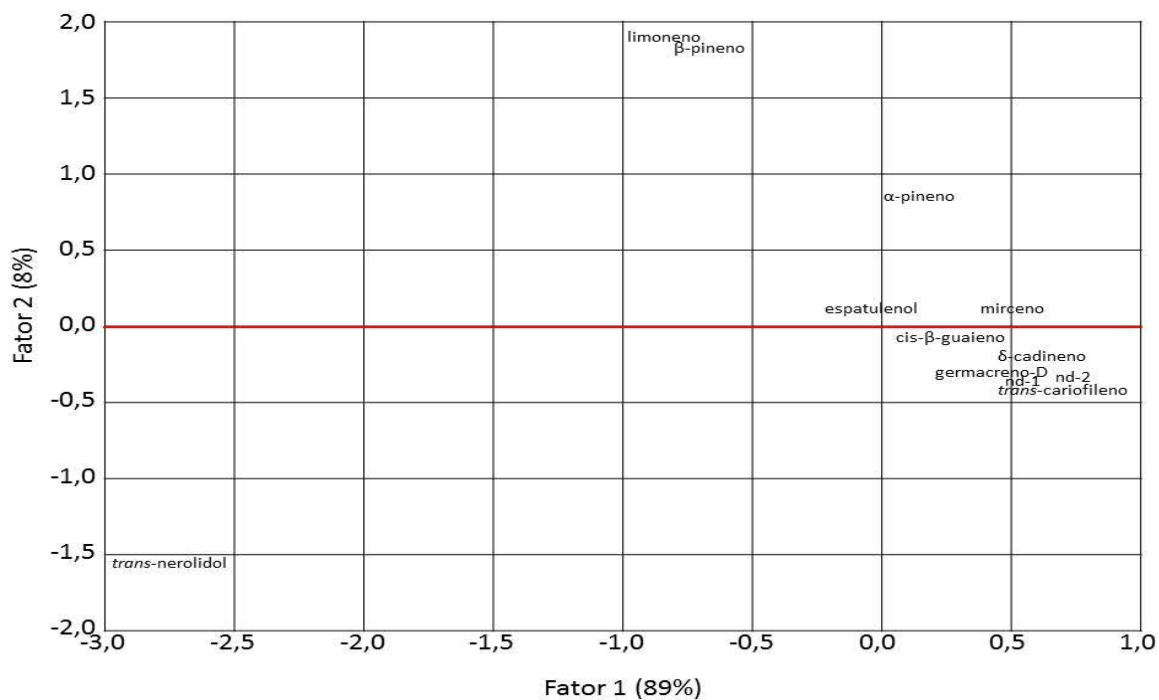
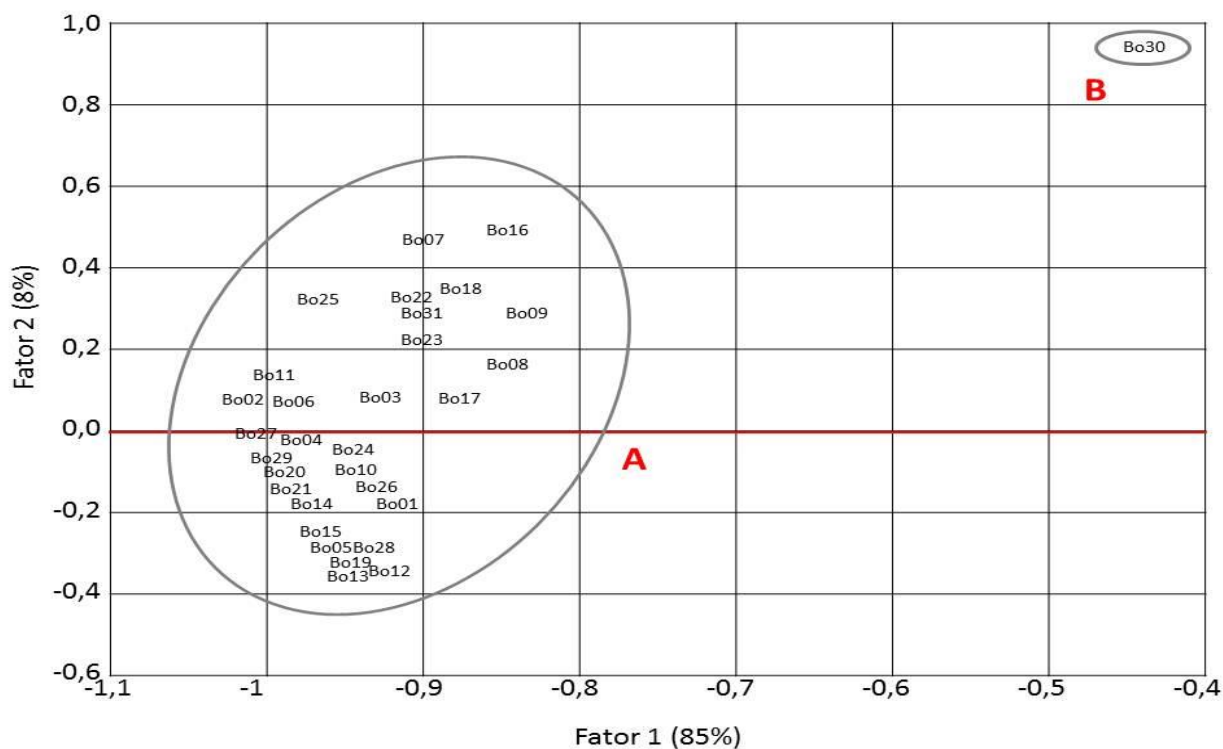
Na população de Botucatu (Figura 14) a Análise de Componentes Principais (ACP) exprimiou 93% da variação total nos dois primeiros componentes principais (eixos), sendo de 85% no primeiro eixo e de 8% no segundo. Essa análise refletiu a separação dos acessos da população de Botucatu em dois grupos, sendo o grupo A formado pelos indivíduos 1 ao 29 discriminado pela substância majoritária *trans*-nerolidol e o grupo B, constituído pelo indivíduo 30, sendo discriminado pelo limoneno e  $\beta$ -pineno.

O óleo essencial das folhas de *B. dracunculifolia* coletadas no Bioma Mata Atlântica, região de Campos de Altitude, na cidade de Campos do Jordão, Estado de São

Paulo, em junho de 2005, apresentou baixa proporção relativa de monoterpenos, 0,30%, e como substância majoritária o  $\beta$ -elemeno (53,31%), sesquiterpeno não oxigenado (Lago *et al.*, 2008), baixa concentração de *trans*-nerolidol (2,30%) e ausência de espatulenol. Por outro lado, no óleo essencial das folhas coletadas no Estado do Paraná (Fabiane *et al.*, 2008) foram identificados o  $\beta$ -pineno (27,45%) como substância majoritária, seguida pelo *trans*-nerolidol (14,02%) e espatulenol (9,54%). Esses resultados são divergentes dos obtidos no presente estudo para as quatro populações avaliadas. Sousa *et al.* (2009) identificaram 14 substâncias em acessos cultivados, dos quais 8 correspondem aos encontrados neste trabalho,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, *trans*-cariofileno, germacreno-*D*, nerolidol, espatulenol e  $\delta$ -cadineno. Estas substâncias, além do mirceno, também foram encontrados por Ferracini *et al.* (1995).

Outras espécies do gênero *Baccharis* apresentaram como composto majoritário o  $\beta$ -pineno (*B. articulata*), em concentrações que variaram de 41,4% a 52,8%, além de *B. cogata*, com 27,2% desta mesma substância. Amostras de *B. semisserrata* apresentaram 15,5% e 25,5% de espatulenol, e amostras de *B. uncinella* apresentaram 47,7% e 23,1% deste composto, enquanto *B. oxyodonta* apresentou 24,3% de limoneno (Agostini *et al.*, 2005).

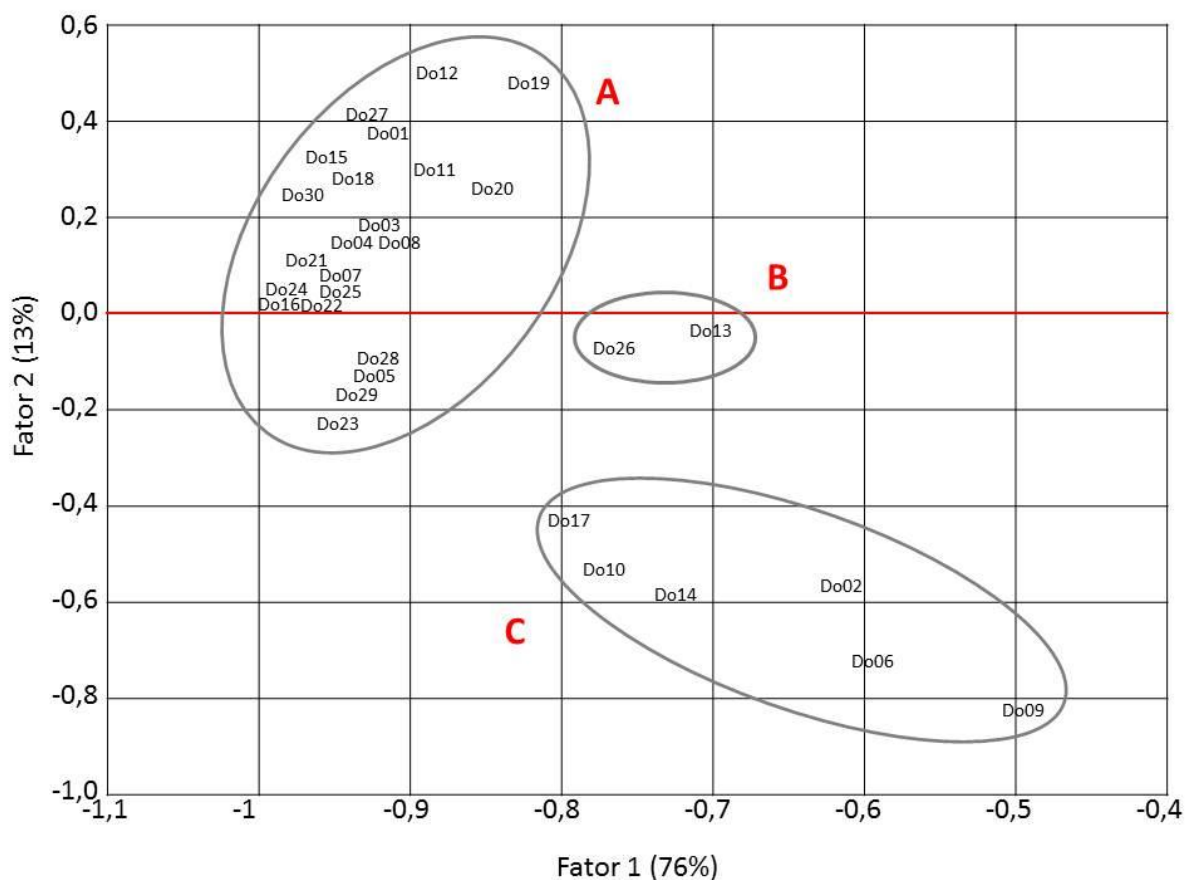
Neste trabalho a proporção relativa média de limoneno foi de 13,69% para a população de Botucatu; 9,85% para Dourados; 10,67% para Delfinópolis e 11,05% para Itahum, sendo que a variação observada na população de Dourados foi a única significativa.

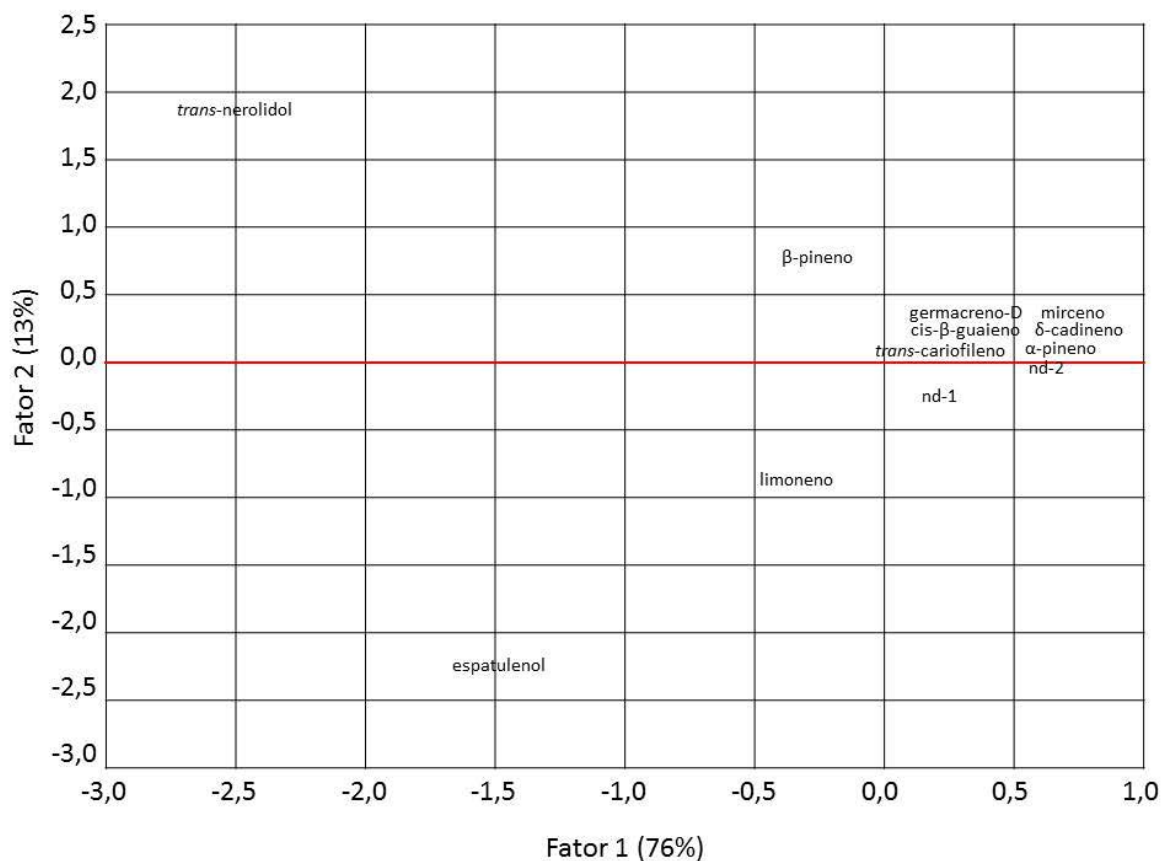


**Figura 14** - Padrão de divergência química entre os indivíduos genotipados da espécie *B. dracunculifolia* (população de Botucatu) definido pela Análise de Componentes Principais, com base nos principais componentes do óleo essencial.



