

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Taxonomia, filogeografia e história evolutiva de quatro espécies de plantas do bioma Pampa: uma contribuição para o conhecimento da biodiversidade e conservação da área**

**GERALDO MÄDER**

Orientadora: Dra. Loreta Brandão de Freitas

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

**Porto Alegre, Maio de 2012**

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

- Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS
- Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Programa Especial em Taxonomia – PROTAX (MCT/CNPq/CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)



THE GOOD



THE BAD



AND THE UGLY

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram durante a elaboração deste trabalho, em especial:

- À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Instituições e Fontes Financiadoras.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial ao Elmo Cardoso pela prontidão em resolver as questões burocráticas.
- À Loreta Brandão de Freitas pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos e pela eficiência de coordenar um laboratório onde nunca faltou nada durante os quase nove anos em que estive presente.
- Aos colegas do Laboratório de Evolução Molecular: Ana Lúcia, Ana Luiza, Aline Fregonezi, Aline Lorenz, Carol, Clênio, Jéferson, Lauís, Maikel, Michele, Nelson, Pakisa, Priscilla, Raquel e Veronica pela amizade, troca de ideias e experiências.
- À minha família, por todo o apoio.
- E à Luana que além da imensa ajuda extraíndo, preparando PCRs, géis e etc... no último ano esteve presente para me dar amor e carinho e felicidade. Te amo!

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	8
I.1. O bioma Pampa.....	9
I.2. A influência paleoclimática.....	11
I.3. Filogeografia, conservação e marcadores moleculares.....	15
I.4. Primeiro estudo de caso: Filogeografia de <i>Calibrachoa heterophylla</i> .....	19
I.5. Segundo estudo de caso: Populações invasoras de <i>Senecio</i> <i>madagascariensis</i> .....	23
I.6. Terceiro estudo de caso: Taxonomia e posicionamento filogenético de <i>Senecio crassiflorus</i> e <i>Senecio ceratophylloides</i> .....	27
CAPÍTULO II - OBJETIVOS.....	31
CAPÍTULO III - ARTIGO 1: Geological and climatic changes shaped the evolutionary history of <i>Calibrachoa heterophylla</i> , an endemic South-Atlantic coastal species of petunia.....	33
CAPÍTULO IV - ARTIGO 2: Demographic and range expansion in subtropical South American invasive populations of fireweed, <i>Senecio madagascariensis</i> .....	72
CAPÍTULO V - ARTIGO 3: Taxonomia e posicionamento filogenético de duas espécies de <i>Senecio</i> (Asteraceae) naturais do bioma Pampa: <i>Senecio crassiflorus</i> e <i>Senecio ceratophylloides</i> .....	113
CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO GERAL.....	138
VI. 1 Primeiro estudo de caso.....	139
VI. 2 Segundo estudo de caso.....	140
VI. 3 Terceiro estudo de caso.....	142
VI. 4 Considerações finais gerais.....	144
REFERÊNCIAS.....	147

## RESUMO

O Pampa, um dos seis biomas representado no Brasil, abrange regiões campestres também na Argentina e Uruguai. No sul do Brasil, o Pampa é usualmente dividido em quatro regiões fisiográficas: Campanha, Depressão Central, Serra do Sudeste e Planície Costeira. A variação do substrato geológico e da altitude contribuem para a diversidade da composição florística da região. Além disso, o Pampa pode ser considerado um mosaico de vegetação devido às conexões com outros biomas. Atualmente, a introdução de espécies exóticas e a implantação da indústria de reflorestamento representam ameaças consideráveis ao Pampa. A possibilidade de utilização de técnicas moleculares como o sequenciamento e a genotipagem de microssatélites têm possibilitado de maneira eficaz a interpretação de cenários evolutivos, como o tempo e o padrão de divergência entre as populações de uma mesma espécie ou de espécies relacionadas. Neste trabalho investigamos padrões de diversificação genética no Pampa em três estudos de caso: uma espécie endêmica e vulnerável (*Calibrachoa heterophylla*), uma espécie exótica e invasiva (*Senecio madagascariensis*) e duas espécies nativas de difícil determinação taxonômica (*Senecio crassiflorus* e *Senecio ceratophylloides*). A partir dos resultados deste trabalho observamos que enquanto *C. heterophylla*, *S. crassiflorus* e *S. ceratophylloides* sofrem com as alterações ambientais no Pampa, espécies oportunistas como *Senecio madagascariensis* se aproveitam da reduzida competitividade para se espalharem por ambientes alterados. Análises moleculares e morfológicas nos permitiram compreender diversos aspectos acerca da história evolutiva das espécies estudadas. As experiências adquiridas ao interpretar os resultados do presente trabalho sugerem que abordagens genéticas e morfológicas têm grande importância e em conjunto são excelentes ferramentas complementares para estudos taxonômicos. Os dados populacionais e filogeográficos obtidos aqui podem contribuir para o estabelecimento de estratégias de conservação das espécies. Em contrapartida, esses dados também podem ter grande utilidade na tomada de medidas para conter o avanço de espécies invasoras.

## ABSTRACT

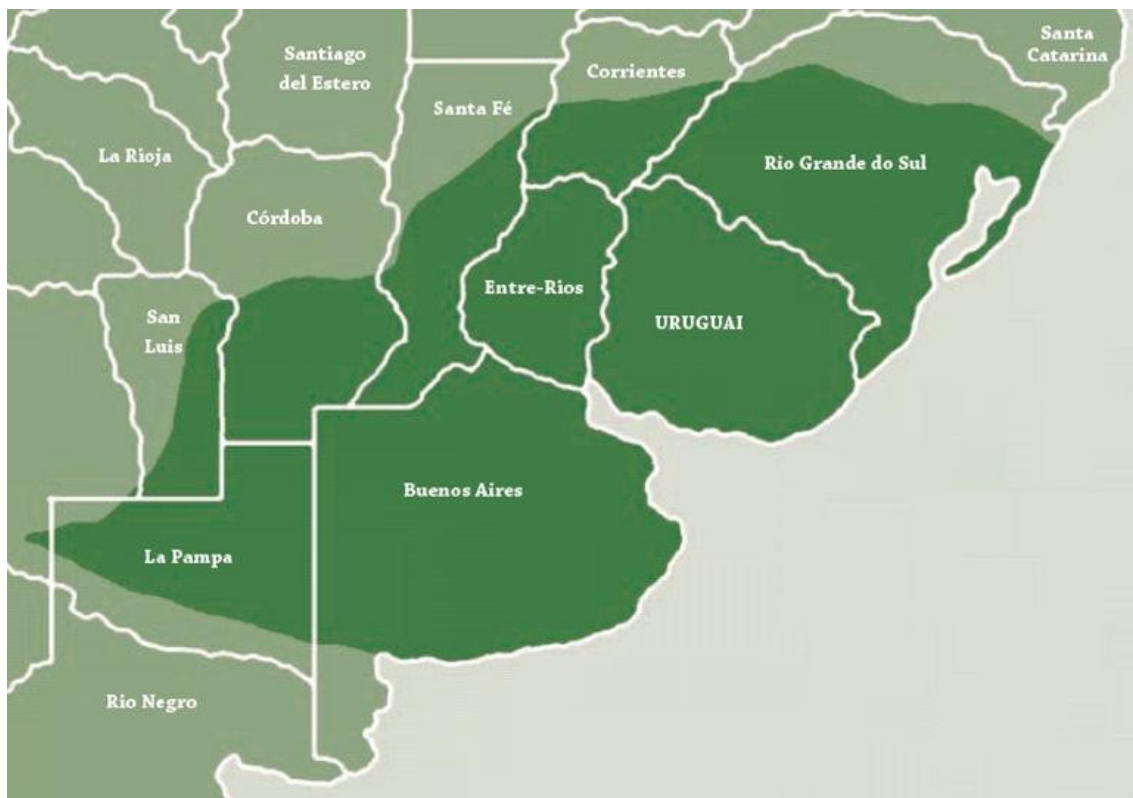
The Pampa, one of the six biomes represented in Brazil, covers grasslands regions in Argentina and Uruguay. In southern Brazil, the Pampa is usually divided into four physiographic regions: Campanha, Central Depression, Serra do Sudeste and Coastal Plain. The variation of geological substrate and altitude contribute to the floristic diversity of the region. In addition, the Pampa can be considered a mosaic of vegetation due to connections with other biomes. Currently, the introduction of exotic species and implementation of forestry industry represent significant threats to the Pampa. The possibility of using molecular techniques such as sequencing and microsatellites genotyping have effectively allowed the interpretation of evolutionary scenarios, such as time and divergence pattern among populations of the same species or related species. In this paper we investigate patterns of genetic diversification in Pampa on three case studies: an endemic and vulnerable herb (*Calibrachoa heterophylla*), an exotic and invasive weed (*Senecio madagascariensis*) and two native species taxonomically complex (*Senecio crassiflorus* and *Senecio ceratophylloides*). From the results of this study we found that while *C. heterophylla*, *S. crassiflorus* and *S. ceratophylloides* suffer with environmental changes in Pampa, opportunistic species such as *Senecio madagascariensis* take advantage of reduced competition for spread to disturbed habitats. Molecular and morphological analyzes allowed us to understand several aspects about the evolutionary history of the species studied and the expertise gained when interpreting the results of this study have suggested that both, genetic and morphological approaches, are important and together are useful tools for taxonomic studies. The phylogeographic and population data obtained here may contribute to the establishment of strategies for conservation of species. These data can also be very important to control the spread of invasive species.

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO**



## I.1. O bioma Pampa

O Brasil é um dos países com maior megadiversidade no mundo, entretanto as ameaças à fauna, flora e paisagens naturais são alarmantes (Brandon *et al.*, 2005). Segundo a classificação oficial feita pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2004), o País possui seis biomas terrestres: Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Pantanal e Pampa. O Pampa abrange regiões campestres em planícies de três países sulamericanos: no Brasil é representado por cerca de dois terços do território do estado do Rio Grande do Sul; na Argentina pelas províncias de Buenos Aires, San Luis, Córdoba, La Pampa, Santa Fé, Entre-Rios e Corrientes; além de todo o território do Uruguai (Figura 1). Este bioma está localizado entre 34° e 30° de latitude sul e 57° e 63° de longitude oeste.