Nos indivíduos da população de Dourados (Figura 15), a Análise de Componentes Principais (ACP) demonstrou 89% da variação total nos dois primeiros componentes principais (eixos), sendo de 76% no primeiro eixo e de 13% no segundo. Tres grupos foram formados, sendo o grupo A composto pelos indivíduos 1, 3 ao 5, 7, 8, 11, 12, 15, 16, 18 ao 25 e 27 ao 30; o grupo B, constituído pelo indivíduo 13 e 26 e o grupo C pelos indivíduos 2, 6, 9, 10 14 e 17.

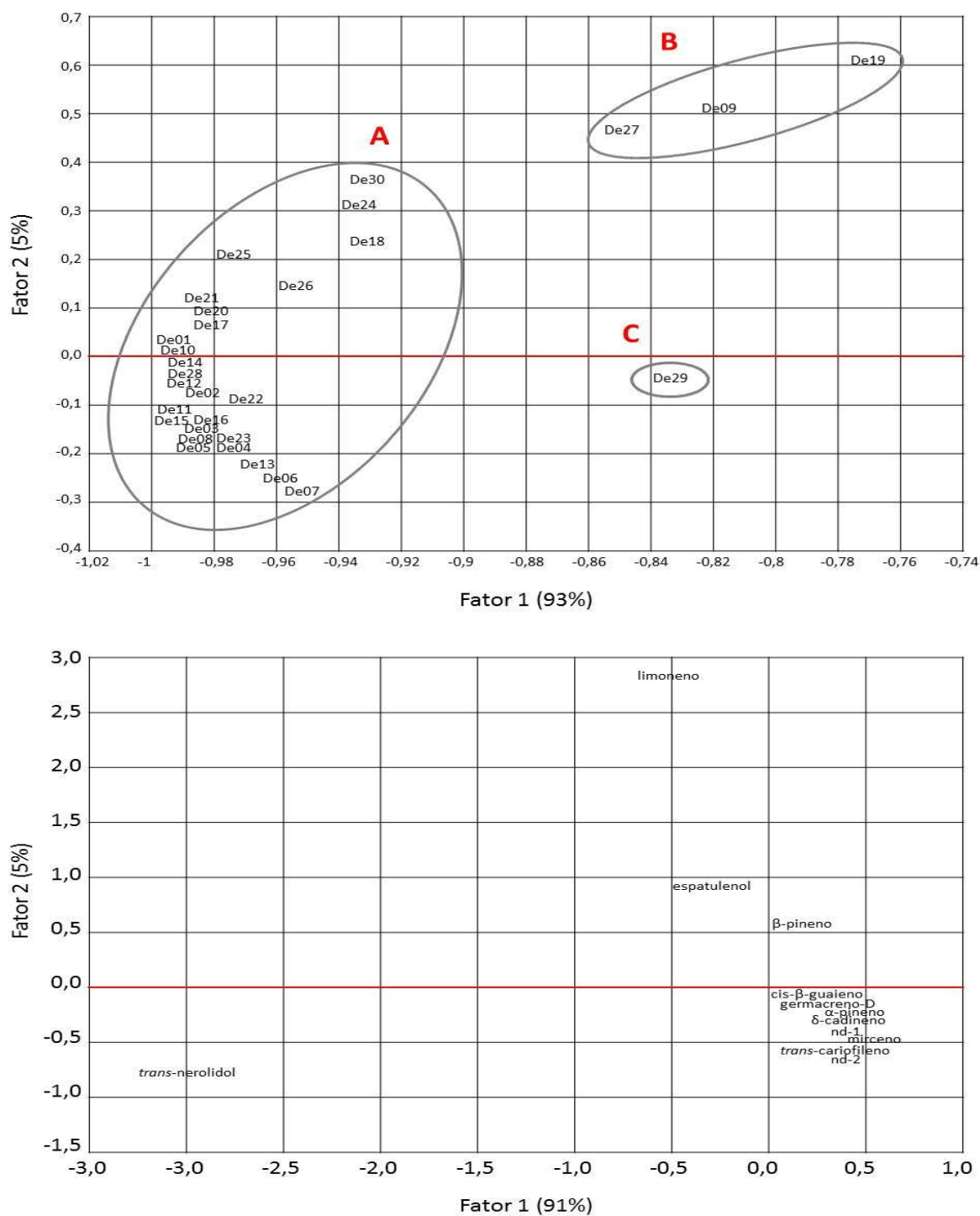




**Figura 15** - Padrão de divergência química entre os indivíduos genotipados da espécie *B. dracunculifolia* (população de Dourados) definido pela Análise de Componentes Principais, com base nos principais componentes do óleo essencial.

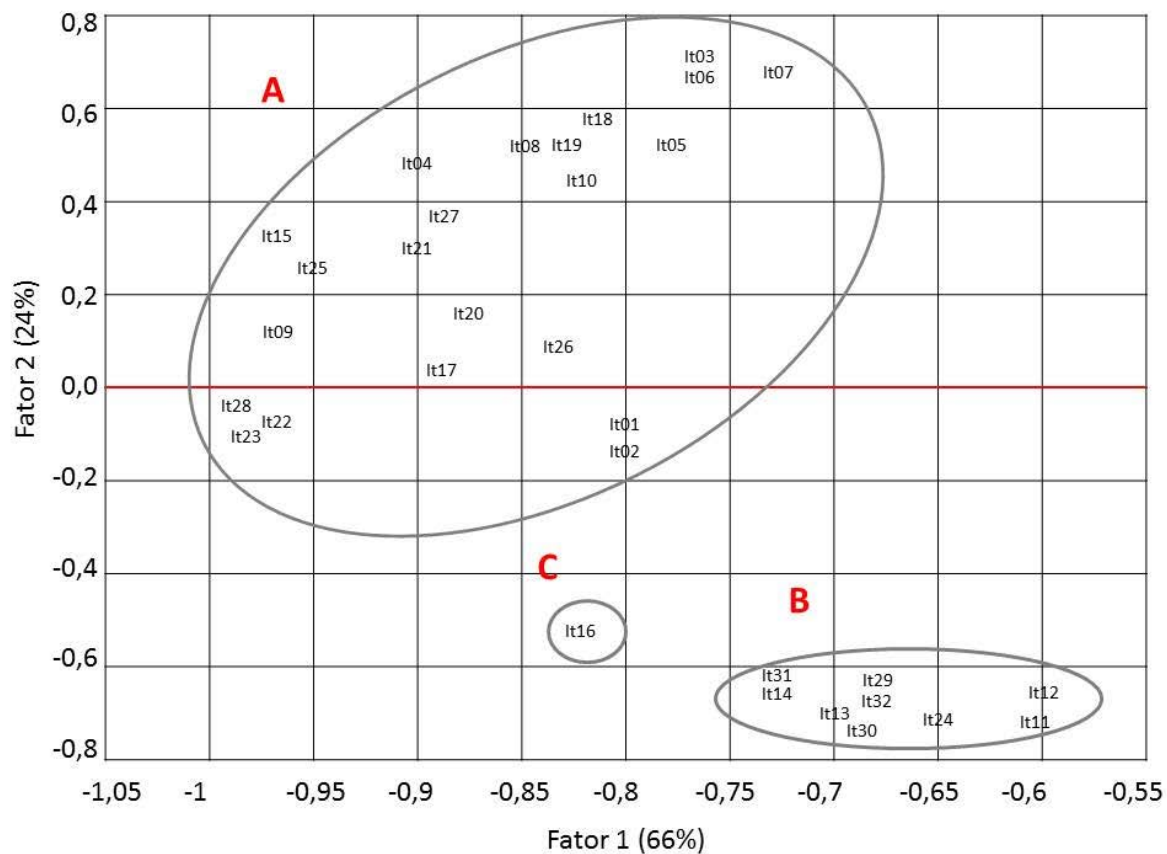
O grupo A foi discriminado pelo *trans*-nerolidol, o B pelas substâncias *trans*-nerolidol, espatulenol e  $\beta$ -pineno e para o grupo C o espatulenol.

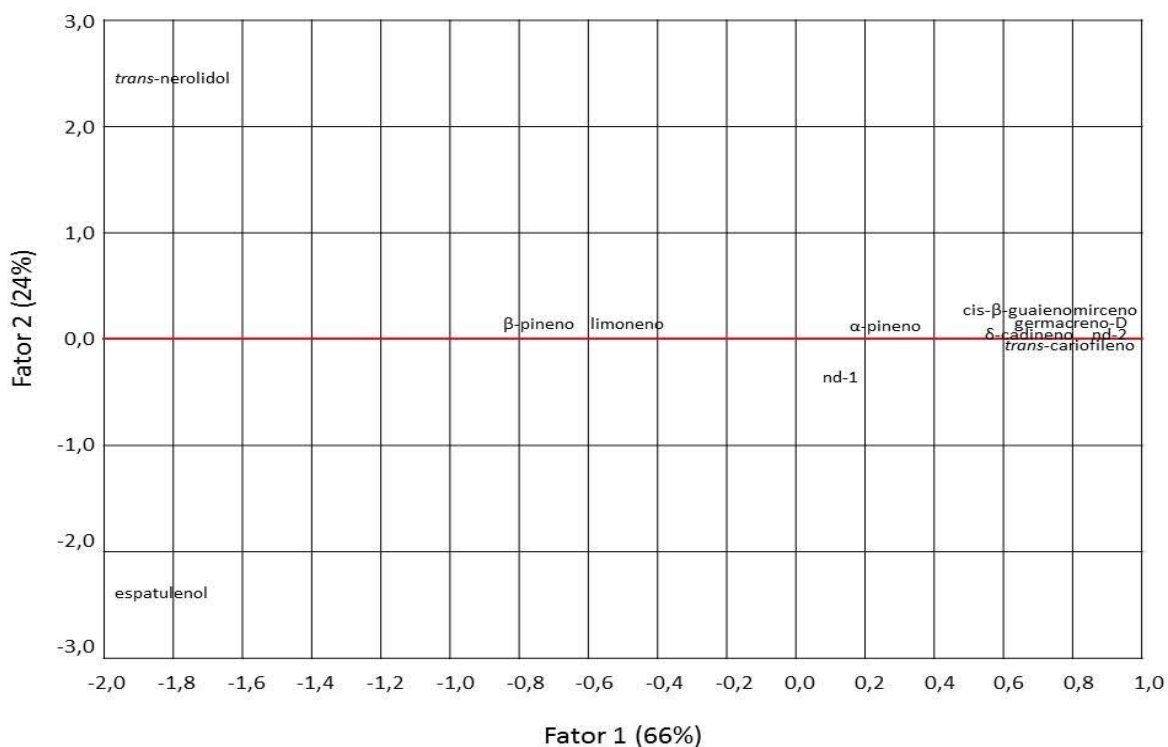
Na amostra de Delfinópolis (Figura 16) a Análise de Componentes Principais (ACP) demonstrou 96% da variação total nos dois primeiros componentes principais (eixos), sendo de 91% no primeiro eixo e de 5% no segundo. Tres grupos foram formados, sendo o grupo A composto pelos indivíduos 1 ao 8, 10 ao 18, 20 ao 26, 28 e 30 sendo discriminado pelo *trans*-nerolidol; o grupo B, constituído pelos indivíduos 9, 19 e 27 discriminado principalmente pelo limoneno e o grupo C pelo indivíduo 29 sendo discriminado pelo espatulenol.



**Figura 16** - Padrão de divergência química entre os indivíduos genotipados da espécie *B. dracunculifolia* (população de Delfinópolis) definido pela Análise de Componentes Principais, com base nos principais componentes do óleo essencial.

Dentro da população de Itahum (Figura 17) a Análise de Componentes Principais (ACP) demonstrou 90% da variação total nos dois primeiros componentes principais (eixos), sendo de 66% no primeiro eixo e de 24% no segundo. Três grupos foram formados, sendo o grupo A composto pelos indivíduos 1 ao 10, 12, 13, 15, 17 ao 23, 25 ao 28; o grupo B, constituído pelos indivíduos 11 ao 14, 24 e 29 ao 32 e o grupo C pelo indivíduo 16.



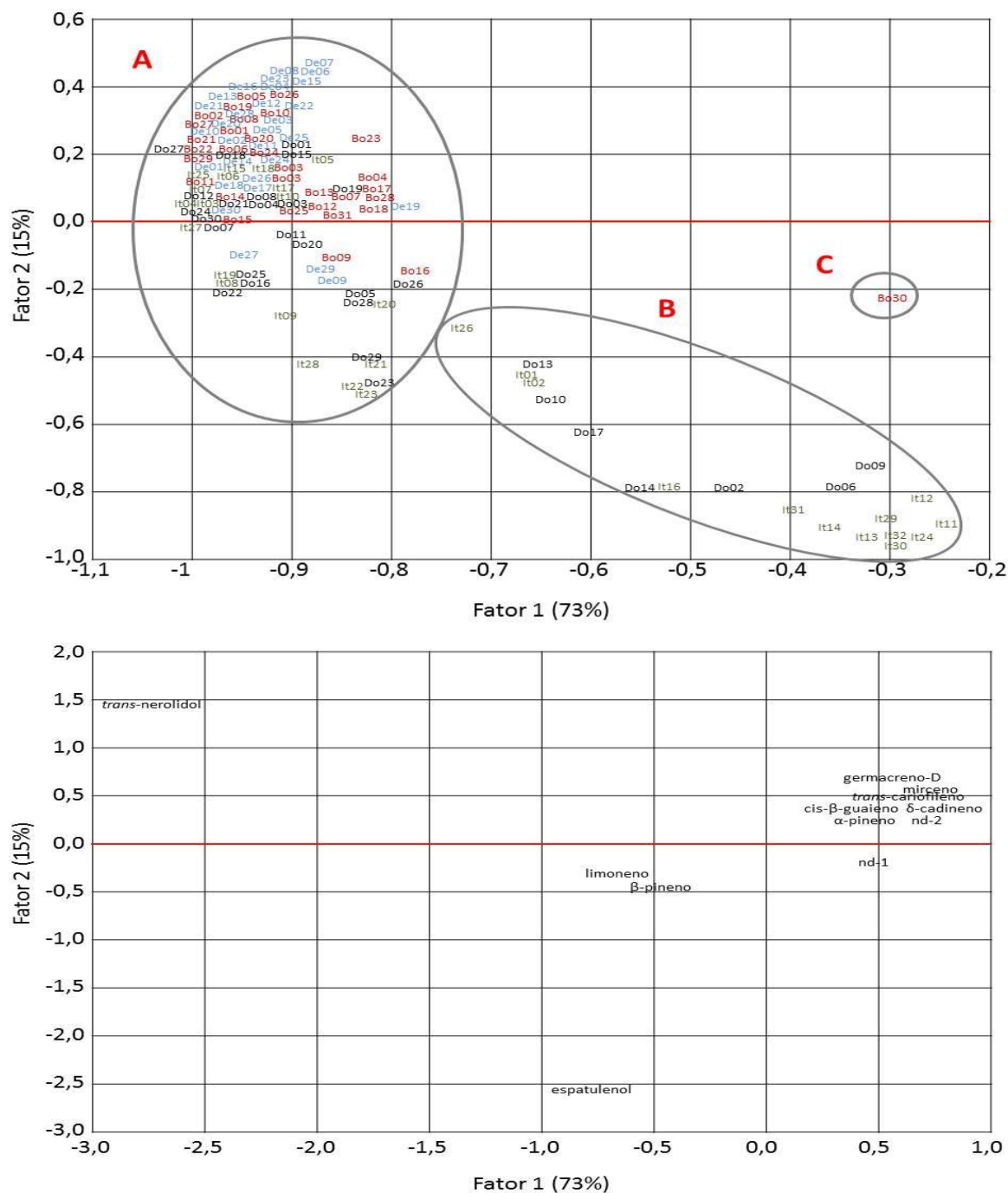


**Figura 17** - Padrão de divergência química entre os indivíduos genotipados da espécie *B. dracunculifolia* (população de Itahum) definido pela Análise de Componentes Principais, com base nos principais componentes do óleo essencial.