**Figura 1** – Representação da abrangência do bioma Pampa no Brasil, Argentina e Uruguai (Pillar *et al.*, 2009- modificado).

Em termos geomorfológicos, o Pampa é uma região complexa, pois inclui diversas unidades de distintos contextos tectônicos e paleogeográficos (Paim *et al.*, 2000), incluindo desde elementos magmáticos intrusivos (granitos) do Proterozóico médio, até sedimentos Holocênicos do litoral, em uma faixa que inclui também rochas basálticas do Mesozóico, além de uma série de elementos sedimentares (IBGE, 1997).

No Rio Grande do Sul o Pampa pode ser dividido em quatro regiões fisiográficas segundo Fortes (1959): Campanha, Depressão Central, Serra do Sudeste e Planície Costeira. A diversidade do substrato geológico e a variação da altitude contribuem para a diversificação da vegetação da região (Suertegaray & Silva, 2009). Esta região, onde predominam formações herbáceas, está longe de ser homogênea. A ausência de barreiras é um fator que dificulta a definição dos limites fitogeográficos do Pampa que, em consequência, apresenta uma mudança gradual na composição florística de toda a região (Grela, 2004).

Ecologicamente, o Pampa é um bioma caracterizado por uma alta diversidade de espécies de plantas vasculares como gramíneas, plantas rasteiras e algumas árvores e arbustos encontrados próximos a cursos de rios. Na parte brasileira do bioma, existem cerca de 3000 espécies de plantas vasculares, sendo que mais de 550 são gramíneas (Bilenca & Miñarro, 2004). Além disso, o Pampa pode ser considerado um mosaico de vegetação devido às conexões com outros biomas (Grela, 2004).

A origem dos campos neste bioma é incerta. Segundo Rambo (1954), o fator determinante seria o controle exercido pelo solo, sendo o clima geral propício ao desenvolvimento de florestas subtropicais. Mesmo que a região do Pampa já fosse dominada por campos quando da chegada dos seus primeiros habitantes no final do Pleistoceno (Behling, 2002), foi a partir de 1800, com a intensa colonização dessa região por colonos europeus, que houve uma alteração mais significativa da composição

vegetal da região, principalmente devido ao pastoreio e à intensificação dos cultivos agrícolas. Atualmente, a introdução de espécies exóticas e a implantação da indústria de reflorestamento representam ameaças consideráveis ao Pampa (Pillar, 2006). O Bioma está pouco representado em áreas protegidas e, neste aspecto, um maior conhecimento sobre a biodiversidade da região é fundamental para auxiliar sua conservação (Martino, 2004).

## **I.2. A influência paleoclimática**

Ao longo dos últimos dois milhões de anos, a Terra passou por diversas alternâncias climáticas de períodos frios e quentes, conhecidos como estágios glaciais e interglaciais. Estas variações são decorrência das distintas taxas de insolação em altas latitudes controladas pelos ciclos de Milankovitch. Durante esses períodos, havia a fusão (períodos interglaciais) ou aumento (períodos glaciais) das regiões polares resultando, conseqüentemente, em alterações do nível do mar. Alterações paleoclimáticas que ocorreram no Quaternário tiveram grande importância na distribuição geográfica atual das espécies animais e vegetais no Brasil (Villwock & Tomazelli, 1995).

Dados palinológicos têm contribuído para o conhecimento da distribuição e abundância de espécies de plantas durante os períodos glaciais e interglaciais. Entretanto, esses registros são incompletos, pois somente representam determinados períodos, dependem de ambientes úmidos e geralmente favorecem apenas espécies polinizadas pelo vento que produzem muitas sementes (Comes & Kadereit, 1998). Uma forma alternativa para compreender a história da vegetação no passado é através de marcadores moleculares. Estes estudos são capazes de conectar os eventos paleoclimáticos históricos com a história evolutiva das plantas através das distâncias

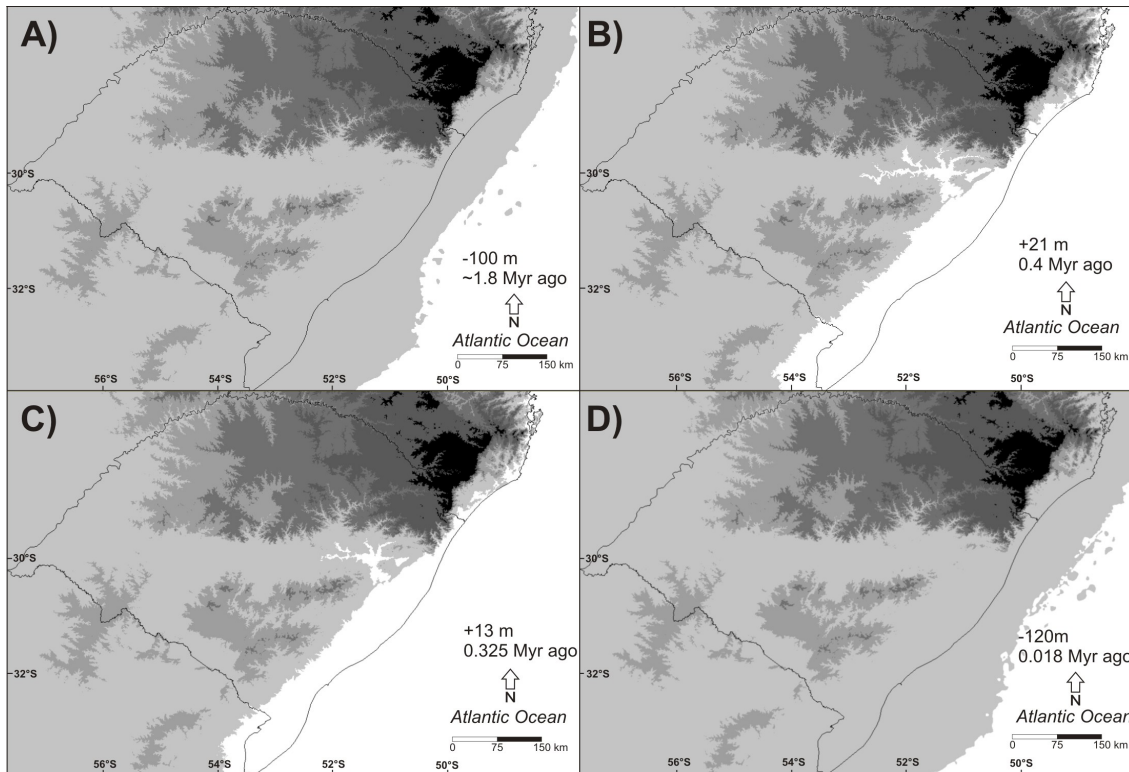
genéticas entre linhagens. Torna-se possível, então, compreender o surgimento de novas espécies ou linhagens através do isolamento geográfico de populações (Hewitt, 2000). Estudos têm demonstrado que diversos eventos de divesificação e especiação ocorreram devido a alterações climáticas durante o Quaternário (Zhang *et al.*, 2001; Alsos *et al.*, 2005; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010).

As terras baixas do oeste do Rio Grande do Sul foram naturalmente cobertas por campos durante períodos glaciais e interglaciais. Florestas de galeria, encontradas hoje no contorno dos rios, não existiam nestes períodos. A transição do período glacial tardio ao Holoceno (10.460 anos antes do presente – A.P.) reflete uma mudança de clima frio e seco para quente e úmido (Behling *et al.*, 2005). Entretanto, após o último máximo glacial, o gradual aquecimento dos trópicos favoreceu novamente a expansão das florestas sobre as vegetações campestres. No Pampa gaúcho, as florestas de galeria aparecem no registro fóssil somente há 5.170 anos A.P., indicando uma mudança para condições climáticas mais úmidas. A máxima extensão de florestas de galeria em 1.550 anos A.P. reflete o período mais úmido registrado, mas mesmo assim a região se manteve predominantemente campestre (Behling *et al.*, 2005).

De todos os substratos constituintes do Pampa, certamente o mais recente em termos geológicos é a Planície Costeira do Rio Grande do Sul, uma espessa faixa de sedimentos que está sobre rochas do embasamento do Escudo Sul-rio-grandense e Uruguaio. Os eventos de transgressão-regressão do nível do mar que originaram a Planície Costeira do Rio Grande do Sul, entre o Pleistoceno e o Holoceno, geraram quatro extensos sistemas deposicionais do tipo laguna-barreira, paralelos à linha de costa (três pleistocênicos e um holocênico) (Figura 2). Cada um desses sistemas é caracterizado por uma barreira arenosa e, atrás destes em direção ao continente, existem



a área ocupada pelo mar foi consideravelmente menor que a anterior, formando a segunda barreira da Planície Costeira (Figura 3C). Novamente o mar recuou e, há 120 mil anos A.P., ocorreu uma nova transgressão que resultou na formação da terceira barreira da Planície Costeira e das restingas que delimitaram a Laguna dos Patos. Novamente o mar regrediu chegando a 120 m abaixo do nível atual, há 18 mil anos A.P (Figura 3D). Um novo evento transgressivo foi responsável pela formação de uma barreira arenosa holocênica (quarta barreira), surgida há aproximadamente 5 mil anos A.P. e integrante de um sistema complexo de múltiplas barreiras que reúne ainda a Laguna dos Patos e a Lagoa Mirim. Este foi o episódio final consequente das variações do nível do mar que afetaram o setor costeiro. Após esse último evento, formou-se uma restinga arenosa entre o planalto e o mar que promoveu a ligação da Planície Costeira do RS com litoral norte do País, permitindo a migração da flora e fauna atuais e interrompendo o curso dos rios. A partir de então, toda a drenagem continental que anteriormente atingia a quebra da plataforma continental ficou retida no interior deste sistema lagunar (Weschenfelder *et al.*, 2010). As desembocaduras dos estuários e os canais fluviais foram soterrados pelas areias transgressivas. Desta forma, o registro dos canais soterrados representa evidências da drenagem pleistocênica sobre a antiga PC na atual plataforma continental (Abreu & Calliari, 2005).



**Figura 3** - Reconstruções paleogeográficas do nível do mar aproximadas em certos períodos do passado, baseadas em relatos da literatura e plotadas em dados atuais de altitude e batimetria (programa DIVA-GIS 7.4). (A) Máximo regressivo, Pleistoceno, ~ 1,8 milhões anos A.P, 100 m abaixo do atual nível do mar (Villwock & Tomazelli, 1995). (B) máximo transgressivo, Pleistoceno Médio, 0,4 milhões anos A.P., 21 m acima do atual nível (Olson & Hearty, 2009). (C), máximo transgressivo, Pleistoceno Médio, 0,325 milhões anos A.P., 13 m acima do nível atual (Martin *et al.*, 1988) (D), máximo regressivo, Último Máximo Glacial, 18 mil anos A.P., 120 m abaixo do atual nível do mar (Correa, 1986).

### I.3. Filogeografia, conservação e marcadores moleculares

A filogeografia é o campo de estudo relativo aos princípios e processos que governam a distribuição geográfica das linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies fortemente relacionadas (Avice, 2000). O tempo e o espaço estão ligados e são considerados os eixos da filogeografia. O enriquecimento das análises filogenéticas intra-específicas tem possibilitado de maneira eficaz a interpretação de possíveis cenários evolutivos, como o tempo e o padrão de divergência entre as populações de uma mesma espécie ou de espécies relacionadas. Espécies de origem muito recente ou que apresentam dispersão e fluxo gênico a longas distâncias podem não apresentar diferenciação geográfica, não havendo coerência entre o relacionamento

genético e a distribuição das populações analisadas. Já espécies que apresentam linhagens genéticas distintas e formam grupos monofiléticos, na maioria das vezes, estiveram isoladas geograficamente e conseqüentemente tiveram seu fluxo gênico interrompido por certo período (Avice, 2000). Muitas espécies mostram uma estrutura populacional que pode ser interpretada em contextos geográficos e cronológicos. Decifrar os componentes espaciais e temporais da estrutura populacional e interpretar os processos ecológicos e evolutivos responsáveis por eles são os principais objetivos da filogeografia. Baseada em uma amostragem apropriada de genes e indivíduos, a filogeografia pode ser utilizada para testar hipóteses biogeográficas, descrever a evolução do isolamento reprodutivo de unidades populacionais e inferir processos de origem, distribuição e manutenção da biodiversidade (Beheregaray, 2008). Além disso, pode ser usada para fazer inferências sobre mudanças no ambiente de uma população a partir de dados genéticos atuais. Os padrões de diversidade de um bioma são consequência de uma longa e complexa história evolutiva, que envolveu processos ecológicos e forças ambientais externas (Rull, 2011). Conhecer a habilidade de espécies em ocupar novos ambientes disponíveis é fundamental para prever como as espécies responderão às mudanças ambientais e os estudos filogeográficos baseados em sequências plastidiais ou em marcadores biparentais fornecem evidências claras para entender isto (Worth *et al.*, 2011).

A perda e a fragmentação do habitat promovem o isolamento e a redução das populações em níveis que favorecem o endocruzamento, a perda de variabilidade genética e do potencial evolutivo (Frankham *et al.* 1999). Em casos extremos, o aumento de homocigotos na população pode levar à expressão de alelos deletérios e o efeito dessas mudanças pode resultar na extinção local da espécie (Leijts *et al.* 1999).



Diversos métodos de estimativa da biodiversidade têm sido propostos para a identificação de áreas prioritárias para a conservação. Recentemente, o conhecimento da biologia evolutiva dos organismos passou a ser valorizado neste contexto. Dessa forma, muitos planos de conservação têm como objetivo a manutenção da variabilidade genética, tendo em vista os processos evolutivos (Mace & Purvis, 2008). Os dados filogeográficos permitem estabelecer uma estratégia que prioriza a conservação de grupos, que incluam representantes da maior parte da história evolutiva das espécies, identificando populações com maior variabilidade genética (Vázquez & Gittleman, 1998).

Cientistas reconhecem que os estudos evolutivos são componentes-chave para o manejo e conservação ambiental. Entretanto, esse pensamento raramente tem sido colocado em prática. Muitos planos de manejo e conservação do meio ambiente têm sido feitos sem informações imprescindíveis devido à falta de comunicação entre evolucionistas e os responsáveis pela determinação das áreas que serão preservadas, ou ainda pela urgência com que essas decisões têm que ser tomadas. Para reduzir os obstáculos e integrar os conhecimentos dos processos evolutivos nos planos de conservação e manejo, é preciso estabelecer um vínculo direto entre cientistas e formadores de opinião, além disso, os responsáveis pelas decisões devem atuar junto com esses cientistas do início ao fim do trabalho (Mace & Purvis, 2008).

Marcadores moleculares são uma ferramenta muito utilizada em estudos de genética de populações e filogeografia, pois permitem acessar um grande número de caracteres. O uso de marcadores moleculares, juntamente com informações morfológicas, permite acessar a história evolutiva dos organismos com alto grau de confiabilidade. Entre os marcadores mais utilizados em estudos populacionais de plantas, destacam-se as regiões não codificadoras do DNA plastidial (cpDNA),

especialmente regiões intergênicas (Hamilton *et al.*, 2003). Os espaçadores intergênicos plastidiais *trnH-psbA* e *trnS-trnG* estão entre os mais usados para estudos populacionais e evolutivos, seja na construção de filogenias de espécies com diversificação recente (Kulcheski *et al.*, 2006; Fregonezi *et al.*, 2012), seja na investigação da ocorrência de hibridação (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006).

Os espaçadores internos transcritos (ITS1 e ITS2) do DNA ribossomal nuclear (nrDNA) por mais de duas décadas têm sido o mais popular marcador do genoma nuclear em estudos evolutivos de vários grupos de plantas (Baldwin *et al.*, 1995; Lorenz-Lemke *et al.*, 2005; Hughes *et al.*, 2006; Nieto-Feliner & Rosselló, 2007; Mäder *et al.*, 2010). Uma vantagem do uso de ITS é o fato de que ele pode fornecer uma alternativa interessante para o uso de marcadores cpDNA, que mostram apenas uma parte da história de uma espécie. Como a região ITS é flanqueado pelos genes de rRNA muito conservados, iniciadores universais podem ser usados para grupos de plantas bastante diferentes, evitando a necessidade do desenvolvimento de conjuntos de iniciadores específicos, como é o caso dos marcadores microsatélites, por exemplo.

Marcadores do tipo microsatélites (SSR) são capazes de exibir níveis de variação maiores que os encontrados nos marcadores de sequências. Microsatélites são pequenas repetições nucleotídicas, geralmente compostas de uma a seis unidades, chamadas de motivos (do inglês *motifs*), repetidos *in tandem* e presentes em regiões codificadoras e não codificadoras dos genomas eucarióticos e procarióticos (Field & Wills, 1996). Cada *locus* de microsatélite varia tipicamente entre cinco e 40 repetições, podendo haver *locus* com repetições ainda maiores. Os motivos mais comumente utilizados em estudos de genética molecular são os di, tri e tetranucleotídicos, sendo os motivos dinucleotídicos os mais comuns para a maioria das espécies (Li *et al.*, 2002). Os SSR possuem natureza co-dominante e são conhecidos pelo elevado grau de

polimorfismos (Schlotterer & Tautz, 1992) e pelas altas taxas de mutação que apresentam (Jarne & Lagoda, 1996; Sia *et al.*, 2000). A grande variabilidade exibida faz desses marcadores uma ótima ferramenta na análise de paternidade e parentesco, por apresentarem variação interindividual dentro de populações. Apesar de sua natureza neutra com relação à seleção, os microssatélites podem ser considerados apropriados para representar também a diversidade genética adaptativa. A heterozigosidade dos marcadores neutros (como os microssatélites) pode estar correlacionada com o valor adaptativo, já que os microssatélites podem estar ligados a importantes *loci* sob seleção, e a diversidade desses marcadores pode refletir a diversidade do genoma como um todo (Reed & Frankham, 2003).

#### **I.4. Primeiro estudo de caso: Filogeografia de *Calibrachoa heterophylla***

A família Solanaceae, pertencente à ordem Solanales, Euasterides I (APG III, 2009), é composta por aproximadamente 3000 espécies, distribuídas em 150 gêneros (Souza & Lorenzi, 2008), sendo a América do Sul seu maior centro de diversidade (Hunziker, 2001). No Brasil ocorrem 32 gêneros e 350 espécies (Souza & Lorenzi, 2008). Essa família possui grande importância econômica para a sociedade, com diversas espécies comestíveis, ornamentais e medicinais. D’Arcy (1991) dividiu Solanaceae em três subfamílias: Solanoideae, Nolanoideae e Cestroideae. Estudos filogenéticos baseados em informações do DNA plastidial mudaram significativamente a compreensão dos relacionamentos entre as subfamílias de Solanaceae e uma nova classificação foi proposta (Olmstead & Palmer, 1992; Olmstead *et al.*, 2008; Olmstead *et al.*, 1999). A tradicional subfamília Cestroideae foi dividida em cinco subfamílias menores: Cestroideae, Petunioideae, Schizanthoideae, Nicotianoideae e

Schwenckioideae. Petunioideae inclui os gêneros *Petunia* Juss. e *Calibrachoa* Cerv. ex La Llave e Lexarza, além de outros gêneros da antiga tribo Nicotianeae.

O gênero *Petunia* foi descrito por Antoine L. Jussieu em 1803 a partir de duas espécies, *P. parviflora* Juss. e *P. nyctaginiflora* Juss. Posteriormente, a partir do número cromossômico e outras características morfológicas, Wijnands *et al.* (1986) dividiram *Petunia* em dois gêneros: *Petunia*, com  $2n=14$ , e *Calibrachoa*, com  $2n=18$ . A recombinação de diversas espécies de *Petunia sensu* para *Calibrachoa* foi realizada a seguir por Wijsman (1990), que transferiu 15 espécies e Stehmann & Semir (1997) que acrescentaram mais dez (sendo uma espécie nova), ambos os trabalhos baseados nas mesmas características diferenciais utilizadas por Wijsman & Jong (1985). Atualmente, são reconhecidas 27 espécies para o gênero *Calibrachoa* (Fregonezi *et al.*, 2012).