O grupo A foi discriminado pelas substâncias *trans*-nerolidol e espatulenol, o B pelas substâncias espatulenol e  $\beta$ -pineno e o grupo C pelo espatulenol.

Por meio da Análise de Componentes Principais (ACP) aplicada à composição química dos óleos essenciais para as 10 substâncias principais dos 120 indivíduos genotipados nas populações (Figura 18, Tabela 5), foi demonstrado que 88% da variação total ocorreu nos dois primeiros componentes principais (eixos), equivalente a 73% no primeiro eixo e 15% no segundo. Essa análise refletiu o isolamento dos acessos das quatro localidades, em três grupos. O grupo A formado pelos acessos das populações de Botucatu (com exceção do acesso 30) e Delfinópolis, além dos acessos 01, 03 ao 05, 07 ao 09, 11, 12, 15, 16 e 18 ao 30 da população Dourados e os acessos 03 ao 10, 15, 17 ao 23, 25 ao 28 e 30 ao 32 da população Itahum foi discriminado pelo *trans*-nerolidol, o grupo B, constituído pelos acessos 02, 06, 09 10, 13, 14 e 17 da população Dourados e 01, 02, 11, 12, 13, 14, 16, 24, 26 e 29 ao

32 da população Itahum foi discriminado pelo espatulenol e o grupo C composto apenas pelo acesso 30 da população Botucatu (Figura 18) sendo discriminado pelo limoneno e  $\beta$ -pineno.



**Figura 18** - Padrão de divergência química entre os indivíduos genotipados das quatro populações de *B. dracunculifolia* definido pela Análise de Componentes Principais, com base nos principais componentes do óleo essencial.

Estas variações na composição química podem ter sido determinadas pelo genótipo e/ou por fatores climáticos e edáficos através de adaptações a condições ecológicas ou de domesticação. A separação das populações nesses grupos foi estabelecida a partir dos seguintes componentes: grupo A: *trans*-nerolidol; grupo B: espatulenol, e grupo C:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e limoneno.

**Tabela 5** - Substâncias majoritárias (%) dos óleos essenciais dos acessos de *Baccharis dracunculifolia* provenientes das populações, Botucatu (SP), Dourados (MS), Delfinópolis (MG) e Itahum (MS).

Acesso	$\alpha$ -pineno	$\beta$ -pineno	mirreno	limoneno	<i>trans</i> -cariofileno	germacreno-D	<i>cis</i> - $\beta$ -guaieno	$\delta$ -cadineno	<i>trans</i> -nerolidol	espatulenol
Bo01	5,27	13,93	1,68	4,98	5,09	4,10	3,29	2,16	29,58	9,20
Bo02	6,64	12,80	2,98	16,34	2,31	3,19	4,59	2,38	28,76	6,99
Bo03	4,85	6,34	2,78	20,32	1,72	3,03	4,35	3,47	24,41	9,06
Bo04	8,54	9,79	3,61	15,72	2,65	2,95	3,58	2,34	30,02	6,56
Bo05	4,27	6,33	2,22	10,14	2,07	3,04	4,78	2,05	35,26	9,62
Bo06	10,68	14,28	3,89	16,17	1,23	1,61	2,05	1,61	33,47	5,37
Bo07	10,19	20,47	3,98	16,63	1,33	1,96	2,44	2,62	21,34	6,60
Bo08	3,13	24,97	1,61	7,56	3,33	2,34	4,45	2,65	25,66	8,88
Bo09	3,03	18,40	2,02	9,35	1,91	4,30	6,50	4,31	17,89	10,39
Bo10	5,22	4,22	2,47	18,32	1,10	2,86	4,32	2,59	32,12	8,60
Bo11	8,32	13,12	2,93	16,64	1,47	2,61	3,38	1,97	27,82	8,90
Bo12	4,05	8,14	1,81	5,53	2,61	2,58	5,57	3,42	31,80	10,18
Bo13	6,08	7,58	2,85	6,54	1,65	3,64	5,38	3,16	37,27	6,54
Bo14	5,15	12,26	2,54	8,57	1,95	3,02	4,88	3,65	32,27	7,59
Bo15	2,63	8,10	2,51	10,55	1,62	2,76	4,80	2,99	32,67	8,03
Bo16	10,91	12,34	4,32	15,14	1,98	3,87	6,64	3,62	14,58	10,19
Bo17	2,50	21,93	1,52	8,10	2,06	4,68	6,61	3,07	24,84	8,60
Bo18	10,34	8,66	4,37	22,02	1,33	2,12	4,64	2,08	21,30	7,63
Bo19	1,46	10,08	1,59	8,39	1,13	2,53	4,08	2,64	47,19	6,52
Bo20	3,02	13,26	2,35	14,47	2,86	3,52	4,78	2,49	35,26	5,78
Bo21	2,31	11,57	2,30	13,33	3,57	3,28	4,16	2,64	31,07	7,95
Bo22	6,58	22,21	3,36	12,35	1,66	2,57	3,21	2,28	23,52	7,82
Bo23	10,68	7,93	4,17	20,56	1,83	4,36	5,41	3,02	22,91	5,03



Tabela 5 - Continuação.

Acesso	$\alpha$ -pineno	$\beta$ -pineno	mirreno	limoneno	<i>trans</i> -cariofileno	germacreno-D	<i>cis</i> - $\beta$ -guaieno	$\delta$ -cadineno	<i>trans</i> -nerolidol	espatulenol
Bo24	2,55	9,32	2,96	16,08	3,80	6,94	6,40	2,97	25,59	5,82
Bo25	4,84	16,58	2,94	16,54	2,49	2,77	4,41	2,49	22,00	8,44
Bo26	12,77	7,28	4,72	12,90	1,40	2,97	3,18	1,61	38,69	4,47
Bo27	5,07	15,04	2,37	13,70	1,37	2,27	4,06	2,66	32,22	7,25
Bo28	5,70	4,40	2,82	12,63	3,02	4,84	5,06	3,56	35,09	8,08
Bo29	6,58	11,22	3,24	14,30	1,78	3,59	3,76	1,47	32,82	7,08
Bo30	11,70	19,38	6,88	18,67	2,77	3,23	4,94	3,07	5,83	6,92
Do01	1,60	6,31	0,61	8,48	0,98	1,29	3,49	2,05	46,91	13,66
Do02	4,25	16,37	0,82	17,26	1,41	1,09	3,26	1,92	6,10	25,28
Do03	0,04	0,04	0,04	4,44	1,53	1,75	3,79	1,89	35,29	18,58
Do04	0,04	0,04	0,04	10,76	1,73	1,42	3,81	1,36	32,59	16,37
Do05	0,04	0,04	0,04	9,62	3,08	1,07	4,10	1,89	18,24	15,38
Do06	0,04	0,04	0,04	8,47	0,75	0,65	1,71	0,99	7,14	45,07
Do07	0,04	0,04	0,04	10,01	0,84	0,04	1,02	0,78	34,28	19,65
Do08	0,04	0,04	0,04	15,08	0,66	0,53	1,78	0,86	33,76	14,82
Do09	0,04	0,04	0,04	16,22	1,24	1,24	3,44	2,34	2,65	20,91
Do10	0,04	0,04	0,04	17,08	2,07	0,77	3,65	2,53	12,91	21,69
Do11	3,10	18,62	0,78	7,60	1,58	1,21	6,20	4,29	23,51	12,28
Do12	3,50	16,16	0,87	4,88	3,97	2,05	4,93	1,66	32,41	10,41
Do13	7,52	18,91	1,80	8,52	1,67	2,87	7,91	3,75	11,74	14,57
Do14	2,84	12,34	0,75	14,64	1,27	0,60	3,09	2,33	9,48	29,51
Do15	5,33	10,07	1,53	4,42	1,30	1,81	4,41	2,88	33,48	15,24
Do16	2,75	6,78	0,04	8,32	1,57	0,04	1,64	1,27	32,95	23,85
Do17	3,88	6,15	0,62	3,60	2,48	0,72	2,39	1,69	17,52	34,98
Do18	3,43	17,88	0,94	4,50	2,09	0,80	3,80	2,32	30,86	17,11
Do19	2,81	21,92	0,71	5,97	2,14	1,54	5,85	2,72	28,15	9,76
Do20	3,52	21,58	1,02	8,77	1,65	2,11	7,53	2,67	24,75	13,38

Tabela 5 - Continuação.

Acesso	$\alpha$ -pineno	$\beta$ -pineno	mirreno	limoneno	<i>trans</i> -cariofileno	germacreno-D	<i>cis</i> - $\beta$ -guaieno	$\delta$ -cadineno	<i>trans</i> -nerolidol	espatulenol
Do21	1,64	3,54	0,49	10,54	2,44	0,53	2,87	1,08	37,81	21,93
Do22	3,68	12,19	1,11	13,98	1,66	1,12	3,43	2,47	25,10	17,64
Do23	2,84	7,56	0,84	7,43	0,84	0,38	2,50	0,97	25,16	30,66
Do24	3,64	18,59	1,04	7,33	0,85	0,53	2,43	1,08	38,05	13,56
Do25	1,59	12,50	0,97	18,08	1,08	0,63	2,16	1,33	27,75	17,00
Do26	6,88	13,65	2,79	25,93	0,99	0,91	6,60	1,55	20,61	13,30
Do27	3,90	10,11	1,06	4,46	0,57	0,27	1,28	1,03	49,80	16,18
Do28	0,43	1,35	0,40	9,72	3,84	2,15	7,95	3,92	22,21	19,60
Do29	4,03	5,77	0,91	5,28	2,50	1,70	5,11	1,81	24,74	28,33
Do30	2,08	9,26	0,46	4,02	1,37	1,30	3,44	1,92	37,99	20,21
De01	0,93	5,49	0,97	12,28	4,76	5,18	6,08	2,76	34,67	9,01
De02	3,42	4,03	0,93	11,75	4,92	5,52	4,74	3,91	44,12	4,88
De03	3,92	2,95	1,18	7,67	2,63	2,35	2,47	0,04	53,83	7,06
De04	4,10	2,40	1,06	6,40	1,89	2,82	3,49	2,59	55,58	7,00
De05	2,94	1,94	0,90	6,35	1,73	3,41	3,51	0,04	55,48	7,62
De06	1,57	1,17	0,59	4,42	7,24	5,65	4,05	3,27	46,43	6,64
De07	1,16	1,06	0,42	2,16	4,43	2,63	2,65	2,95	59,87	4,26
De08	3,33	2,32	1,11	6,21	3,06	2,15	2,72	2,79	40,88	7,10
De09	2,07	3,72	1,42	18,43	2,30	5,07	5,74	3,23	21,41	16,31
De10	5,58	3,17	1,85	13,86	1,68	2,00	2,28	1,48	46,51	8,48
De11	4,15	3,55	1,16	8,66	2,07	3,96	3,49	2,36	48,10	8,77
De12	5,35	2,18	1,83	13,00	1,41	1,77	1,82	1,25	49,41	8,26
De13	1,48	0,73	0,43	3,91	3,80	2,20	2,47	2,09	60,92	6,60
De14	3,51	3,09	1,23	12,25	3,63	2,00	2,30	2,70	44,07	9,96
De15	4,94	7,19	1,21	6,41	2,57	4,03	3,87	2,55	45,94	9,42
De16	3,89	5,63	1,09	5,25	1,50	2,28	2,48	1,51	42,95	10,75

Tabela 5 - Continuação.