Estudos mais recentes indicam que *Calibrachoa* pode ser dividido em dois subgrupos baseados na autocompatibilidade reprodutiva (Tsukamoto *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1999; Ando *et al.*, 2001; Tsukamoto *et al.*, 2002), morfologia da superfície das sementes (Watanabe *et al.*, 1999), conteúdo de DNA nuclear (Mishiba *et al.*, 2000) e análises filogenéticas (Ando *et al.*, 2005). Em todas essas análises, *C. parviflora* (Juss.) Wijsman e *C. pygmaea* (R.E.Fr.) Wijsman ficam agrupadas, enquanto as outras espécies do gênero formam um grupo à parte (Fregonezi *et al.*, 2012).

O gênero *Calibrachoa*, com a exceção de *C. parviflora*, ocorre exclusivamente no sudeste da América do Sul, de Minas Gerais até o Uruguai, com abundância máxima nos estados brasileiros do Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC) (Tsukamoto *et al.*, 2002). Gêneros irmãos de *Calibrachoa* e *Petunia*, como por exemplo, *Fabiana* Ruiz & Pav., habitam regiões andinas e patagônicas. Sugere-se que os gêneros *Calibrachoa* e *Petunia* teriam surgido através de uma radiação adaptativa a partir dos Andes, tendo sido conduzidos a uma evolução divergente, colonizando áreas de clima subtropical

como a região pampeana e chegando posteriormente ao planalto catarinense (Stehmann, 1999).

A grande maioria das espécies possui distribuição contínua, associada a uma determinada região fisionômica e restrita a uma condição edáfica característica (Stehmann, 1999). Segundo Stehmann & Semir (2005), no Brasil ocorrem 19 espécies, divididas em dois grandes centros de diversidade: um nos Planaltos de Curitiba e Ponta Grossa (Paraná); outro nos campos de altitude da borda oriental do planalto sul-brasileiro (Santa Catarina). Segundo os mesmos autores, existe ainda um terceiro, porém menor, centro de diversidade na província Pampeana, fronteira entre Brasil e Uruguai. Devido à origem andina de *Calibrachoa*, é aceitável crer que tenha existido no passado uma rota migratória andino-pampeana que permitiu que as espécies atingissem o sudeste brasileiro (Stehmann, 1999). Esta hipótese biogeográfica é sugerida para vários outros grupos de plantas, devido à presença de espécies de gêneros típicos dos Andes na região subtropical do Brasil, especialmente em áreas mais altas e frias (Rambo, 1951; Safford, 1999; Lorenz-Lemke *et al.*, 2010).

As espécies do gênero são preferencialmente encontradas em afloramentos rochosos, bordas de floresta, campos arenosos ou pedregosos. Nenhuma estratégia de multiplicação vegetativa foi observada e as espécies de *Calibrachoa* não possuem mecanismos de dispersão de sementes a longas distâncias; seus frutos são deiscentes e as sementes liberadas diretamente no solo, próximas à planta-mãe (Stehmann, 1999).

A espécie alvo deste trabalho foi descrita por Sendtner (1846) como *Petunia heterophylla* que, posteriormente, foi recombinação para o gênero *Calibrachoa* por Wijsman (1990) (Figura 4). Sua distribuição tem sido descrita para toda a Planície Costeira do RS, em áreas de Formações Pioneiras com influência marinha, lacunar ou lacustre. Seu registro mais setentrional foi feito em Imbituba (SC), enquanto o limite

meridional é o norte do litoral uruguaio, embora não tenham sido observadas, recentemente, plantas desta espécie nos extremos de sua distribuição (P. Speranza, comunicação pessoal para ocorrência no litoral uruguaio). Esta espécie habita dunas e campos arenosos, além de ambientes alterados, como beiras de estradas e lavouras abandonadas.



**Figura 4** – Indivíduo de *Calibrachoa heterophylla* fotografado no Horto Florestal da Aracruz, Barra do Ribeiro/RS, evidenciando o hábito subarborescente característico da espécie e o padrão de coloração de suas flores.

*Calibrachoa heterophylla* possui morfologia floral associada à melitofilia e os polinizadores mais frequentes são abelhas solitárias. É uma espécie caracteristicamente psamófila, facilmente reconhecida pela coloração esbranquiçada ou acinzentada, conferida pelos grãos de areia aderidos ao seu indumento, nos seus ramos jovens, folhas e cálice (Stehmann, 1999). De acordo com observações em campo, essa espécie possui uma considerável plasticidade fenotípica representada por diferentes padrões quanto ao hábito, forma e tamanho das folhas ao longo da sua distribuição geográfica.

### **I.5. Segundo estudo de caso: Populações invasoras de *Senecio madagascariensis***

Plantas invasoras possuem diversos atributos e mecanismos que lhes permitem a dispersão e o estabelecimento por novos ambientes. Possuem forte agressividade na competição com plantas nativas por luminosidade e nutrientes do solo; têm elevada produção, longevidade e dispersão de sementes (Lorenzi, 2000). A ausência de herbívoros e patógenos nos ambientes de invasão também favorece o sucesso de plantas invasoras (Keane & Crawley, 2002).

Essas plantas têm impacto direto no funcionamento dos ecossistemas naturais e são sérias ameaças para a biodiversidade global (Sala *et al.*, 2000; Strauss *et al.*, 2006). Há também uma grande relevância de processos evolutivos no sucesso de uma invasão (Mooney & Cleland, 2001; Sakai *et al.*, 2001; Lee, 2002; Barrett *et al.*, 2008; Rosenthal *et al.*, 2008). Pequenas populações fundadoras possuem um substrato genético limitado para a seleção agir sobre novos ambientes e, dessa forma, acabam não conseguindo se estabelecer (Sakai *et al.*, 2001).

Assim, ao mesmo tempo em que as invasões biológicas são sérias ameaças à biodiversidade, são também um fenômeno fascinante e uma oportunidade ímpar para estudar como os processos ecológicos e evolutivos são influenciados pela migração e súbita mudança nas condições ambientais (Sax *et al.*, 2007).

Richardson *et al.* (2000) distinguem três fases principais no desenvolvimento de invasões de sucesso: a espécie dispersa para uma nova região geográfica (introdução); forma populações persistentes no ambiente invadido (naturalização); e dissemina com sucesso, ampliando a área de colonização (invasão). Para passar de cada uma dessas fases para a outra, as espécies invasoras precisam superar barreiras que estão diretamente ligadas a processos genéticos, como o fluxo gênico, a deriva genética e a

seleção. Dessa forma, os padrões de diversidade genética de populações de espécies invasoras fornecem informações importantes sobre a história da introdução, da naturalização e da invasão (Lachmuth *et al.*, 2010).

Deriva, seleção, dispersão, número e origem dos indivíduos fundadores são alguns dos fatores que influenciam a variação genética em populações invasoras (Lee, 2002; Barrett *et al.*, 2008). Um estudo recente de Crawford & Whitney (2010) revelou que um aumento de diversidade genética potencializa o sucesso de colonização de populações experimentais. Esse aumento da diversidade genética amplia o potencial adaptativo de populações introduzidas em um novo ambiente (Sakai *et al.*, 2001). A interação desses múltiplos fatores, genéticos e ecológicos e sua importância relativa para o sucesso da invasão podem variar entre as três fases invasivas. Na fase de introdução, a diversidade genética depende fortemente do modo de dispersão: várias introduções em eventos isolados de distintas origens ou introduções em grande escala. No entanto, durante as fases posteriores da invasão de espécies exóticas o processo também pode mudar. Frequentemente a transição da introdução até a naturalização envolve um considerável intervalo de tempo. Após o estabelecimento da população, a diversidade genética pode, então, aumentar com a idade da população, devido ao fluxo gênico com o local de origem da invasão ou devido à mistura de rotas de invasão de diferentes fontes de introdução. No entanto, a compreensão da distribuição da diversidade genética ao longo das rotas de invasão é importante para a compreensão da dinâmica da invasão (Lachmuth *et al.*, 2010).

Um pré-requisito indispensável para a investigação dos processos descritos acima é a reconstrução da dinâmica espaço-temporal da invasão. Primeiramente, o conhecimento da fonte de origem de espécies invasoras é necessário para contrastar as condições ambientais e diferenciação genética nas áreas invadidas e de origem.



Reconstruir os locais de introdução, disseminação e posterior mistura permite investigar a diferenciação genética ao longo de rotas de invasão e o desenvolvimento da diversidade genética durante as diferentes fases de invasão (Lachmuth *et al.*, 2010). No entanto, apesar do recente aumento do interesse na genética de populações e filogeografia de espécies invasoras (por exemplo, Le Roux *et al.*, 2006, 2009; Chun *et al.*, 2009; Lachmuth *et al.*, 2010), apenas poucos estudos têm utilizado informações históricas sobre introdução e disseminação.

*Senecio madagascariensis* Poir., mundialmente conhecida como *fireweed*, é membro da família Asteraceae, nativa de Madagascar, Ilhas Mascarenhas e sul da África. Pertence à subfamília Asteroideae, tribo Senecioneae, uma das mais ricas em número de espécies entre as asteráceas. É uma planta herbácea perene, que por vezes se comporta como anual, possuindo um forte crescimento do outono até a primavera. Produz grande quantidade de sementes, além de diásporos que se dispersam a longas distâncias pela ação eólica. É uma planta muito resistente às secas e ao frio e é forte competidora dos cultivos. Pode ser encontrada como ruderal, ocorrendo nas margens de estradas, lavouras, campos de pastejo e terrenos baldios. A floração constante ao longo de todo ano e a alta produção de sementes, além da presença de alcalóides tóxicos, que nos casos mais graves pode levar à morte quando ingeridos por animais, tornam esta espécie oportunista e capaz de invadir um grande número de habitats (Matzenbacher & Schneider, 2008).

Esta espécie foi introduzida acidentalmente na Austrália e no Havaí no início dos anos de 1980 e se naturalizou em uma ampla gama de habitats nos últimos 30 anos. Nesses Países, tem causado grandes problemas, pois concorre fortemente com a flora nativa por luz, umidade e nutrientes do solo, levando à deterioração definitiva das pastagens. Na Austrália, Sindel *et al.* (1998) relatam que a espécie *S. madagascariensis*

tem alto grau de competitividade como invasora, chegando a formar densas populações de até 40 plantas por metro quadrado em campos cultivados. Além disso, é responsável por uma perda anual de milhões de dólares por ano, devido à mortalidade do gado (Le Roux *et al*, 2006). No Brasil, esta espécie foi encontrada pela primeira vez em 1995, onde se espalhou rapidamente nos últimos anos, sendo encontrada até o presente momento principalmente na Planície Costeira e Campanha do Rio Grande do Sul (Matzenbacher & Schneider, 2008). Devido à característica hiberna, vem demonstrando capacidade de adaptação ambiental e climática podendo, num futuro próximo, constituir uma respeitável e inconveniente competidora dos cultivos e da flora campestre indígena. Dados mais recentes (Cruz *et al*, 2010) informam que a espécie já acarreta grandes perdas para a pecuária no Rio Grande do Sul, uma vez que 50% das mortes bovinas decorrentes de intoxicação são atribuídos à ingestão desta espécie, representando uma perda de 32 mil a 45 mil cabeças de gado anualmente. A planta causa uma toxicose evolutiva e irreversível, que representa prejuízo econômico de vários milhões de dólares anuais, apenas por perdas diretas (<http://www.agrosoft.org.br/agropag/101823.htm>). De acordo com o veterinário Fernando Castilhos Karam (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, PVDF/Fepagro), a intoxicação por ingestão de plantas de *Senecio* é a principal causa da mortalidade de bovinos adultos no Rio Grande do Sul. O inverno é o período onde o teor tóxico da planta alcança seus maiores índices e é também a época em que a oferta de alimento para o gado é reduzida, assim esta é a principal época em que os animais acabam se intoxicando.



**Figura 5** – *Senecio madagascariensis*. A) Detalhe da flor. B) Indivíduo encontrado no Campus do Vale-UFRGS, Porto Alegre. C) Detalhe de ramo florífero.

### **I.6. Terceiro estudo de caso: Taxonomia e posicionamento filogenético de *Senecio crassiflorus* e *Senecio ceratophylloides***

O gênero *Senecio* L. é considerado por Cabrera (1978) como o mais importante de sua tribo, com mais de 3.000 espécies distribuídas em todos os continentes. Segundo Bremer (1994), a maioria das espécies ocorre na América do Sul (cerca de 500 espécies) e na África (cerca de 350 espécies), sendo que algumas espécies herbáceas encontram-se amplamente distribuídas. Para Cabrera & Klein (1975), o gênero está representado no Brasil por aproximadamente 85 espécies; já Hind (1993) estima que no Brasil ocorram 67 espécies. O gênero *Senecio* predomina nas regiões montanhosas e nas zonas áridas, apresentando quase todos os tipos biológicos, desde plantas aquáticas a terrestres, de ervas anuais a perenes.

*Senecio* tem sua classificação taxonômica considerada bastante complexa devido ao grande número de espécies e alta diversidade morfológica (Pelser *et al.* 2010).

Segundo Matzenbacher (2009), no Rio Grande do Sul são encontradas 25 espécies, três variedades, uma forma e um híbrido interespecífico.

Em um estudo incluindo 186 espécies do gênero *Senecio*, sequências dos espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal (ITS) foram utilizadas para reconstruir uma filogenia da tribo Senecioneae, com o objetivo de propor uma nova delimitação para o gênero, anteriormente tido como polifilético (Pelser *et al.* 2007). No referido trabalho, observa-se a dificuldade na circunscrição genérica e na determinação do relacionamento evolutivo entre suas espécies, tanto pela ausência de variabilidade entre as seqüências, como pelos baixos valores de suporte observados ao longo dos ramos da filogenia.

Duas espécies têm sua ocorrência associada aos terrenos arenosos da Planície Costeira do sul do Brasil: *Senecio crassiflorus* (Lam.) DC., variedades *crassiflorus* e *maritimus* (Malme) Cabr., e *Senecio ceratophylloides* Griseb. Essas espécies habitam as dunas móveis frontais e por isso apresentam importante papel ecológico na fixação de areia das dunas litorâneas. O registro de híbridos naturais entre essas espécies nunca foi feito, entretanto, a grande frequência de híbridos no gênero e a dificuldade em identificá-los não permite descartar a possibilidade de sua ocorrência. Além disso, essas duas espécies são distinguidas através de poucos caracteres morfológicos, sendo consideradas como espécies irmãs (Cabrera, 1957; Matzenbacher, 1998).

*Senecio crassiflorus* possui folhas inteiras, trilobadas ou tridentadas nos ápices, com 1,0 cm ou mais de largura; tem de dois a cinco capítulos por corimbo. As duas variedades de *S. crassiflorus* florescem e frutificam de setembro a novembro, diferem entre si, principalmente, pela densa pilosidade em ambas as faces das folhas da variedade *crassiflorus* (Figura 6) quando comparada com a variedade *maritimus* (Figura 7). Essa espécie é descrita como endêmica das dunas do sul do Brasil, Uruguai e

nordeste da Argentina (Cabrera, 1974). Seu registro mais setentrional foi feito em Araquari, em SC (Matzenbacher, 1998), e o mais meridional em Monte Veloz, Argentina (Cabrera & Klein, 1975).



**Figura 6** – Plantas de *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus* em seu ambiente natural, localidade de Mostardas-RS.



**Figura 7** – Planta de *Senecio crassiflorus* var. *maritimus* sobre areia da praia na localidade de Arroio do Sal-RS.

*Senecio ceratophylloides* (Figura 8) possui folhas inteiras ou tridentadas no ápice, com menos de 1,0 cm de largura, os capítulos podem aparecer solitários ou aos

pares. A espécie habita dunas, campos arenosos e pedregosos no sul do Brasil, Uruguai e Argentina. Essa espécie, assim como muitas outras da família, é altamente prolífera em relação à produção de sementes (Cordazzo & Spanó, 2002). As plantas possuem diásporos que, com as sementes, dispersam a longas distâncias pela ação eólica. Seus limites de distribuição são: Imbituba, SC, e Junín, Argentina (Matzenbacher, 1998).



**Figura 8** – Planta de *Senecio ceratophylloides*, localidade de Osório-RS.

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho foi contribuir para o conhecimento do estatus de conservação e da biodiversidade vegetal do bioma Pampa através de investigações filogeográficas, populacionais e taxonômicas de espécies vegetais endêmicas, naturais e invasoras.

**Objetivos específicos:**

- Investigar, a partir de uma abordagem filogeográfica de sequências plastidiais, como as mudanças climáticas históricas e geológicas na Planície Costeira do Rio Grande do Sul afetaram a diversidade genética de *Calibrachoa heterophylla*, uma espécie costeira endêmica da região.
  
- Analisar a estrutura genética de populações de *Senecio madagascariensis* utilizando marcadores moleculares para determinar os níveis de diversidade genética, medir seu potencial invasivo e investigar a história da sua introdução no bioma Pampa.
  
- Avaliar o estatus taxonômico das espécies *Senecio crassiflorus* e *S. ceratophylloides*, umas delas com duas variedades, através do estudo da variabilidade morfológica e molecular e determinar seu relacionamento filogenético com as demais espécies do gênero.



**CAPÍTULO III**

**ARTIGO 1**

**Manuscrito submetido à revista *Journal of Biogeography***

Geological and climatic changes shaped the evolutionary history of *Calibrachoa*

*heterophylla*, an endemic South-Atlantic coastal species of petunia

**Geological and climatic changes shaped the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic coastal species of petunia**

Mader, G.<sup>1</sup>, Fregonezi, J.N.<sup>1</sup>, Lorenz-Lemke, A.P.<sup>2</sup>, Bonatto, S.L.<sup>3</sup>, Freitas, L.B.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Evolution, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.O. Box 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>2</sup>Biology Department, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, P.O. Box 549, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil; <sup>3</sup>Laboratory of Genomic and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ipiranga 6681, 90610-001 Porto Alegre, RS, Brazil

\*Corresponding author: Loreta B. Freitas, Ph.D., Department of Genetics, UFRGS, P.O. Box 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil; Tel.: 55 51 3308-6731; Fax: 55 51 3308-9823; E-mail: [loreta.freitas@ufrgs.br](mailto:loreta.freitas@ufrgs.br)

## ABSTRACT

**Aim** We aimed to investigate how past climatic and geological changes in the South-Atlantic Coastal Plain (SACP) of Brazil and Uruguay affected the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla* (Solanaceae), a wild petunia species endemic to the region.

**Location** South-Atlantic Coastal Plain, Brazil and Uruguay.

**Methods** DNA sequences for two non-coding chloroplast intergenic spacers, *trnH-psbA* and *trnS-trnG*, were obtained from 250 individuals of 15 sampled populations, which covered the entire range of *C. heterophylla*. The evolutionary history of these populations was investigated by phylogeographical analysis using the median-joining network method, a Bayesian phylogenetic approach, and population genetic analyses.

**Results** Four major clades were identified in the Bayesian phylogenetic tree and the network which are geographically structured. The high level of genetic structure was also apparent in the AMOVA analysis, with a fixation index ( $\Phi_{st}$ ) of 0.851. A Spatial Analysis of Molecular Variance analysis supported four groups of populations. *Calibrachoa heterophylla* diverged from its sister group around 1.1 million years ago (Mya) and the origin of the four clades occurred between 0.9 and 0.5 Mya. The diversification inside the clades occurred <0.45 Mya. Bayesian skyline plot suggested that the species underwent a population size expansion very recently, around 10 thousand years ago.