Acesso	$\alpha$ -pineno	$\beta$ -pineno	mirreno	limoneno	<i>trans</i> -cariofileno	germacreno-D	<i>cis</i> - $\beta$ -guaieno	$\delta$ -cadineno	<i>trans</i> -nerolidol	espatulenol
De17	3,02	6,93	0,96	10,09	2,32	5,04	8,96	4,94	29,21	10,24
De18	2,52	14,49	1,24	16,07	2,14	3,12	2,90	2,58	31,12	7,81
De19	1,75	4,32	1,88	25,21	3,01	3,66	6,94	4,11	21,91	8,91
De20	2,11	9,10	1,65	11,65	4,22	8,32	5,75	3,12	29,90	9,21
De21	4,25	4,92	1,41	13,59	3,47	7,09	7,37	2,76	31,13	7,32
De22	3,43	7,29	1,18	8,18	3,81	9,83	8,35	2,75	34,73	8,08
De23	1,49	7,53	0,93	4,98	4,39	7,61	7,49	2,30	40,37	7,81
De24	3,53	6,77	1,83	20,53	3,41	7,46	4,80	2,82	30,91	6,97
De25	4,32	10,21	1,66	14,51	2,69	4,46	4,27	2,57	30,27	10,53
De26	6,56	7,22	1,47	10,18	5,37	8,19	6,93	3,37	22,58	10,74
De27	8,15	10,61	2,54	15,57	2,20	3,13	2,66	2,25	20,69	11,85
De28	3,12	5,14	0,83	8,66	2,51	2,58	3,94	2,06	36,68	12,14
De29	1,69	7,88	0,62	4,10	7,01	4,45	8,51	2,21	23,69	17,46
De30	5,51	5,92	2,11	17,72	2,55	4,13	3,65	3,50	25,82	11,16
It01	7,05	16,55	2,36	21,31	1,69	2,13	4,28	2,50	12,34	15,82
It02	6,09	18,26	2,48	22,20	1,41	1,81	3,87	2,46	12,70	16,10
It03	4,32	14,62	1,68	6,76	0,28	0,35	0,91	0,82	50,35	8,06
It04	3,60	15,24	1,51	12,95	1,29	0,63	1,76	0,76	34,53	13,42
It05	4,44	25,37	1,40	9,08	2,09	1,73	3,70	1,88	32,26	7,75
It06	7,37	12,97	3,24	7,78	0,73	0,47	1,00	1,76	45,10	7,86
It07	4,02	8,39	1,87	7,42	0,77	0,80	1,47	1,09	54,88	7,43
It08	3,51	8,92	1,03	9,38	0,87	0,27	1,32	0,76	42,67	14,39
It09	1,43	7,17	0,40	9,77	0,75	0,90	1,79	1,00	29,90	25,95
It10	1,87	4,69	1,25	21,34	0,82	1,15	2,64	2,31	31,43	12,25
It11	1,58	4,49	0,04	4,98	0,42	0,04	0,04	0,58	2,89	46,66

Tabela 5 - Continuação.

Acesso	$\alpha$ -pineno	$\beta$ -pineno	mirreno	limoneno	<i>trans</i> -cariofileno	germacreno-D	<i>cis</i> - $\beta$ -guaieno	$\delta$ -cadineno	<i>trans</i> -nerolidol	espatulenol
It12	0,56	0,86	0,04	2,33	0,40	0,42	0,43	0,59	5,74	51,50
It13	5,13	12,65	0,35	8,40	0,73	0,04	0,04	0,04	3,74	41,74
It14	3,43	10,14	0,04	9,11	0,79	0,82	1,58	1,02	5,97	41,82
It15	4,98	13,01	1,31	13,47	1,18	1,63	3,96	1,93	26,09	16,59
It16	1,32	11,06	0,04	8,56	1,53	0,59	1,86	1,57	11,83	38,74
It17	5,04	10,92	1,92	23,52	1,00	1,02	2,14	2,11	18,94	19,77
It18	4,13	21,32	1,88	7,59	0,86	0,57	0,93	1,66	40,56	9,45
It19	4,86	13,67	1,56	5,17	3,14	1,89	5,07	2,97	34,34	11,68
It20	4,09	26,08	1,52	14,08	0,04	0,38	1,61	1,04	21,78	15,15
It21	1,50	7,29	0,57	7,86	5,31	2,41	4,33	2,53	31,66	18,78
It22	5,73	12,07	1,84	17,58	1,21	0,31	1,18	0,68	20,34	22,62
It23	5,64	14,26	1,69	8,78	0,04	0,04	0,37	0,39	24,25	28,59
It24	6,45	15,90	0,42	9,53	2,03	0,69	1,12	1,09	2,65	29,90
It25	4,61	7,62	1,85	16,18	1,34	0,46	2,05	0,80	29,49	19,33
It26	4,57	27,87	1,60	8,75	0,87	0,97	2,24	1,63	19,41	15,92
It27	0,83	5,10	0,55	11,24	0,97	0,31	0,70	0,88	39,75	19,63
It28	3,58	11,54	1,19	10,63	1,52	0,50	2,09	0,45	23,54	24,47
It29	7,75	17,48	2,69	9,59	2,25	0,41	2,74	2,18	3,37	24,30
It30	5,18	10,44	0,58	12,75	0,43	0,04	0,04	0,04	2,92	43,92
It31	2,24	6,86	0,35	7,93	0,04	0,04	0,04	0,37	8,08	47,16
It32	3,32	18,70	0,64	7,45	0,81	0,63	1,76	1,03	2,28	35,38

\* Bo (Botucatu), Do (Dourados), De (Delfinópolis) e It (Itahum).

## 7.2. Discussão

A análise de Componentes Principais (ACP) aplicada à composição química do óleo essencial para os compostos mais abundantes em comum nas quatro regiões de coleta dos acessos de *Baccharis dracunculifolia*, em três grupos: A: formados por acessos das quatro localidades (Botucatu/SP, Dourados/MS, Delfinópolis/MG e Itahum/MS); B: acessos das populações de Dourados/MS e Itahum/MS; e C: formado por um único acesso da população de Botucatu/MG (acesso 30).

Lyra *et al.* (2008), estudando a espécie *Lychnophora ericoides* encontrou dois grupos de óleos essenciais em relação ao odor das amostras, o primeiro identificado pela presença de  $\alpha$ -bisabolol e *o*-cimeno e o segundo grupo não apresentou odor sendo composto por óxido de cariofileno e o *D*-elemeno. Em todas as populações estudadas co-existiram os dois tipos de óleos essenciais, entretanto as amostras se diferenciavam quimicamente. De acordo com os resultados encontrados por Haber (2008), pode ser constatada a presença de dois grupos químicos na espécie *Lychnophora pinaster*, o primeiro tendo como componentes majoritários o *trans*-cinamato de metila e *trans*-cariofileno, e em outra população os componentes majoritários cedr-8-(15)-en-9-alfa-ol e *trans*-cinamato de metila.

Os compostos voláteis dos óleos essenciais da *B. dracunculifolia* podem ser empregados na quimiotaxonomia da espécie. De acordo com Vieira *et al.*, (2001) os metabólitos secundários podem ser utilizados com eficiência na taxonomia das plantas, podendo também ser empregados em estudos evolutivos. Entretanto é necessário observar vários fatores, como o estágio de desenvolvimento dos órgãos (ontogenia foliar, floral e do fruto), condições ambientais, localização geográfica e fatores genéticos. Esses fatores, em conjunto ou não, podem influenciar a composição química dos óleos essenciais (Vieira *et al.*, 2001).

Embora seja determinada geneticamente, sendo em geral específica para um determinado órgão ou estágio de desenvolvimento, a composição química dos óleos essenciais pode variar significativamente em função de fatores ambientais (Bylité *et al.*, 2000; Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Fatores como fertilidade do solo, fotoperíodo, umidade, temperatura, precipitação, ventos fortes, altitude, solo, época de coleta, idade da planta, eventos fenológicos, acúmulo de nitrogênio foliar, injúria física e outras formas de estresse e altitude exercem grande influência sobre as plantas medicinais e a síntese dos metabólitos secundários (Lima *et al.*, 2003; Staudt *et*

*al.*, 2001; Taiz e Zeiger, 2006). Ainda, podem desencadear alterações no metabolismo o reconhecimento de patógeno, herbivoria e sinalização planta a planta (Degerhardt *et al.*, 2003; Rasmann *et al.*, 2005). O óleo essencial coletado do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal pode variar expressivamente (Oliveira, 1998). Além das alterações promovidas por fatores extrínsecos à existência de quimiotipos ou raças químicas, é muito comum em plantas com óleos essenciais (Russel e Southwell, 2003; Thompson *et al.*, 2003).

Na Análise de Componentes Principais (ACP) o acesso 30 na população de Botucatu, acesso 29 na população de Delfinópolis e o acesso 16 na população de Itahum se diferenciaram quimicamente dos outros indivíduos nas respectivas populações. Na mesma avaliação, quando consideradas as quatro populações o acesso 30 da população de Botucatu se destacou como quimicamente diferente.

### 7.3. Caracterização molecular

**Tabela 6** – Seqüências dos pares de *primers* que amplificaram *locus* microsatélites, com suas respectivas amplitudes alélicas, número de alelos, temperatura de anelamento, quantidade de cloreto de magnésio e dos *primers*.

<i>Locus</i> de SSR	Amplitude alélica (pb)	A*	TA (°C)	MgCl <sub>2</sub> (50mM.mg)	<i>Primer</i> (10µg/µL)
Bdr4	160 – 168	5	65	0,45	0,6
Bdr6	214 – 240	11	65	0,40	0,6
Bdr7	198 – 218	11	60	0,45	0,6
Bdr8	218 – 230	7	65	0,45	0,6
Bdr10	210 – 240	14	60	0,45	0,6

A\* - número de alelos; Ta - temperatura de anelamento.

Todos os *locus* estudados apresentaram amplitude alélica de tamanhos diferentes. O *locus* Bdr4 apresentou alelos entre 160-168 pb, o *locus* Bdr7 198-218 pb, o *locus* Bdr10 210-240 pb, o *locus* Bdr6 214-240 pb e o *locus* Bdr8 218-230.

Com os cinco *locus* polimórficos de microsatélites utilizados foi possível observar 48 alelos nas quatro populações estudadas. O *locus* Bdr10 foi o mais polimórfico com 14 alelos seguidos pelos *locus* Bdr6 e Bdr7 ambos com 11 alelos,

os *locus* Bdr4 e Bdr7 apresentaram menor polimorfismo com 5 e 7 alelos respectivamente.

Os *locus* apresentaram-se multialélicos, o número de alelos foi alto para os *locus* Bdr10, Bdr6 e Bdr7 com 14, 11 e 11 alelos respectivamente. Entretanto os *locus* Bdr4 com 5 alelos e Bdr8 com 7 alelos apresentaram menores diversidades alélicas.

### 7.3.1. Diversidade intrapopulacional

Os valores de polimorfismo dos *locus* analisados são descritos na Tabela 7. A heterozigosidade média observada foi obtida pela soma dos valores de cada *locus* dividindo-se pelo número total de *locus* estudados. Os valores de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) nas populações variaram de 0,066 na população Delfinópolis (MG) a 0,708 na população Dourados (MS), sendo que em média as populações têm valores similares de  $H_o$ . Os marcadores em geral não apresentaram elevado grau de heterozigosidade média observada, com valores inferiores a 70%. O marcador é considerado altamente polimórfico quando apresenta heterozigosidade maior que 70%. Apenas o marcador Bdr8 na população Dourados apresentou heterozigosidade observada maior que 70%. Para heterozigosidade média esperada, na maioria dos *locus* estudados, observou-se uma variação de 0,128 para a população Delfinópolis a 0,840 na população Itahum (MS), com valores intermediários variáveis para as demais populações. A qualidade dos marcadores foi confirmada pelo conteúdo de informação polimórfica, sendo verificados valores superiores a 50% em mais de 70% dos *locus* analisados. O marcador Bdr6 apresentou todos os seus valores de heterozigosidades baixos.

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), descrito por Botstein *et al.* (1980), é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos (segregação, identificação de populações e controle de paternidade). Segundo Mommens *et al.* (1998), um bom microssatélite é aquele que apresenta altos valores de PIC. De acordo com a classificação de Botstein *et al.* (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50, mediamente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos. Os valores de PIC observados neste estudo foram satisfatórios para os *locus* Bdr7, Bdr8 e Bdr10, indicando que eles podem ser utilizados em testes de verificação de parentesco para a espécie *B. dracunculifolia*. O mesmo não pode ser concluído para o

microsatélite Bdr4 e Bdr6, cujos resultados não foram satisfatórios, obtendo-se valores menores que 50%. Entretanto para as populações Itahum e Delfinópolis o valor do PIC para o *locus* Bdr4 foi medianamente informativo.

Em todas as populações observou-se o desvio em relação ao equilíbrio, com excesso de homozigotos em todos os casos, com exceção do *locus* Bdr6 na população Dourados (Tabela 7). Por se tratar de uma espécie dióica, não ocorre autofecundação. Portanto, o desvio observado pode ser devido a um ou mais dos seguintes fatores: endogamia (cruzamento entre indivíduos aparentados) ou amostragem insuficiente, e/ou desequilíbrio entre plantas com flores masculinas e femininas.

**Tabela 7** – Heterozigosidades e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para todas as populações por *locus*.

	<i>Locus</i>	Bdr4	Bdr6	Bdr7	Bdr8	Bdr10	Média
<b>Botucatu</b>	<b>H<sub>E</sub></b>	0,556	0,350	0,785	0,670	0,801	0,632
	<b>H<sub>O</sub></b>	0,333	0,333	0,250	0,640	0,214	0,354
	<b>F<sub>IS</sub></b>	0,406*	0,049*	0,686*	0,046*	0,736*	0,445*
	<b>PIC</b>	0,466	0,324	0,740	0,594	0,757	-
<b>Dourados</b>	<b>H<sub>E</sub></b>	0,546	0,326	0,812	0,716	0,884	0,657
	<b>H<sub>O</sub></b>	0,416	0,333	0,333	0,708	0,413	0,441
	<b>F<sub>IS</sub></b>	0,242*	-0,021	0,594*	0,011*	0,537*	0,333*
	<b>PIC</b>	0,494	0,305	0,772	0,648	0,856	-
<b>Itahum</b>	<b>H<sub>E</sub></b>	0,700	0,248	0,840	0,592	0,764	0,629
	<b>H<sub>O</sub></b>	0,520	0,100	0,400	0,535	0,360	0,383
	<b>F<sub>IS</sub></b>	0,262*	0,602*	0,529*	0,098*	0,534*	0,396*
	<b>PIC</b>	0,628	0,237	0,800	0,521	0,725	-
<b>Delfinópolis</b>	<b>H<sub>E</sub></b>	0,628	0,128	0,784	0,800	0,844	0,637
	<b>H<sub>O</sub></b>	0,478	0,066	0,120	0,652	0,464	0,356
	<b>F<sub>IS</sub></b>	0,244*	0,484*	0,850*	0,188*	0,455*	0,446*
	<b>PIC</b>	0,534	0,121	0,736	0,747	0,807	-

\* Significativos em relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A presença de alelos privados foi obtida pelo programa GDA (Lewis e Zaykin, 2000). O estudo do número de alelos privados indicou a sua existência nas quatro populações estudadas, sendo observados dois alelos na população Botucatu, três na Dourados, quatro na Delfinópolis e cinco na Itahum (Tabela 8). Os alelos com maior frequência foram encontrados na população Itahum, Bdr4 alelo 168 (40%), Delfinópolis Bdr8 alelo 218 (21%), Dourados Bdr10 alelo 212 (18%) e Delfinópolis Bdr7 alelo 202 (16%), a alta frequência desses alelos privados nessas populações as diferenciam das demais (Tabela 8).