**Main conclusions** The results suggest that the four geographic clades have been formed between 1 and 0.5 million years ago, when the coastal plain and the adjacent continental were deeply dissected by paleochannels that can be linked through the coastal plain to the present river network inland, and that correlates very well with the distributional limits of the four clades. Most of the diversity within the major clades coalesced <0.5 Mya, when a major transgression event has occurred where sea level rose >20m and

most the lowlands at the coast area were submerged. We suggest that this event may have washed most the diversity attained previously. However, this and the three subsequent major transgressions formed a series of four sand barriers parallel to the coast that progressively increased the availability of coastal areas after the regressions, and that may have allowed the genetic diversification observed today. We detected a recent population expansion (around 10 kya) for the entire species that may be linked with the event of marine regression after the most recent transgressive event ~5 kya. These populations are found are mainly in the most geologically recent area that correspond to the Holocene sand barrier that presently occur along all SACP.

**Keywords** South-Atlantic Coastal Plain; phylogeography; Pleistocene; Quaternary; genetic diversity; climatic changes

## INTRODUCTION

The glacial and interglacial cycles that characterized the Pleistocene had major effects on the distribution and genetic diversity of plant species in the northern hemisphere, in special caused by the advance and retreat of large ice sheets at higher latitudes (Comes & Kadereit, 1998; Hewitt, 2000). In South America, fully formed glaciers occurred only in the Andes and the main climatic effects on most of the region were that closed vegetation types (forests) alternated with open formations (grasslands) between the glacial and interglacial periods in large areas of South America (Pennington *et al.*, 2009). This might have resulted in more complex histories about the establishment and composition of current vegetation than simple extinctions of local biota and the formation of typical glacial refugia. In Neotropics, refugia have been proposed basically to forest areas for both, plants (e.g., Ribeiro *et al.*, 2011), and animals (e.g., Carnaval *et al.*, 2009). Most of the relatively fewer phylogeographical studies have focused on Eastern South America (Beheregaray, 2008) and have investigated continental species from the Atlantic rainforest, although a few have analyzed species from open areas such the grasslands located in the highlands and in the pampean region of southern South America (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010; Pinheiro *et al.*, 2010). Studies on South American coastal regions are even rarer, despite the potentially interesting evolutionary history of species in these areas, which have been influenced strongly by changes in sea level between glacial and interglacial periods (Kadereit & Westberg, 2007; Ortiz *et al.*, 2007; Molins *et al.*, 2009; Westberg & Kadereit, 2009; Pinheiro *et al.*, 2010).

In order to contribute to a better understanding of plant evolution in these environments, we chose *Calibrachoa heterophylla* (Sendtn.) Wijsman, a wild petunia

species, that is found predominantly in the coastal region of southern Atlantic South America, where it inhabits "restinga" formations, dunes and sandy grasslands.

The coastal region which hosts this species is known as South-Atlantic Coastal Plain (SACP) and is the largest coastal plain in South America, covering approximately 33,000 km<sup>2</sup>, from 28° north to 34° south. It is a flat area of lowlands that is occupied mostly by large systems of coastal lakes. It is elongated in the direction NE-SW for approximately 600 km, and has an average width of 60–70 km in the south–central portion and of 15–20 km in the northern portion (Fig.1) (Tomazelli & Villwock, 2005).

The main factors that formed the SACP as known today were oscillatory glaciation cycles during the Pleistocene and Holocene (Quaternary), which promoted transgressions and regressions in the sea level (Villwock, 1984; Villwock *et al.*, 1986). During the late Quaternary period, four sand barriers parallel to the coast were formed and identified in the SACP; three of which originated during the Pleistocene and one during the Holocene. These barriers were associated with the limits of the marine transgression of the four major interglacial periods in the last 1 Myr, that occurred in the marine isotope stages (MIS) 11, 9, 5, and 1, that are referred to as Barrier–Lagoon Systems I to IV, respectively (Fig.1) (Villwock, 1984; Villwock *et al.*, 1986; Tomazelli & Villwock, 2005).

The earliest transgressive–regressive event (that formed the Barrier–Lagoon System I) occurred approximately 420 thousand years ago (kya), when the ocean invaded the continent and only the highlands of the coastal region were not submerged. The second transgressive–regressive event has occurred approximately 325 kya, when the ocean invaded an area that was significantly smaller than the area invaded in the previous event. Approximately 120 kya, a third marine transgression occurred, which was responsible for the formation of the barrier island that currently isolates the Mirim

Lagoon from the coast, and of a portion of land that started to isolate the Patos Lagoon from the ocean. The Jacuí River became a lake after the loss of direct contact with the sea. During the last glacial maximum (~21 kya) the sea level was approximately 120 m below the current level, creating a wide coastal plain, which was dissected by a drainage network that extended into the coastline (Olson & Hearty, 2009).

At the maximum of the most recent transgressive event, around 5 kya, the sea level had risen to 4–5 m above the level observed today. Barrier–Lagoon System IV was formed, and a sandy shoal that was created in the north linked the SACP with the Northern Brazilian coast, which allowed flora and fauna to migrate. The high sea level meant that previously existing rivers were flooded, which transformed them into estuaries. In addition, the margins of lagoons were flooded, old marine terraces eroded, and barrier islands formed that isolated several lagoon systems along the coast. The current beaches in the region are part of Barrier–Lagoon System IV (Villwock, 1984; Villwock *et al.*, 1986; Tomazelli & Villwock, 2005).

With the establishment of the SACP, vegetation from the west could expand into this new environment and adapt to these different conditions of salinity, soil composition, climate, and hydric regime. Many plant species in the SACP originated in Andean–Pampean areas and invaded the subtropical region during the Pleistocene, especially from colder and higher regions (Safford, 1999; Stehmann & Semir, 2005; Safford, 2007). The central lowlands of Rio Grande do Sul state (Fig. 1) are considered to have been an important gateway for the colonization of the SACP by Andean taxa. Small patches or long strips of gallery forests occur in the central lowlands along rivers between extensive areas of grassy vegetation (Behling *et al.*, 2005). This mosaic of plant species was also influenced by the complex history and geography of the SACP

region, which contains dunes, lakes, lagoons, and channels that could represent barriers or corridors to gene flow for many species that currently inhabit the area.

Chloroplast DNA (cpDNA) sequences were used in a large number of studies to access genetic variation (Fineschi *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2005; Zuber & Widmer, 2009). In particular, non-coding regions (intergenic spacers and introns) have demonstrated suitable variation in phylogeographic studies, since it has high frequency of mutations that are accumulated with no selective constraints (Taberlet *et al.*, 1991). Among numerous intergenic spacers employed, the *trnH-psbA* (Sang *et al.*, 1997; Hamilton *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2003; Kress *et al.*, 2005; Bettin *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2007) have been used in several studies with different plant groups. In *Petunia*, a genus closely related to *Calibrachoa* (e.g., Kulcheski *et al.*, 2006), the *trnH-psbA* and *trnS-trnG* spacers were successfully employed in population studies (Lorenz-Lemke *et al.*, 2006; 2010). The main aim of this work was to investigate how past climatic and geological changes in the SACP affected the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, a coastal species that inhabits the full extent of the SACP. To achieve this, we accessed DNA sequences from two cpDNA intergenic spacers analyzed in a phylogeographic approach.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Sample collection, DNA extraction, amplification, and sequencing**

Individuals of *C. heterophylla* were sampled over three years of intense search across the species known distribution, from the Laguna locality (Santa Catarina State, Brazil) to Santa Vitória do Palmar (Rio Grande do Sul State, Brazil), including northern and southern adjacent areas. Despite the existence of herbarium records, the species was not found in Uruguay and in some Brazilian locations. Unexpectedly, three populations



were found inward from the SACP, in sandy soils along the riverbanks in the Pampa biome (Fig. 2). We sampled a total of 250 individuals from 15 collection sites (Fig. 2) reflecting the distribution of the species with regular distance intervals (Table 1). Exsiccates were made of one plant from each population, and young leaves were carefully collected for genetic analysis. Dried leaves were frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder. Subsequently, DNA was extracted from the powdered leaves as described by Roy *et al.* (1992).

The *trnH-psbA* and *trnS-trnG* cpDNA intergenic spacers were amplified and sequenced using primers described by Sang *et al.* (1997) and Hamilton (1999), respectively. Other plastidial and nuclear loci were tested in representative samples, but no significant variation was found (data not shown). PCR amplification and sequencing were conducted as described in Lorenz-Lemke *et al.* (2006). Sequences were deposited in GenBank (accession numbers: JQ072006-JQ072022, *trnH-psbA* and JQ082455-JQ082470, *trnS-trnG*).

### **Sequence variation and population genetic structure**

The sequences were aligned manually using the GeneDoc program (Nicholas & Nicholas, 1997). Since poly-A/T regions and small inversions were highly variable and homoplasious in preliminary phylogenetic analyses, they were not considered for further analyses as described previously (e.g., Kelchner, 2000; Kim & Lee, 2005). The two cpDNA spacers were concatenated in all analyses. Contiguous insertion/deletion events were treated as single mutation events (Simmons & Ochoterena, 2000).

Basic sequence statistics such as haplotype ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) (Nei, 1987), and analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) among collection sites (close sites with small sample sizes were merged) using  $\Phi_{ST}$  (pairwise

differences) were obtained with Arlequin ver. 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Mantel's test between genetic and geographical distances and spatial autocorrelation analyses with 1,000 permutations were performed with the program Alleles in Space v. 1.0 (AIS; Miller, 2005).

Historical barriers against gene flow were identified using SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002), that identifies geographically homogeneous groups of populations that are maximally differentiated from each other (the method attempts to maximize the proportion of total genetic variation among groups of populations,  $\Phi_{CT}$ ).

### **Phylogenetic analyses and divergence times**

The evolutionary relationships among the haplotypes were estimated using the Median-Joining method ( $\epsilon=0$ ; Bandelt *et al.*, 1999) implemented in the Network 4.5.0.0 program (available at <http://www.fluxus-engineering.com>). Sequences of *Calibrachoa paranensis* (Dusén) Wijisman, *C. serrulata* (L. B. Sm. & Downs) Stehmann & Semir, and *C. elegans* (Miers) Stehmann & Semir, that belong to the same subgenus of *C. heterophylla* (Fregonezi *et al.*, *in press*) were also included (Table S1)

Phylogeny and divergence times among haplotypes were estimated using a Bayesian approach with the software Beast v1.6.1 (Drummond & Suchard, 2010). Two runs of  $10^8$  chains were conducted, with sampling every 1,000 generations. The settings used were the Yule tree prior, the HKY substitution model with four gamma categories, and the strict molecular clock. The substitution rate used was  $2.8 \times 10^{-9}$  ( $\pm 5.4 \times 10^{-11}$ ) substitutions per site per year, or 0.56% per million years estimated for *Petunia* (Lorenz-Lemke *et al.*, 2010), and is similar to those found in plant groups (0.22–0.58%, Wolfe *et al.*, 1987; 0.26–0.92%, Alsos *et al.*, 2005). The best fit model of sequence evolution was identified using Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) with the

Akaike Information Criterion (Kelchner & Thomas, 2007). The software Tracer v1.5 (available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) was used to check for convergence of the Markov chains and adequate effective sample sizes ( $>200$ ) after the first  $2 \times 10^7$  chains have been deleted as burn-in. A maximum clade credibility tree was obtained using the TreeAnnotator program, which is part of the Beast package. Statistical support for the clades was determined by assessing the Bayesian posterior probabilities.

### **Demographic analyses**

The demographic history of *C. heterophylla* was investigated by several methods, such as Tajima's *D* (Tajima, 1989) and Fu's *F<sub>s</sub>* (Fu, 1996) neutrality tests calculated with Arlequin for the entire dataset and for each clade (found in the network and phylogeny). The population growth rate *g* was estimated using the program Lamarc v. 2.1.2 (Kuhner, 2006), which uses a Metropolis–Hastings Markov chain Monte Carlo (MCMC) algorithm to identify parameter values that are compatible with genealogical relationships among sequences. Parameter was estimated using two independent runs with five replicates of one long chain, 50,000 steps long, with trees sampled every 70 steps and a burn-in of 6,000 trees. The Bayesian Skyline Plot (BSP) (Drummond & Suchard, 2010), implemented in Beast and Tracer, was used to estimate the dynamics of changes in population size over time for the entire *C. heterophylla* dataset. The settings for the substitution model and substitution rate were the same as those used for the phylogenetic analysis.

## RESULTS

### Molecular characterization

The *trnH-psbA* alignment was 456 bp long and the *trnS-trnG* alignment was 784 bp. Overall, 32 sites were informative, 16 in each region, and there were 28 different haplotypes (Table S2 in supplementary material). Tables 2 and 3 show the summary statistics obtained for the markers and populations. Variability is very similar between the two markers but within-population diversity varied widely among populations. Five populations are monomorphic and the other, except for P11 and P12, present closely related haplotypes, thus exhibited relatively low nucleotide diversity. Populations P11 and P12, that are very close geographically, are the only that presented haplotypes from different clades (clades 2 and 3) (Fig. 3).

### Phylogeography and population structure

The haplotype network (Fig. 3) shows four geographically structured clades (haplogroups) that are concordant with the phylogeny (Fig. 4) and SAMOVA results (see below) and is depicted in different colors in Fig. 2. The four haplotypes of the southernmost population (P10) formed one haplogroup (Clade 1, green). The haplotypes from the central and northernmost populations formed Clade 2 (blue) and Clade 3 (red), respectively. Populations P3, P13, and P14, which were found outside of the SACP, and the exclusive haplotype H1 from P1 were grouped in Clade 4 (yellow). The central haplotypes H27 and H5, whose grouping may be ambiguous in the network, were grouped to their respective clades according the phylogeny (Fig. 4).

A preeminent feature of the network is that all four clades present a star-like pattern, in which infrequent haplotypes derived with one or two substitutions from a

common central haplotype. Also noteworthy is that the four haplotypes shared between populations (H2, H4, H6, H20) were central haplotypes.

The degree of genetic structure of the populations could be estimated by AMOVA, which indicated that 85.1% of the variation was among populations, and 14.9% was within-population. Removing populations P11 and P12 (which sharing haplotypes from different clades may represent a secondary contact), the among populations variation rose to 95.3%.

SAMOVA was used to infer the best grouping of populations (one to five groups) on the basis of the molecular variation. The configuration of four groups was considered to be the best, with  $\Phi_{CT} = 0.635$  ( $P < 0.001$ ), and the composition of these groups (Fig. 2) was concordant with the clades in the network (Fig. 3). Populations P11 and P12 were placed into clades 2 and 3, respectively, as expected by their different relative frequency of haplotypes from the two clades (Table 3).

Mantel's test showed a significant but moderate correlation between genetic and geographical distances for the populations (correlation coefficient = 0.3860,  $P < 0.001$ ). Spatial autocorrelation analysis showed a continuous increase in genetic distance only in short distances, up to approximately 150 km among populations (Fig. S1 in supplementary material).

### **Phylogenetic relationships and divergence times**

The Bayesian phylogenetic tree (Fig. 4) shown the four major geographically structured clades also identified in the haplotype network. As expected given the small diversity in this group, support values for most nodes are usually moderate to low, in special within the main clades. Clades 1 and 3 were well supported. The estimated divergence time between *C. heterophylla* cpDNA haplotypes and outgroup was 1.13 Mya. The most ancient divergence within *C. heterophylla* was between clade 2 and the

others about 1 Mya. Clade 1 separated from clades 3 and 4 about 0.82 Mya and the latter two diverged about 0.5 Mya. The diversification inside the clades occurred in the last 0.5 Mya. The times for the most recent ancestors (TMRCAs) for the four clades are 0.26 (clade 1), 0.35 (clade 3), 0.4 (clade 4) and 0.45 (clade 2, with exception of the early divergence of H5).

### **Intraspecific demography**

The neutrality tests for each group of haplotypes and for the whole species were mostly non-significant (Table 4). However,  $F_s$  was negative for all results, but only for clades 1 and 4 was significantly negative ( $P < 0.05$ ). Coalescent-based analyses conducted with Lamarc software resulted in positive values for the population growth parameter  $g$  in all groups, although this was not conclusive because the 95% confidence intervals (CI) encompassed negative values.

The Bayesian skyline plot for the species (Fig. 5) suggested that *C. heterophylla* underwent an increase in effective population size fairly recently, ~10,000 years ago. The very small number of haplotypes precludes the use of this methodology to each clade separately, which was probably due to the size of the sample.

## **DISCUSSION**

### **Genetic diversity and structure**

Comparison of the haplotype network and geographical distribution of the haplotypes showed that the *C. heterophylla* populations were genetically structured. This was confirmed by the results of AMOVA, in which most of the observed genetic diversity was found among populations. Similar results were also observed by Lorenz-Lemke *et al.* (2006) for *Petunia exserta* and *P. axillaris*, and by Lorenz-Lemke *et al.*

(2010) for seven highland *Petunia* species, using the same cpDNA molecular markers. Studies with members of other botanical families that grow in coastal environments also showed patterns of geographical structure (Clausing *et al.*, 2000; Franks *et al.*, 2004; Kadereit & Westberg, 2007; Westberg & Kadereit, 2009; Pinheiro *et al.*, 2010).

This highly structured distribution is not surprising when we consider the biology of the species and molecular marker used. Chloroplasts are inherited maternally in *Petunia* species (Derepas & Dulieu, 1992) and *Calibrachoa* (JRS, unpublished results), and mechanisms of seed dispersal are absent in *Calibrachoa* species, which complicated the cpDNA gene flow among populations.

Haplotype diversity in *C. heterophylla* ( $h = 0.882$ ) was similar than those reported for *Petunia axillaris* ( $h = 0.831$ ), *P. altiplana* ( $h = 0.801$ ), *P. bonjardinensis* ( $h = 0.822$ ), and *P. guarapuavensis* ( $h = 0.747$ ), the species that show the highest haplotype diversity in *Petunia*. Similarly, the nucleotide diversity for *C. heterophylla* was higher than that of *Petunia* spp. (e.g., Lorenz-Lemke *et al.* 2006; 2010). No other species of *Calibrachoa* has been studied so far.

### **Genetic and Geologic history**

The Bayesian chronogram indicated that diversification that gave rise to the four geographic clades occurred between 1 and 0.5 million years ago (Fig. 4), before the contemporary configuration of the SACP (that began around 420 kya, MIS 11). In this period, the coastal plain and the adjacent continental shelf (that were exposed during regression periods) were deeply dissected by paleochannels that can be linked through the coastal plain to the present river network inland (Fig. 2A) (Weschenfelder *et al.* 2010). The paleochannels were interspersed by the pre-Cambrian geological formations that were found in both the central-north of the SACP (mouth of the Jacuí River, in the

Porto Alegre region) and in the southern portion (the mouth of the Jaguarão River, located south of the “Southern Sierra” in the Rio Grande do Sul state). In the area of the present day distribution of *C. heterophylla* three main paleochannels were found, that correlates very well with the distributional limits of the four clades (Fig. 2A). Although there were several transgression/regressions between ~1 Mya and 0.4 Mya, the transgressions were less intense than the most recent ones (Fig. 4). These evidences suggest a scenario where the paleochannels may have been the main barriers that originated most of the clades. Clade 4 is different from the others since most of its distribution is currently in the inner areas of the continent (populations P3, P13, and P14), although one may consider that it is separated from its sister clade 3 by the major Jacuí River. Part of the SACP now suffers periodic flooding events, which could also have prevented recent gene flow (Correa 1986; Weschenfelder *et al.*, 2010). Flooded soils are not suitable for *C. heterophylla*, which prefers to grow in sandy fields in open areas. In other regions, however, the disappearance of geographical barriers may have favored contact among populations that were originally from different lineages. The presence of haplotypes from different clades in populations P11 and P12, which are located south of the mouth of the Jacuí River, is possibly the result of very recent contact between Groups 2 and 3 in this region.