**Tabela 8** – Frequência de alelos privados nas populações de *B. dracunculifolia*.

<i>Locus</i>	<i>Alelo</i>	<i>Frequência</i>	<i>População</i>
Bdr4	168	0,400000	Itahum
Bdr6	224	0,016667	Itahum
Bdr6	216	0,050000	Itahum
Bdr6	226	0,016667	Dourados
Bdr6	214	0,016667	Botucatu
Bdr6	238	0,016667	Botucatu
Bdr7	202	0,160000	Delfinópolis
Bdr7	218	0,020000	Itahum
Bdr8	218	0,217391	Delfinópolis
Bdr8	230	0,021739	Delfinópolis
Bdr10	210	0,035714	Delfinópolis
Bdr10	216	0,020000	Itahum
Bdr10	240	0,034483	Dourados
Bdr10	212	0,189655	Dourados

### 7.3.2. Estrutura genética

Foi observado nos índices de Diversidade de Nei (Tabela 9) que a diversidade total foi relativamente elevada ( $H_T = 0,663$ ), indicando haver variabilidade nas populações estudadas. A maior parte da diversidade estava dentro das populações ( $H_S = 0,644$ ), sendo que a diversidade presente entre as populações ( $D_{ST} = 0,019$ ) foi pequena, indicando não haver estruturação entre as populações. A diferença entre os indivíduos presentes nas populações foi baixa ( $G_{ST} = 0,028$ ).

**Tabela 9** – Índices de fixação para as populações de *B. dracunculifolia* (Itahum, Dourados, Delfinópolis e Botucatu).

<i>Locus</i>	$H_O$	$H_S$	$H_T$	$D_{ST}$	$G_{ST}$	$F_{IS}$
Bdr4	0,437	0,612	0,622	0,010	0,016	0,286
Bdr6	0,208	0,264	0,268	0,003	0,013	0,212
Bdr7	0,276	0,816	0,850	0,034	0,040	0,662
Bdr8	0,634	0,696	0,718	0,022	0,031	0,089
Bdr10	0,363	0,833	0,856	0,024	0,028	0,564
<b>Média</b>	<b>0,384</b>	<b>0,644</b>	<b>0,663</b>	<b>0,019</b>	<b>0,028</b>	<b>0,404</b>

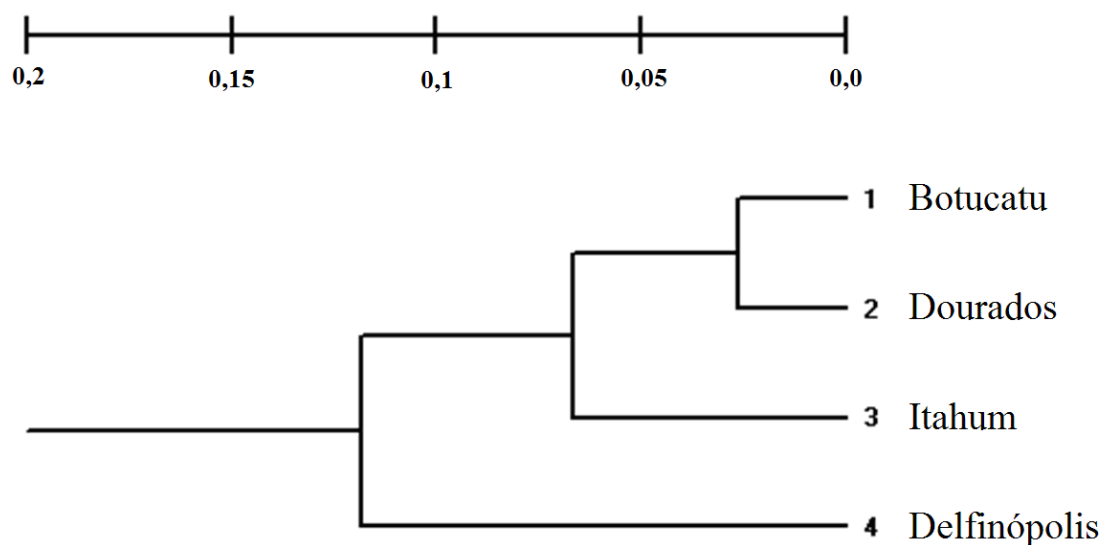
$H_O$  é heterozigosidade observada,  $H_S$  é diversidade genética intrapopulacional,  $H_T$  é diversidade genética total,  $D_{ST}$  é diversidade interpopulacional,  $G_{ST}$  é proporção da diversidade total interpopulacional e  $F_{IS}$  é endogamia.

As matrizes de distâncias genéticas de Nei (1978) entre os pares de populações locais (Tabela 10) revelaram uma distância, variando de 0,0598 a 0,1622.

As análises de divergência foram baseadas nas distâncias genéticas de Nei. Essa matriz foi utilizada como base para a construção de um dendrograma através do método UPGMA, que sugere a existência de um *cluster* onde a menor divergência foi vista entre as populações de Dourados, Botucatu (0,03) e a população mais divergente foi Delfinópolis que se agrupou com as demais a (0,12) de distancia. Portanto evidenciou-se uma falta de estruturação genética correlacionada no espaço geográfico.

**Tabela 10** - Distâncias genéticas de Nei (1972) calculadas entre as populações e distâncias geográficas.

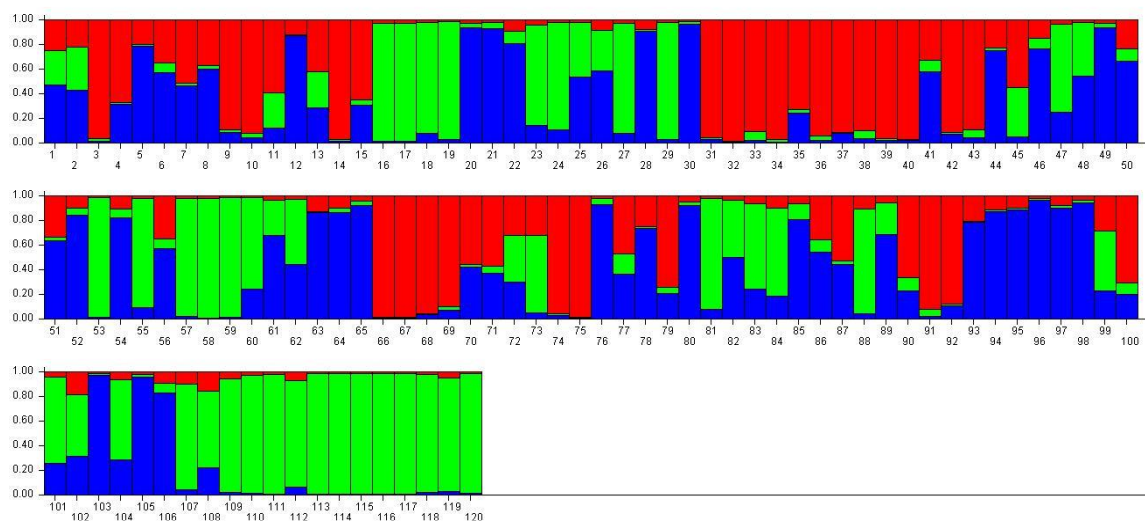
<i>Populações</i>	<i>Botucatu</i>	<i>Dourados</i>	<i>Itahum</i>	<i>Delfinópolis</i>
<b>Botucatu</b>	0,0000			
<b>Dourados</b>	0,0598 (686 km)	0,0000		
<b>Itahum</b>	0,1070 (696 km)	0,0919 (28 km)	0,0000	
<b>Delfinópolis</b>	0,1340 (329 km)	0,1622 (868 km)	0,1600 (879 km)	0,0000



**Figura 19** - Padrão de divergência genética entre as populações de *B. dracunculifolia* definido pelo agrupamento UPGMA, a partir das distâncias genéticas de Nei (1972).

O estimador de Evanno *et al.*; 2005 (Figura 20) foi usado para indicar o valor de K que melhor acomoda a diversidade alélica observada. Não são populações bem delimitadas geneticamente, não há estruturação o que corrobora o baixo valor de  $\underline{D}_{ST}$  (0,019). Alguns indivíduos da população Delfinópolis (107 a 120)

formaram um *cluster* bem homogêneo com mais de 95% de compartilhamento dos alelos visualizados com os marcadores SSRs utilizados.



1-30 Botucatu, 31-60 Dourados; 61-90 Itahum e 91-120 Delfinópolis.

**Figura 20** - Análise de cluster utilizando genótipos multilocos (Evanno *et al.*, 2005), admitindo *admixture model*, contendo três populações ( $k=3$ ), demonstradas pelas respectivas cores. Os acessos são representados por linhas verticais coloridas. A mesma cor em indivíduos diferentes indica que eles pertencem ao mesmo cluster. As cores diferentes em um mesmo indivíduo indicam a porcentagem do genoma que foi herdado de cada cluster.  $Q$  = coeficiente de participação do acesso em cada grupo.

#### 7.4. Discussão

A qualidade dos marcadores para *B. dracunculifolia* foi confirmada pelo conteúdo de informação polimórfica, sendo verificados valores superiores a 50% em mais de 75% dos *loci* analisados. Para heterozigosidade média esperada, na maioria dos *locus*, observou-se valor inferior a 70%, indicando baixa variabilidade genética dos marcadores analisados.

Os alelos raros são mais suscetíveis à perda por efeito da amostragem, sendo que o número de alelos por *locus* e o número de alelos privados constituem os parâmetros mais indicados para avaliar a perda de diversidade genética (Spencer *et al.*, 2000). Os alelos privados ou exclusivos com maior frequência foram encontrados na população Itahum (40%), Delfinópolis (16 e 21%) e Dourados (18%). A

interferência do homem na variabilidade genética de populações pode ser evidenciada pela diferença entre o número de alelos exclusivos em áreas antropizadas e áreas intactas.

Um considerável número de alelos exclusivos (27) foi encontrado para três populações de *Eugenia uniflora* analisadas por Ronai (2008). Brondani *et al.* (2003) identificaram 29 alelos privados ou exclusivos na população de vereda represada em populações silvestres de *Oryza glumaepatula*, comprovando-se desta forma que esta área sofreu maior interferência humana que a vereda intacta, onde foram identificados 14 alelos.

A fragmentação e a perturbação no ambiente de uma população é uma das principais causas do baixo nível de variabilidade genética e heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e na diminuição do número médio de alelos por *locus* e para altos níveis de endogamia (Murren, 2003).

Estudos realizados por Bariani (2007) indicou baixos níveis de variabilidade genética nas populações de *Gochnatia pulchra* (Asteraceae) no Cerrado e elevada endogamia e estruturação genética moderada entre as populações, indicando baixos níveis de fluxo gênico. Nesse estudo ainda foi possível observar que a degradação e a densidade de indivíduos apresentaram efeito negativo sobre a variabilidade genética das populações. Tais resultados apontam para a importância da degradação do *habitat* da espécie, dificultando o sucesso de interações ecológicas que são importantes para a manutenção da diversidade genética das populações.

O sistema de reprodução da espécie *B. dracunculifolia* é sexuada (alógamia), uma vez que permite rearranjo da diversidade genética gerando potencialmente infinitas combinações (Adams, 1991; Richards, 1997). Este sistema é benéfico por que serve como uma base para os processos evolutivos (Brown, 1990), determinando a capacidade de sobrevivência das espécies de uma geração para outra (Crow e Kimura, 1970). Em geral, as plantas perenes se reproduzem por alogamia (Stebbins, 1974).

A maior parte da diversidade de *B. dracunculifolia* estava dentro das populações, sendo a diversidade presente entre as populações não expressiva, não havendo estruturação entre as populações. A diversidade genética mantida dentro e entre populações é função de eventos históricos e de processos evolutivos recentes. Em espécies alógamas, a maior parcela da variação genética encontra-se dentro de populações (Hamrick, 1989) que pode ser favorecido pela reprodução cruzada. Auler

(2004) chegou a uma conclusão parecida em *B. trimeria*, quando pôde constatar que 96,7% da variabilidade encontravam-se distribuídas dentro das populações e apenas 3,3% entre populações.

Mesmo a *B. dracunculifolia* apresentando reprodução por alogamia foi observado em todas as populações o desvio em direção à endogamia ( $F_{IS}$ ). De acordo com Hartl e Clark (1989) a endogamia é o acasalamento entre indivíduos que são relacionados por descendência, tendo como primeiro efeito uma mudança nas frequências genotípicas de Hardy-Weinberg devido a um aumento na frequência de genótipos homozigóticos à custa de frequência de genótipos heterozigóticos. A endogamia é causada pela diminuição da frequência dos heterozigotos, nos vários *locus* e pela carga genética da população (Hamrick, 1989), provoca redução na atuação reprodutiva da espécie, acarretando modificações na fertilidade, viabilidade das sementes, vigor, adaptação e produtividade de maneira geral (Wickneswari *et al.*, 2000). A redução da população pode propiciar o aumento da endogamia, que acompanha a fragmentação do habitat de populações de várias espécies causando efeitos deletérios à sobrevivência e vigor das espécies (Eldridge e Griffin, 1983; Lowe *et al.*, 2005).

Uma maior divergência genética entre populações não implica em aumento da distância geográfica (Murty e Arunachalam, 1966). A deriva genética e a seleção em ambientes diferentes podem acarretar maior variação que a distância geográfica (Upadhyay e Murty, 1970). De acordo com as análises baseadas nas distâncias genéticas de Nei (Tabela 10) e do dendrograma através do método UPGMA (Figura 19), para *B. dracunculifolia*, apesar da baixa distancia genética detectada a população de Delfinópolis foi distante das demais populações. Ainda de acordo com o dendrograma não foi encontrada relação entre variabilidade genética e distância geográfica quando todas as populações foram consideradas. Essa constatação foi corroborada pela análise em *bayesiana* demonstrando que não são populações bem delimitadas geneticamente e não há estruturação, afirmação apoiada pelo baixo valor de  $D_{ST}$ . Entretanto foi observada uma diferenciação na população Delfinópolis. A fragmentação do ambiente pode ser uma das causas, pois aumenta a divergência genética entre as populações devido à deriva genética e redução do fluxo gênico (Young *et al.*, 1996).

## 8. CONCLUSÃO

Os acessos de *Baccharis dracunculifolia* foram divididos em três grupos químicos, o grupo um formado por acessos das quatro localidades (Botucatu/SP, Dourados/MS, Delfinópolis/MG e Itahum/MS), possuindo como substância majoritária nos óleos essenciais o *trans*-nerolidol; o grupo dois com acessos das populações de Dourados/MS e Itahum/MS apresentaram o espatulenol e *trans*-nerolidol como substâncias mais abundantes nos óleos essenciais e o grupo três formado por um único acesso da população de Botucatu/MG (acesso 30), apresentando como substâncias majoritárias os monoterpenos,  $\beta$ -pineno, limoneno e  $\alpha$ -pineno.

Os cinco *locus* SSR encontrados foram eficientes para a detecção da variação genética nas quatro populações, confirmando o elevado conteúdo de informação genética destes marcadores.

A maior parte da diversidade genética de *B. dracunculifolia* foi intrapopulacional, sendo a diversidade interpopulacional baixa.

Foi observado em todas as populações o desvio em direção à endogamia ( $F_{IS}$ ).

As populações apresentam baixa distância genética, isto é, são bem semelhantes. A população de Delfinópolis foi a mais divergente.

Verificou-se a falta de estruturação entre a distância genética e geográfica. A variabilidade genética não está estruturada no espaço geográfico.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através deste trabalho foi possível observar informações inéditas a respeito da diversidade genética e composição química do óleo essencial da *B. dracunculifolia* no bioma Cerrado, abrangendo distâncias geográficas que variaram entre 28 e 879 km. Esses dados são importantes para a compreensão da distribuição e dinâmica da diversidade genética da espécie, amplamente distribuída no território nacional, assim como auxiliar em projetos e ações para conservação genética *in situ* e *ex situ* desta espécie.

Neste estudo foi possível verificar uma baixa estrutura genética nas populações de *B. dracunculifolia* e baixa diversidade, causadas provavelmente por baixo número de indivíduos na população e cruzamento entre indivíduos aparentados.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M.J.; BESSA, A.L.; BALLARIN, B.; ARAGÓN, O.; GONZALES, E.; BERMEJO, P. Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.338–344, 2006.

ADAMS, J. Reproduction. In: GAMLIN, L.; VINES, G. **The evolution of life**. New York: Oxford University Press, cap.27, p.235-248, 1991.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography – Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 1995, 469 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**, v.15, n.3, p.215-220, 2005.

AGUIAR, L.M.S.; MACHADO, R. B.; MARINHO-FILHO, J. A Diversidade biológica do Cerrado. In: AGUIAR, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. **Cerrado: ecologia e caracterização**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 1, p. 17-40, 2004.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.909-915, 2005.



ALVARENGA, S.A.V.; GASTMANS, J.P.; RODRIGUES, G.V.; MORENO, P.R.H.; EMERENCIANO, V.P. A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies – diterpenes in Lamiaceae. **Phytochemistry** v.56, p.583–595, 2001.

ARDUIN, M.; KRAUS, J. E. Anatomia de galhas de ambrosia em folhas de *Baccharis concinna* e *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Botânica**. v.24, n.1, p.63-72, 2001.

AULER, N.M.F. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Baccharis trimer* (Less) DC. (Carqueja) no Sul do Brasil**. 2004, 108p. Tese (Doutorado em Agronomia: Produção Vegetal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2004.

AZEVEDO, S.K.S. DE; SILVA, I.M. Plantas medicinais e de uso religioso comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.1, p.185-194, 2006.

BALANDRIN, M.J.; KLOCKE, J.A.. Medicinal, aromatic and industrial materials from plants. In Y.P.S. BAJAJ (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Medicinal and Aromatic Plant*, vol.4, p.1-36, 1988.

BALDONI, L.; TOSTI, N; RICCIOLINI, C.; BELAJ, A.; ARCIONI, S.; PANNELLI, G.; GERMANA, M.A.; MULAS, M.; PORCEDDU, A. Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. **Annals of Botany**, v.98, p.935-942, 2006.

BALDWIN, B.G.; WESSA, B.L.; PANERO, J.L. Nuclear rDNA evidence for major lineages of Hellenioid Heliantheae (Compositae). **Systematic Botany**, v.27, p.161–198, 2002.

BARIANI, J.M. **Análise da variabilidade genética em populações de *Gochnatia pulchra* (Asteraceae)**. 2007, 60p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia

Molecular: Genética Animal e Evolução) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas – SP, 2007.

BARROSO, G.M. Compositae-subtribo Baccharidinae Hoffmann. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguésia**, v.28, p.1-273, 1976.

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

BOHLMANN, F. Chemistry of the Heliantheae (Compositae). **Plant Systematics and Evolution**. (Suppl. 4), p.67–75, 1990.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, n.3, p.314-331, 1980.

BREMER, K. **Asteraceae: cladistics and classification**. Timber Press, Portland, Oregon, USA. 1994, 752 pp.

BRITO, M.C.W. **Cerrado: bases para conservação e uso sustentável das áreas de Cerrado do Estado de São Paulo**. Secretaria de Estado do Meio Ambiente, Série PROBIO, São Paulo. 1997.

BRONDANI, R.P.V.; RANGEL, P.H.N.; ZUCCHI, M.I.; MAGALHÃES, M.R.; BORBA, T.C.O.; VENCOSKY, R.; BRONDAN, C. **Estrutura genética de populações silvestres de *Oryza glumaepatula* em três biomas brasileiros utilizando marcadores microssatélites**. Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2003. 27 p.

BROWN, A.H.D. Genetic characterization of plant mating systems. In: BROWN, A.H.D.; CLEGG, M.T.; KAHLER, A.L.; WEIR, B.S. (Ed.) **Plant population genetics, breeding and genetic resources**. Sunderland: Sinauer Associates, p.145-162, 1990.

BROWN, A.H.D. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, v.52, p.145-57, 1978.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M. Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae). Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.1, p.41-48, 2004.

BYLAITÉ, E.; VENSKUTONIS, R.; ROOZEN, J.; POSTHUMMUS, M. A. Composition of essential oil of costmary [*Balsamina major* (L.) Desf.] at different growth phases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2409-2414, 2000.

CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. 2006, 307p.

CARTHEW, S. M. Population genetic structure of *Banksia spinulosa*. **Heredity**, Oxford, v.70, n.6, p.566-573, 1993.

CASSEL, E.; FRIZZO, C. D.; VANDERLINDE, R.; ATTI-SERAFINI, L.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Extraction of *Baccharis* oil by supercritical CO<sub>2</sub>. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.39, p.4803-4805, 2000.

CASTRO, H. G.; OLIVEIRA, L. O.; BARBOSA, L. C. A.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R.; NASCIMENTO, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de Mentrasto. **Química Nova**, v.27, p.55-57, 2004.

CAVALLARI, M.M. **Variabilidade genética e química entre e dentro de populações de *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) no Estado de São Paulo.** 2008, 128p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Genética) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008.

CAVERS, S; DEGEN, B; CARON, H; HARDY, O; LEMES, M.R.; MARGIS, R.; SALGUEIRO, F.; LOWE, A.J. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. **Heredity**, v.95, p.281–289. 2005.

CHAVES, L.J. Melhoramento e conservação de espécies frutíferas do Cerrado. In: **Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, Goiânia, 2001.

CIFUENTE, D.A.; SIMIRGIOTIS, M.J.; FAVIER, L.S.; ROTELLI, A.E.; PELZER, L.E. Antiinflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sophiifolia* in mice. **Phytotherapy Research**, v.15, p.529–531, 2001.

COLLEVATTI, R.G.; BRONDANI, R.P.V.; GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species of *Caryocar brasiliense*. **Heredity** v.83, p.748-756, 1999.

COLLEVATTI, R.G.; GRATTAPAGLIA, D.; HAY, J.D. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v.10, n.2, p.349-356, 2001.

COUTINHO, L. M. Fire in the ecology of the Brazilian Cerrado. In: (Ed. J. G. Goldammer) **Fire in the Tropical Biota: Ecosystem Processes and Global Challenges**, p.82-105, 1990.

CROW, J.F.; KIMURA, M. **An Introduction to Population Genetics Theory.** New York: Harper & Row, 1970, 591p.

DIAS, B.F.S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas: s.n., 1996.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA fresh tissue, **Focus**, v.12, p.13-15, 1990.

EITEN, G. The cerrado vegetation of Brazil. **Botanical Review.**, v. 38, p. 201-341, 1972.

ESPÍRITO-SANTO, M.M.; FERNANDES, G.W. Abundance of *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae) galls on the dioecious shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Environmental Entomology**, v.27, p.870-876, 1998.

ESPÍRITO-SANTO. M. M.; MADEIRA, B. G.; NEVES, F. S.; FARIA, M. L.; FAGUNDES, M.; FERNANDES, G. W. Sexual differences in reproductive phenology and their consequences for the demography of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), a dioecious tropical shrub. **Annals of Botany**, v.91, p.13-19, 2003.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, Vancouver, n.14, p.2611-2620, 2005.

FABIANE, K.C.; FERRONATTO, R; DOS SANTOS, A.C.; ONOFRE, S.D. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.197-203, 2008.

FAINI, F.A.; CASTILLO, M.; TORRES, M.R. Flavonoids of *Baccharis incarum*. **Journal of Natural Products**, v.45, n.4, p.501–502, 1982.

FELFILI, J. M.; RIBEIRO, J.F.; BORGES FILHO, H.C.; VALE, A. T. Potencial econômico da biodiversidade do Cerrado: estágio atual e possibilidades de manejo

sustentável dos recursos da flora. In: AGUIRA, L. M. S.; CAMARGO, A. J. A. (Ed.) **Cerrado: ecologia e caracterização**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 6, p. 117-217, 2004.

FELFILI, J.M.; SILVA JUNIOR, M.C. Diversidade alfa e beta no Cerrado sensu strictu, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais e Bahia. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J. C.; FELFILI, J. M. (Ed.). **Cerrado: ecologia, diversidade e conservação**. Brasília: MMA, cap. 7, p.143-178, 2005.

FELFILI, J.M.; SILVA JUNIRO, M.C.; REZENDE, A.V.; HARIDANSAN, M.; FILGUEIRAS, T.S.; MENDONÇA, R.C.; WALTER, B.M.T.; NOGUEIRA, P.E.O **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**, p.157-173, 2001.

FERRACINI, V. L.; PARAIBA, L. C.; LEITÃO FILHO, H. F.; SILVA, A. G.; NASCIMENTO, L. R.; MARSAIOLI, A. G. Essential Oils of Seven Brazilian *Baccharis* Species. **Journal of Essential Oil Research**,v. 7, p. 355-367, 1995.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220p.

FERRER, M.M.; GOOD-AVILA, S.V. Macrophylogenetic analyses of the gain and loss of self-incompatibility in the Asteraceae. **New Phytologist**, v.173, p.401–414, 2007.

FRANCO, A.C. Biodiversidade de forma e função: implicações ecofisiológicas das estratégias de utilização de água e luz em plantas lenhosas do Cerrado. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J. M. (Ed.). **Cerrado: ecologia, diversidade e conservação**. Brasília: MMA, cap.10, p.181-196, 2005.

FUKUDA, M.; OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.54, n.10, p.465-8, 2006.

FUNARI, C. S. DE; FERRO, V. DE O.; MATHOR, M. B. Analysis of própolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 206-212, 2007.

FUNK, V.A., BAYER, R.J., KEELEY, S., CHAN, R., WATSON, L., GEMEINHOLZER, B., SCHILLING, E., PANERO, J.L., BALDWIN, B.G., GARCIA JACAS, N., SUSANNA, A.; JANSEN, R.K. Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biologiske Skrifter**, v.55, p.343–374, 2005.

GENE, R.M., MARÍN, E., ADZET, T. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. **Planta Medica**, v.58, p.565–566, 1992.

GHAZOUL, J.; MCLEISH, M. Reproductive ecology of tropical forest trees in logged and fragmented habitats in Thailand and Costa Rica. **Plant Ecology**, v.153, p.335-345, 2001.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo dos metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GOODMAN, S.J. R<sub>ST</sub> Calc: a collection of computer program for calculating estimates of genetic differentiation of microsatellite and determining their significance. **Molecular Ecology**, v.6, p.881-885, 1997.

GOUDET, J. Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. **Journal of Heredity**, v.86, p.485-486, 1995.

GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers for forest trees: where are we going? In: BORÉM, A.; GIÚDICE, M.P.; SAKIYAMA, N.S. (Ed.). **BIOWORK II: plant breeding in the turn of the millennium**. Viçosa: UFV, p.79-102, 1999.

GUPTA, P.K.; VARSHNEY, R.K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. **Euphytica**, v.113, p.163–185, 2000.

HABER, L.L. **Caracterização da diversidade genética, via marcador microssatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaste* MART.** 2008, 151p. Tese (Doutorado em Agronomia: Horticultura) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 2008.

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

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

HARBORNE, J.B. ; WILLIAMS, C.A. Recent advances in the chemosystematics of the monocotyledons. **Phytochemistry**, v.37, p.3–18, 1994.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics.** Sunderland: Sinauer Associates, 1989, 681 p.

HEDRICK, P.W. **Genetics of populations.** Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1999, 552p.

HENDRY, G.A.F. Fructan and the ecology and evolution of the Compositae. In: Caligari, P.D.S., Hind, D.J.N. (Eds.), **Compositae: Biology & Utilization.** Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994. Royal Botanic Gardens, Kew, v.2, p.121–128, 1996.



HENRIQUES, R.P.B. Influencia da história, solo e fogo na distribuição e dinâmica das fitofisionomias no bioma Cerrado. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Ed.). **Cerrado: ecologia, diversidade e conservação**. Brasília: MMA, cap.3, p.75-92, 2005.

HOMMA, A. K. O. Amazônia: como aproveitar os benefícios da destruição? **Estudos Avançados**, v.19, n.54, 2005.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: EDUFSCar, 2003, 152p.

INFOMETRIX, INC. **Pirouette 3.01**, Woodinville, WA, 2001.

JARVIS, B. B.; MOKHTARI-REJALI, N.; SCHENKEL, E. P.; BARROS, C. S.; MATZENBACHER, N. I. Trichothecene mycotoxins from Brazilian *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v.30, n.3, p.789-797, 1991.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**, 7 ed. São Paulo, Cia Editora Nacional, 1967, 777p.

JORGE, L.A.B.; SARTORI, M.S. Uso do solo e análise temporal da ocorrência de vegetação natural na fazenda experimental Edgardia, em Botucatu-SP. **Revista Árvore**, v.26, n.5, 2002.

JULIO, P.G. DOS SANTOS. **Morfoanatomia e ontogênese de frutos e sementes de espécies de Astereae e Heliantheae (Asteraceae)**. 2008, 94p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Botânica): Morfologia e Diversidade Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008.

KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; MCGRAW, R.A.; SONSTEGARD, T.S.; SMITH, T.P.; LOPEZ-CORRALES, N.L.; BEATTIE, C.W.: A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research**, v.7, p.235-249, 1997.

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

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the brazilian cerrado. **Conservation Biology**, v.19, p.707-713, 2005.

KLOPELL, F.C.; LEMOS, M.; SOUSA, J.P.; COMUNELLO, E.; MAISTRO, E.L.; BASTOS, J.K.; DE ANDRADE, S.F. Nerolidol, um componente de antiulcerogênica do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.62, n.7-8, p.537-42, 2007.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n.6, p.740-742, 2003.

KUTNEY, J. P. Biotechnology and synthetic chemistry Droutes to clinically important compounds. **Pure and Applied Chemistr.**, 71:1025-1032. 1999.

LAGO, J.H.G.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; SOARES, M.G.; BARALDI, P.T.; CORRÊA, A.G.; SOUZA, F.O. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de “campos de altitude” da mata atlântica paulista. **Quim. Nova**, v.31, n.4, p.727-730, 2008.

LEFEBVRE, V.; CHÈVRE, A.M. . Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review. **Agronomie**, v.15, p.3–19, 1995.

LEITÃO, D.P.S.; DA SILVA FILHO, A.A.; POLIZELLO, A.C.M.; BASTOS, J. K.; SPADARO, A.C.C. Comparative evaluation of in-vitro effects of brazilian green própolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 1834-1839, 2004.

LEMOS, M.; DE BARROS, M.P.; SOUSA, J.P.; DA SILVA FILHO, A.A.; BASTOS, J.K.; DE ANDRADE, S.F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green própolis, displays antiulcer activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.59, n.4, p.603-8, 2007.

LEWIS, P.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data (software) 2000. version 1.1. Disponível em: <http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>. Acesso em: 16 jul. 2009.

LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L.; SANTOS, B.H.C. Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.7, p.251-258, 2003.

LIMA, J.E. F.W.; SILVA, E.M. Estimativa da produção hídrica superficial do Cerrado brasileiro. In: SCARIOT, A.; SOUSA-SILVA, J.C.; FELFILI, J.M. (Ed.). **Cerrado: ecologia, diversidade e conservação**. Brasília: MMA, cap. 2, p. 63-72, 2005.

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

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

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis, and application**. Oxford: Blackwell Publishing, 2005, 328p.

LYRA, C.C.G.V.; VIEIRA, R.F.; OLIVEIRA, C.B. A. DE; SANTOS, S.C.; SERAPHIND, J.C.; FERRI, P.H. Intraspecific Variability in the Essential Oil Composition of *Lychnophora ericoides*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, n.5, p.842-848, 2008.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P.; CALDAS, E.; GONÇALVES, D.; SANTOS, N.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**. Conservation International do Brasil, Brasília. 2004.

MALAGARRIGA HERAS, R. D. P. Nomenclator *Baccharidinarum omnium*. **Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle**, v.37, p.129-224, 1976.

MARTINS, K. **Diversidade genética e fluxo gênico via pólen e semente em populações de *Solanum lycocarpum* St.Hil. (Solanaceae) no sudeste de Goiás**. 2005, 141p. Tese (Doutorado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

MARZINEK, J.; DE-PAULA, O.C.; OLIVEIRA, D.M.T. 2008. Cypsela or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.3, p.549-553, 2008.

MASSIGNANI, J.J.; LEMOS, M.; MAISTRO, E.L.; SCHAPHAUSER, H.P.; JORGE, R.F.; SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; DE ANDRADE, S.F. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. **Phytotherapy Research**, v.23, n.10, p.1355-1360, 2009.

MATTOS ALVES, H. Plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v.3, 2001.

MELO, S.F.; SOARES, S.F.; DA COSTA, R.F.; DA SILVA, C.R.; DE OLIVEIRA, M.B.N.; BEZERRA, R.J.A.C.; CALDEIRA DE ARAÚJO, A.; BERNARDO FILHO, M. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v.496, p.33-38, 2001.

MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; SILVA JUNIOR, M.C.; REZENDE, A.V.; FILGUEIRA, T.S.; NOGUEIRA, P.E. Flora vascular do Cerrado. In:

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap.7, p.289-556, 1998.

MENEZES, H. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). In: 18 RAIB. São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo: Instituto Biológico, v.72, p.33-33, 2005.

MILLER, M.P. **TFPGA 1.3: tools for population genetic analyses (software)**. New York, 1997.

MIRANDA, H. S.; BUSTAMANTE, M. M.C.; MIRANDA, A. C. In: (Eds. P. S OLIVEIRA E R. J. MARQUIS. The cerrados os Brazil: **Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna**. Columbia University Press, New York, p.51-68, 2002.

MISSIMA, F.; DA SILVA FILHO, A.A.; NUNES, G.A.; BUENO, P.C.; DE SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; SFORCIN, J.M. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.59, n.3, p.463-8, 2007.

MOMMENS, G.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L.J. Effectiveness of bovine microsatellites in resolving paternity case in American bison, *Bison bison* L. **Animal Genetics**, v.29, p.12-18, 1998.

MONTANARI JUNIOR, I. **Exploração econômica de plantas medicinais da Mata Atlântica**. Pp. 35-54. In: SIMÕES, L. L. e LINO, C.F. (orgs.). **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo, Editora Senac. 2002

MORENO M.A.; TARAZI, R.; FERRAZ, E.M.; GANDARA, F.B.; KAGEYAMA, P.Y. Estrutura genética espacial em populações de *Hymenaea stigonacarpa* Mart. ex Hayne mediante a utilização de marcadores microssatélites cloroplastidiais. **Scientia Forestalis**, v.37, n.84, p.513-523, 2009.

MORGANO, M.A.; QUEIROZ, M.C.N.; FERREIRA, M.M.C. Aplicação da análise exploratória na diferenciação de vegetais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, n.1/2, p.73-79, 1999.

MURREN, C.J. Sapatial and demographic population genetic structure in *Catsetum viridiflavum* across a human-disturbed habitat. **Journal of Evolutionary Biology**, v.16, p.333-342, 2003.

MURTY, B.R.; ARUNACHALAM, V. The nature of divergence in relation to breeding system in some crop plants. **The Indian Journal of Genetics & Plant Breeding**, v.26, n.2, p.188-198, 1966.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-845, 2000.

NAZARENO, A.G. **Estrutura e diversidade genética de populações naturais de *Ficus* spp. (Moraceae) em fragmentos florestais no Estado de São Paulo**. 2009. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Biologia Comparada) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2009.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v.89, n.3, p.583-590, 1978.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v.106, p.283-292, 1972.

NESOM, G.L. Infrageneric taxonomy of North and Central American *Baccharis* (Asteraceae: Astereae). **Phytologia**, v.69, p.40–46, 1990.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. *Aspectos Genéticos e Moleculares da Produção Vegetal*. p. 25 a 38. IN: Simões, et al., **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**, Porto Alegre/Florianópolis: ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC. 1999.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G, ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307, 2006.

OLIVEIRA, P.E. Fenologia e biologia reprodutiva de espécies de Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa – CPAC,. Cap. 4, p.170-192, 1998.

OMS (Organização Mundial de Saúde). **Anuário estatístico**. Organização Mundial de Saúde. Genebra, 1991.

ORTEGA,V.R.; ENGEL, V.L. Conservação da biodiversidade de remanescentes de Mata Atlântica na região de Botucatu, SP. In: congresso nacional sobre essências nativas. **Revista do Instituto Florestal**, v.4, p.839-852, 1992.

PANERO, J.L.; FUNK, V.A. Toward a phylogenetic classification for the Compositae (Asteraceae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v.115, p.909–922, 2002.

PAREJO, I., VILADOMAT, F., BASTIDA, J., ROSAS-ROMERO, A., SAAVEDRA, G., MURCIA, M.A., JIMÉNEZ, A.M., CODINA, C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. **Life Sciences**, v.73, p.1667–1681, 2003.

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 southeast brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.1100-1103, 2004.

PARREIRA, N.A., MAGALHÃES, L.G.; MORAIS, D.R.; CAIXETA, S.C.; DE SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; SILVA1, M.L.A.; NANAYAKKARA, N. P. D.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A.A. Antiprotozoal, schistosomicidal,

and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v.7, n.4, p.993–1001, 2010.

PEIXOTO, P.P.P. **Bases para aproveitamento e gerenciamento de recursos hídricos na região de Dourados - MS**. 2002. 98p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

PEMBERTON, J.M.; SLATE, J.; BANCROFT, D.R.; BARRET, J.A. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. **Molecular Ecology**, v.4, p.249-252, 1995.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, n.2, p.945-959, 2000.

QUEIROGA, C. L.; FUKAI, A. E.; MARSAIOLI, A. Composition of the essential oil of vassoura. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.1, p.105-109, 1990.

RAFALSKI, J. A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S.V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. (Ed.). **Nonmammalian genome analysis: a practical guide**. San Diego: Academic Press. p.75-134, 1996.

RAPOSO, A. **Estrutura genética e fluxo gênico de populações naturais de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) visando o manejo e a conservação da espécie**. 2007, 150p. Tese (Doutorado Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - SP, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

RASMANN, S.; KOLLNER, T. G.; DEGENHARDT, J.; HILTPOLD, I.; TOEPFER, S.; KUHLMANN, U.; GERSHENZON, J.; TURLINGS, T. C. J. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. **Nature**, v 434, p.732-737, 2005.



REZENDE, F.; ALVES, J.; MUNARI, C.; SENEDESE, J.; SOUSA, J.; BASTOS, J.; TAVARES, D.C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, v.634, p.112-118, 2007.

RICHARDS, A.J. **Plant breeding systems**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Chapman & Hall, 1997, 529p.

ROBINSON, I.P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A.C. (Ed.) **Eletroforese de Isoenzimas e Proteínas Afins: Fundamentos e Aplicações em Plantas e Microorganismos**. Viçosa: UFV, p.329-380, 1998.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. DE. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio Grande –Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, p.102-123, 2001.

RONAI, F.R. **Estrutura genética e fluxo gênico em populações naturais de *Eugenia uniflora* L. na região de Ribeirão Preto (SP), utilizando marcadores microssatélites**. 2008, 145p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Genética) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, 2008.

RUSSEL, M. F.; SOUTHWELL, I. A. Monoterpenoid accumulation in 1,8-cineole, terpinolene and terpinen-4-ol chemotypes of *Melaleuca alternifolia* seedlings. **Phytochemistry**, v. 62, p. 683-689. 2003.

SÁNCHEZ, R.A.O.; VALVERDE, R. **Manual de cultivo y conservación de plantas medicinales**. San José, R.A. Ocampo Editora, 2000.

SEAMAN, F.C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **Botanical Review**, v.48, p.123–551, 1982.

SETZER, J. **Atlas climático e ecológico do estado de São Paulo**. São Paulo: Comissão Interestadual da Bacia do Paraná-Uruguai, 1966, 618p.

SILVA, C.M.; KARASAWA, M.G.; VENCOVSKY, R.; VEASEY, E.A. Elevada diversidade genética interpopulacional em *Oryza glumaepatula* Steud. (Poaceae) avaliada com microssatélites. **Biota Neotropica**, v.7, n.2, 2007.

SILVA FILHO, A.A.; BUENO, P.C.P; GREGÓRIO, L.E.; ANDRADE E SILVA, M.L.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K. In vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology** v.56, n.9, p.1195-1199, 2004.

SILVA, J.M.C; BATES, J.M. Biogeographic patterns and conservation in the south american cerrado: a tropical savanna hotspot. **Bioscience**, v.52, p.225-233, 2002.

SIQUEIRA, N.C.S.; SILVA, G.A.A.B.; ALICE, C.B. Análise dos óleos essenciais de algumas plantas aromáticas tradicionais ou nativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 67, p. 118-128, 1986.

SOUSA, J.P.B.; JORGE, R.F.; LEITE, M.F.; FURTADO, N.A.J.C.; BASTOS, J.K.; DA SILVA FILHO, A.A.; QUEIROGA, C.L.; MAGALHÃES, P.M. DE; SOARES, A.E.E.. Seasonal variation of the (E)-nerolidol and other volatile compounds within ten different cultivated populations of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.21, p.308-314, 2009.

SPENCER, C.C.; NEIGEL, J.E. LEBERG, P.L.. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. **Molecular Ecology**, v.9, p.1517-1528, 2000.

SPRING, O. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. **Advances in Botanical Research**, v.31, p.153-174, 2000.

SPRING, O.; BUSCHMANN, H. A. chemosystematic survey of sesquiterpene lactones in the Helianthinae (Compositae). In: Hind, D.J.N., Beentje, H.J. (Eds.), **Compositae: Systematics, Proceedings of the International Compositae Conference**, v.1. Kew Scientist, Kew, p.307–311, 1996.

STAUDT, M.; MANDEL, N.; JOFFRE, R.; RAMBAL, S. Intraspecific variability of monoterpene composition emitted from *Quercus ilex* leaves. **Canadian Journal of Forestry Research**, v. 31, p. 174-180. 2001.

STEBBINS, G.L. **Flowering plants**. Cambridge: Massachusetts, 1974, 398p.

STEVENS, P.F., 2001 onwards. Angiosperm Phylogeny Website. Version 8, June 2007 (and more or less continuously updated since). Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em: 14 de julho de 2009.

STUESSY, T.F., GARVER, D. The defensive role of pappus in heads of Compositae. *In*: Caligari, P.D.S., Hind, D.J.N. (Eds.), **Compositae: Biology & Utilization**. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, Royal Botanic Gardens, Kew, v.2, p.81–91, 1996.

TAKEDA, I.J.M.; FARAGO, P. **Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha: guia de campo**. Ponta Grossa: Serzegráf, 2001, 419 p.

TAPIA, A., RODRIGUEZ, J., THEODULOZ, C., LOPEZ, S., FERESIN, G.E., SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p.155–161, 2004.

THOMPSON, J. D.; CHALCHAT, J. C.; MICHE, A.; LINHART, Y. B.; EHLERS, B. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 859-880, 2003.

TREJO, I.; DIRZO, R. Deforestation of a seasonally dry tropical forest: a national and local analysis in Mexico. **Biological Conservation**, v.94, p.133-142, 2000.

UPADHYAY, M.K.; MURTY, B.R. genetic divergence in relation to geographical distribution in pearl millet. **The Indian Journal of Genetics & Plant breeding**, v.30, n.3, p.704-715, 1970.

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

VELOSO, H.P. (Org). **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro: IBGE/Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, 1992, 93p.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I. M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n.1, p.85-94, 2005.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, v.9, p.323-343, 2000.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; BAVATTI, M. W. **Inseticidas de Origem Vegetal**. In: FERREIRA, J. T. B; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. (Ed.). **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2001.

VIEIRA, R.F.; GRAYER, R.J.; PATON, A.; SIMON, J.E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.29, n.3, p.287-304, 2001.

WEIR, B.S. **Genetics data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996, 455p.

WEIR, B.S. Inferences about linkage disequilibrium. **Biometrics Bulletin**, v.35, n.1, p.235-254, 1979.

WERPACHOWSKI, J.S.; VARASSIN, I. G.; GOLDENBERG, R. Ocorrência de apomixia e partenocarpia em algumas espécies subtropicais de Asteraceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, p.607-613, 2004.

WESTMAN, W.; PANETTA F.; STANLEY, T. Ecological studies on reproduction and establishment of the woody weed, groundsel bush (*Baccharis halimifolia* L: Asteaceae). **Australian Journal of Agricultural Research**, v.26, p.855-870, 1975.

WEYERSTAHL, P.; CHRISTIANSEN, C.; MARSCHALL, H. Constituents of Brazilian vassoura oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v.11, p.15-23, 1996.

WICKNESWARI, R.; MAHANI, M.C.; ZAKRI, A.H. Mating systems parameters in a tropical tree species, *Shorea leprosula* Miq. (Dipterocarpaceae), from malaysian lowland dipterocarp forest. **Biotropica**, v.4a, p.693-702, 2000.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, [S.l.], v. 15, p. 323-354, 1951.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations: variability within and among natural populations**. Chicago: University of Chicago Press. 1978, 573p.

ZOMLEFER, W. B. **Guide to flowering plant families**. Chapel Hill & London; Carolina, USA, 1994, 424p.

ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. **SANEST: sistema de análise estatística para microcomputadores**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1985. SEI nº 066060

ZUCCHI, M.I.; BRONDANI, R.P.V.; PINHEIRO, J.B.; CHAVES, L.J.; COELHO, A.S.G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p.449-457, 2003.

**ANEXO 1**

**Tabela 1** - Rendimento dos óleos essenciais (%) dos acessos das populações de *B. dracunculifolia*, oriundas de Botucatu (SP), Dourados (MS), Itahum (MS) e Delfinópolis (MG).

<b>Acesso</b>	<b>Botucatu</b>	<b>Dourados</b>	<b>Itahum</b>	<b>Delfinópolis</b>
1	0,94	0,57	0,55	0,86
2	0,94	0,36	0,43	0,67
3	0,53	0,58	0,77	1,02
4	0,73	0,45	0,46	1
5	0,48	0,41	0,53	1,42
6	0,74	0,25	0,72	0,49
7	0,7	0,33	0,86	0,44
8	1,16	0,28	0,67	0,66
9	0,5	0,39	0,34	0,49
10	0,75	0,51	0,31	1,06
11	0,84	0,59	0,53	1,49
12	0,66	0,41	0,21	1,21
13	0,54	0,42	0,36	1,52
14	0,59	0,45	0,33	0,69
15	0,78	0,7	0,54	0,66
16	0,66	0,46	0,2	1,16
17	0,81	0,38	0,42	0,6
18	0,46	0,3	0,8	0,53
19	0,83	0,46	0,37	0,6
20	0,58	0,59	0,49	0,91
21	0,33	0,58	0,44	0,83
22	0,77	0,43	0,91	0,96
23	0,57	0,42	0,98	0,72
24	0,9	0,49	0,47	0,69
25	0,69	0,76	0,56	0,67
26	0,84	0,65	0,59	0,5
27	0,74	0,46	0,67	0,48
28	0,67	0,43	0,46	1,31
29	0,64	0,35	0,38	0,68
30	0,38	0,58	0,34	1,12
31	-	-	0,42	-
32	-	-	0,45	-
<b>Média</b>	<b>0,69</b>	<b>0,47</b>	<b>0,52</b>	<b>0,85</b>

## APÊNDICE 1

Tabela 1 - Amplitude alélica em partes por bilhão (pb) para a população Botucatu.

<i>Locus</i>	<b>Bdr4</b>		<b>Bdr6</b>		<b>Bdr7</b>		<b>Bdr8</b>		<b>Bdr10</b>	
<b>Acesso</b>	<b>Pares de alelos</b>									
<b>1</b>	166	166	218	220	204	204	224	224	224	224
<b>2</b>	*-	-	218	218	-	-	224	224	-	-
<b>3</b>	-	-	218	230	204	210	222	224	226	226
<b>4</b>	164	166	218	220	214	214	224	224	226	226
<b>5</b>	-	-	218	220	212	212	224	226	226	226
<b>6</b>	164	164	218	218	206	206	222	224	222	222
<b>7</b>	166	166	218	238	214	214	226	226	-	-
<b>8</b>	166	166	214	220	206	206	224	224	230	230
<b>9</b>	166	166	220	232	204	204	224	224	226	226
<b>10</b>	162	164	218	220	204	210	-	-	226	226
<b>11</b>	166	166	218	218	210	210	-	-	226	226
<b>12</b>	164	166	218	220	212	212	-	-	222	222
<b>13</b>	164	164	218	218	206	206	222	224	226	226
<b>14</b>	160	164	218	230	214	214	222	224	226	226
<b>15</b>	160	164	218	218	206	206	222	224	222	222
<b>16</b>	164	166	218	218	206	216	222	222	232	232
<b>17</b>	164	164	218	218	206	216	222	224	232	232
<b>18</b>	164	164	218	218	210	210	-	-	224	232
<b>19</b>	164	164	218	218	206	206	224	226	232	232
<b>20</b>	164	166	218	218	206	208	224	228	224	224
<b>21</b>	164	164	218	218	212	212	224	228	224	234
<b>22</b>	166	166	218	218	-	-	222	222	224	230
<b>23</b>	164	164	218	218	206	210	222	222	224	234
<b>24</b>	164	164	218	218	206	206	222	226	224	236
<b>25</b>	164	164	218	218	206	206	222	226	224	224
<b>26</b>	162	164	218	218	206	210	222	228	224	224
<b>27</b>	164	164	218	218	210	210	222	224	224	232
<b>28</b>	-	-	218	218	212	212	224	226	228	228
<b>29</b>	-	-	218	218	206	206	224	226	232	232
<b>30</b>	-	-	218	218	212	212	-	-	224	224
<b>Sub-total</b>	<b>4</b>		<b>6</b>		<b>6</b>		<b>4</b>		<b>9</b>	
<b>Total</b>	<b>29</b>									

\* (-) não foi observada amplitude alélica.

**Tabela 2** - Amplitude alélica em partes por bilhão (pb) para a população Dourados.

<i>Locus</i>	<b>Bdr4</b>		<b>Bdr6</b>		<b>Bdr7</b>		<b>Bdr8</b>		<b>Bdr10</b>	
<b>Acesso</b>	<b>Pares de alelos</b>									
<b>1</b>	164	164	218	240	204	208	224	224	212	226
<b>2</b>	160	162	218	226	204	204	224	224	212	212
<b>3</b>	*-	-	218	218	210	210	-	-	212	212
<b>4</b>	-	-	232	240	210	210	222	226	212	212
<b>5</b>	166	166	218	218	204	214	222	226	218	222
<b>6</b>	-	-	218	230	216	216	222	222	226	226
<b>7</b>	162	164	218	230	214	214	222	226	222	222
<b>8</b>	164	164	218	230	206	206	224	224	212	212
<b>9</b>	160	162	218	230	206	214	222	224	218	218
<b>10</b>	162	162	218	230	208	208	-	-	212	212
<b>11</b>	-	-	218	218	206	206	-	-	218	228
<b>12</b>	160	162	218	230	206	212	222	224	220	220
<b>13</b>	164	164	218	236	210	214	222	222	226	234
<b>14</b>	164	164	218	218	212	212	222	224	218	218
<b>15</b>	-	-	218	218	204	204	222	224	-	-
<b>16</b>	-	-	218	218	-	-	222	222	224	230
<b>17</b>	164	164	218	218	210	210	-	-	224	224
<b>18</b>	164	166	218	218	206	206	222	226	224	224
<b>19</b>	164	166	218	218	206	212	-	-	224	230
<b>20</b>	164	166	218	218	200	206	222	224	224	230
<b>21</b>	164	164	218	218	206	214	222	224	230	230
<b>22</b>	164	164	218	218	214	214	-	-	224	224
<b>23</b>	164	166	218	218	206	206	220	226	232	232
<b>24</b>	164	164	218	218	208	214	220	226	224	230
<b>25</b>	164	166	218	218	206	206	224	226	224	232
<b>26</b>	164	166	218	218	-	-	224	228	240	240
<b>27</b>	164	164	218	218	-	-	224	224	232	236
<b>28</b>	164	164	218	218	204	204	220	224	232	236
<b>29</b>	164	164	218	218	206	206	220	224	232	234
<b>30</b>	164	164	218	218	206	206	220	222	224	224
<b>Sub-total</b>	<b>4</b>		<b>6</b>		<b>8</b>		<b>5</b>		<b>11</b>	
<b>Total</b>	<b>34</b>									

\* (-) não foi observada amplitude alélica.



**Tabela 3** - Amplitude alélica em partes por bilhão (pb) para a população Itahum.

<i>Locus</i>	<b>Bdr4</b>	<b>Bdr6</b>	<b>Bdr7</b>	<b>Bdr8</b>	<b>Bdr10</b>					
<b>Acesso</b>	<b>Pares de alelos</b>									
<b>1</b>	*-	-	218	218	-	-	222	224	224	224
<b>2</b>	-	-	218	218	206	206	222	222	224	224
<b>3</b>	-	-	218	218	212	212	222	224	222	222
<b>4</b>	166	166	218	218	212	208	222	222	-	-
<b>5</b>	164	164	218	218	208	208	222	224	224	224
<b>6</b>	164	164	216	240	204	214	222	222	220	220
<b>7</b>	164	168	216	216	200	204	222	222	216	222
<b>8</b>	162	164	236	236	-	-	222	222	218	222
<b>9</b>	162	164	218	218	204	204	222	224	222	222
<b>10</b>	162	162	218	218	208	208	222	224	-	-
<b>11</b>	160	162	218	218	214	218	222	222	224	224
<b>12</b>	-	-	218	218	-	-	222	222	-	-
<b>13</b>	164	166	218	218	204	210	222	222	-	-
<b>14</b>	164	164	218	230	204	204	222	224	218	230
<b>15</b>	162	168	218	224	204	208	222	222	220	220
<b>16</b>	164	166	218	218	206	212	224	224	224	224
<b>17</b>	164	166	218	218	-	-	-	-	226	226
<b>18</b>	166	166	218	218	208	208	226	226	226	230
<b>19</b>	162	162	218	218	206	206	222	226	220	230
<b>20</b>	164	164	218	218	208	208	222	224	224	224
<b>21</b>	164	164	218	218	206	206	222	224	224	236
<b>22</b>	162	164	218	218	206	206	222	224	224	224
<b>23</b>	164	166	218	218	206	206	222	224	-	-
<b>24</b>	164	166	218	218	204	204	222	224	224	224
<b>25</b>	-	-	218	218	206	214	-	-	224	224
<b>26</b>	166	166	218	218	-	-	226	226	226	226
<b>27</b>	166	166	218	218	214	216	224	228	226	230
<b>28</b>	162	162	218	218	204	204	220	224	224	232
<b>29</b>	162	164	218	218	198	212	220	224	224	224
<b>30</b>	162	164	218	218	198	198	222	222	226	230
<b>Sub-total</b>	<b>5</b>		<b>6</b>		<b>10</b>		<b>5</b>		<b>9</b>	
<b>Total</b>	<b>35</b>									

\* (-) não foi observada amplitude alélica.

**Tabela 4** - Amplitude alélica em partes por bilhão (pb) para a população Delfinópolis.

<i>Locus</i>	<b>Bdr4</b>		<b>Bdr6</b>		<b>Bdr7</b>		<b>Bdr8</b>		<b>Bdr10</b>	
<b>Acesso</b>	<b>Pares de alelos</b>									
<b>1</b>	164	164	218	218	204	210	222	224	220	220
<b>2</b>	*-	-	218	218	204	214	222	222	222	222
<b>3</b>	164	164	220	220	212	212	222	224	210	222
<b>4</b>	166	166	218	218	212	212	222	224	222	222
<b>5</b>	164	166	218	218	212	212	224	226	222	222
<b>6</b>	-	-	218	220	212	212	224	226	224	224
<b>7</b>	162	164	218	240	212	212	-	-	224	224
<b>8</b>	162	164	218	218	212	212	226	226	-	-
<b>9</b>	162	164	218	218	210	210	226	226	-	-
<b>10</b>	-	-	218	218	210	210	-	-	210	222
<b>11</b>	-	-	218	218	210	210	-	-	224	224
<b>12</b>	-	-	218	218	210	216	226	230	224	224
<b>13</b>	164	164	218	218	212	212	226	226	224	224
<b>14</b>	162	164	218	218	210	210	-	-	224	224
<b>15</b>	162	164	218	218	212	212	-	-	224	224
<b>16</b>	164	164	218	218	212	212	-	-	226	234
<b>17</b>	164	164	218	218	202	202	222	224	226	234
<b>18</b>	164	166	218	218	206	206	222	224	226	234
<b>19</b>	166	166	218	218	204	204	220	224	234	234
<b>20</b>	166	166	218	218	210	210	218	224	234	234
<b>21</b>	164	166	218	218	204	204	220	220	232	236
<b>22</b>	166	166	218	218	198	198	222	222	232	236
<b>23</b>	-	-	218	218	202	202	218	222	232	236
<b>24</b>	164	166	218	218	202	202	218	222	232	236
<b>25</b>	164	166	218	218	202	202	218	222	232	236
<b>26</b>	164	166	218	218	-	-	218	218	232	236
<b>27</b>	-	-	218	218	-	-	218	218	232	236
<b>28</b>	166	166	218	218	-	-	-	-	236	236
<b>29</b>	162	162	218	218	-	-	218	224	236	236
<b>30</b>	166	166	218	218	-	-	218	222	232	236
<b>Sub-total</b>	<b>3</b>		<b>3</b>		<b>8</b>		<b>6</b>		<b>7</b>	
<b>Total</b>	<b>27</b>									

\* (-) não foi observada amplitude alélica.