The period of greatest diversification of *C. heterophylla* seems to have occurred in recent times, more recently than 0.5 Mya (Fig. 4). Around this time occurred the major transgression event at the MIS 11 where sea level rose >20m and most the lowlands at the coast were submerged, that may have washed most the diversity attained previously (Fig. 6). However, this and the three subsequent major transgressions formed a series of four sand barriers parallel to the coast that progressively increased the



availability of coastal areas after the regressions, and may have allowed the genetic diversification as observed today.

### **Demography**

The results of the Bayesian skyline plot, neutrality tests, and  $g$  values suggest some kind of population expansion in the four clades, although most values were not significant. Absence of significance may be explained by lack of polymorphism in these markers and/or that the expansion was not strong enough. Besides, star-like pattern of clades in the network and the geographical distribution of the majority of the derived haplotypes throughout relatively extensive coastal areas suggest that rapid colonization occurred in some regions. The recent expansion detected by BSP for the entire species (Fig. 5) may indicate a sign of recent expansion linked with the event of marine regression after the most recent transgressive event  $\sim 5$  kya. The populations in which these haplotypes are found are mainly in the geologically most recent areas that correspond to Barrier–Lagoon System IV (Fig. 1; Tomazelli & Villwock, 2005). Unfortunately, we could not conduct BSP analysis for each group separately owing to sample limitations.

## Species range

The absence of *C. heterophylla* in Uruguayan territory and in some Brazilian locations previously known from herbarium records may have been caused by local extinctions, that could occur naturally, but more likely occurred by anthropic influence, since the entire coastal area has undergone severe changes in recent decades (see below). On the other hand, the occurrence of continental populations is an intriguing finding, since the species was known so far as to be typically coastal. The continental populations included vigorous individuals that were located in preserved areas, thus it is unlikely that they are the result of accidental human introduction. The environment of the river beaches in the Pampas is very similar to that found in the SACP, except with respect to salinity, and both, coastal and continental sites, are classified as exhibiting formations of pioneer vegetation (Veloso *et al.* 1991; Behling *et al.* 2005). Based on this information, we assume that these populations are natural.

More phylogeographical studies of SACP endemic plant species are needed to determinate if the phylogeographical history described to *Calibrachoa heterophylla* is representative of multiple taxa or is simply an isolated case. If the same or similar phylogeographical patterns are found in other endemics plants, it would suggest a common mechanism was responsible to drive the diversification in this area.

## REFERENCES

- Alsos, I.G., Engelskjøn, T., Gielly, L., Taberlet, P. & Brochmann, C. (2005) Impact of ice ages on circumpolar molecular diversity insights from an ecological key species. *Molecular Ecology*, **14**, 2739–2753.
- Bandelt, H-J., Forster, P. & Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37–48.

- Beheregaray, L.B. (2008) Twenty years of Phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, **17**, 3754–3774.
- Behling, H., Pillar, V.D. & Bauermann, S.G. (2005) Late Quaternary grassland (Campos), gallery forest, fire and climate dynamics, studied by pollen, charcoal and multivariate analysis of the São Francisco de Assis core in western Rio Grande do Sul (southern Brazil). *Review of Palaeobotany and Palynology*, **133**, 235–248.
- Bettin, O., Cornejo, C., Edwards, P.J. & Holderegger, R. (2007) Phylogeography of the high alpine plant *Senecio halleri* (Asteraceae) in the European Alps: in situ glacial survival with postglacial stepwise dispersal into peripheral areas. *Molecular Ecology*, **16**, 2517-2524.
- Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B., Rodrigues, M.T. & Moritz, C. (2009) Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science*, **323**, 785-789.
- Clausing, G., Vickers, K. & Kadereit, J.W. (2000) Historical biogeography in a linear system: genetic variation of Sea Rocket (*Cakile maritima*) and Sea Holly (*Eryngium maritimum*) along European coasts. *Molecular Ecology*, **9**, 1823–1833.
- Comes, H.P. & Kadereit, J.W. (1998) The effect of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in plant science*, **3**, 432-438.
- Correa, I.C.S. (1986) Evidence of sea-level fluctuation on the Rio Grande do Sul continental shelf, Brazil. *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula*, **40**, 237–249.
- Derepas, A. & Dulieu, H. (1992) Inheritance of the capacity to transfer plastids by pollen parent in *Petunia hybrida* Hort. *Journal of Heredity*, **83**, 6–10.
- Drummond, A.J & Suchard, M.A. (2010) Bayesian random local clocks or one rate to rule them all. *BMC Biology*, **8**, p114.

- Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L. (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571–81.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564–567.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479–491.
- Fineschi, S., Turchini, D., Grossoni, P., Petit, R.J. & Vendramin, G.G. (2002) Chloroplast DNA variation of white oaks in Italy. *Forest Ecology Management*, **156**, 103–114.
- Franks, S.J., Richards, C.L., Gonzales, E., Cousins, J.E. & Hamrick, J.L. (2004) Multi-scale genetic analysis of *Uniola paniculata* (Poaceae): a coastal species with a linear, fragmented distribution. *American Journal of Botany*, **91**, 1345–1351.
- Fregonezi, J.N., Freitas, L.B., Bonatto, S.L., Semir, J. & Stehmann, J.R. (2012). Infrageneric classification of *Calibrachoa* (Solanaceae) based on morphological and molecular evidence. *Taxon* (in pres).
- Fu, Y.X. (1996) New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics*, **143**, 557–570.
- Hamilton, M.B. (1999) Four primers pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 513–525.
- Hamilton, M.B., Braverman, J.M. & Soria-Hernanz, D.F. (2003) Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in new world species of the Lecythidaceae. *Molecular Biology and Evolution*, **20**, 1710-1721.

- Hewitt, G. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Kadereit, J.W. & Westberg, E. (2007) Determinants of phylogeographic structure: a comparative study of seven coastal flowering plant species across their European range. *Watsonia*, **26**, 229–238.
- Kelchner, S.A. & Thomas, M.A. (2007) Model use in phylogenetics: nine key questions. *Trends in Ecology and Evolution*, **22**, 87–94.
- Kelchner, S.A. (2000) The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **87**, 482–498.
- Kim, K.-J. & Lee, H.-L. (2005) Widespread occurrence of small inversions in the chloroplast genomes of land plants. *Molecules and Cells*, **19**, 104–113.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. & Janzen, D.H. (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, **102**, 8369–8374.
- Kuhner, M.K. (2006) Lamarc 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics*, **22**, 768–770.
- Kulcheski, F.R., Muschner, V.C., Lorenz-Lemke, A.P., Stehmann, J.R., Bonatto, S.L., Salzano, F.M. & Freitas, L.B. (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica*, **126**, 1–12.
- Lisiecki, L.E. & Raymo, M.E. (2005) A Pliocene-Pleistocene stack of 57 globally distributed benthic  $\delta^{18}\text{O}$  records. *Palaeoceanography*, **20**, 1–17.
- Lorenz-Lemke, A.P., Mäder, G., Muschner, V.C., Stehmann, J.R., Bonatto, S.L., Salzano, F.M. & Freitas, L.B. (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Molecular Ecology*, **15**, 4487–4497.

- Lorenz-Lemke, A.P., Togni, P.D., Mäder, G., Kriedt, R.A., Stehmann, J.R., Salzano, F.M., Bonatto, S.L. & Freitas, L.B. (2010) Plant species diversification in eastern South American highland subtropical region: a phylogeographic perspective with native *Petunia* (Solanaceae). *Molecular Ecology*, **19**, 5240-5251
- Miller, M. (2005) Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, **96**, 722–724.
- Molins, A., Mayol, M. & Rosselló, J.A. (2009) Phylogeographical structure in the coastal species *Senecio rodriguezii* (Asteraceae), a narrowly distributed endemic Mediterranean plant. *Journal of Biogeography*, **36**, 1372–1383.
- Nei, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nicholas, K.B. & Nicholas, H.B.J. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignments. [www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc).
- Oh, T., Kajita, T. & Murata, A.J. (2003) Distinct geographic structure as evidence by chloroplast DNA haplotypes and ploidy level in Japanese *Aucuba* (Aucubaceae). *American Journal of Botany*, **90**, 1645-1652.
- Olson, S.L. & Hearty, P.J. (2009) A sustained +21 m sea-level highstand during MIS 11 (400 Ka): direct fossil and sedimentary evidence from Bermuda. *Quaternary Science Reviews*, **28**, 271-285
- Ortiz, M.Á., Tremetsberger, K., Talavera, S., Stuessy, T. & García-Castaño, L. (2007) Population structure of *Hypochoeris salzmanniana* DC. (Asteraceae), an endemic species to the Atlantic coast on both sides of the Strait of Gibraltar, in relation to Quaternary sea level changes. *Molecular Ecology*, **16**, 541-552.

- Pennington, R.T., Lavin, M. & Oliveira-Filho, A. (2009) Woody plant diversity, evolution, and ecology in the tropics: perspectives from seasonally dry tropical forests. *Annual Review in Ecology, Evolution and Systematics*, **40**, 437–57.
- Pinheiro, F., Barros, F., Palma-Silva, C., Fay, M.F., Lexer, C. & Cozzolino, S. (2010) Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*, **19**, 3981-3994.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817–818.
- Ribeiro, R.A., Lemos-Filho, J.P., Ramos, A.C.S. & Lovato, M.B. (2011) Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity*, **106**, 46-57.
- Roy, A., Frascaria, N., MacKay, J. & Bousquet, J. (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**, 173–180.
- Safford, H.D. (1999) Brazilian Paramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *Journal of Biogeography*, **26**, 693–712.
- Safford, H.D. (2007) Brazilian Páramos IV. Phylogeography of the campos de altitude. *Journal of Biogeography*, **34**, 1701–1722.
- Sang, T., Crawford, D.J., & Stuessy, T.F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, **84**, 1120–1136.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E. & Small, R.L. (2005) The tortoise and the hare II:

- relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, **92**, 142–166.
- Simmons, M. & Ochoterena, H. (2000). Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology*, **49**, 369–381.
- Stehmann, J.R. & Semir, J. (2005) New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical south America. In: Festschrift for William G. Darcy: The Legacy of a Taxonomist. R.C. Keating, V.C. Hollowell & T.B. Croat (eds.). Missouri Botanical Garden Press, *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, **104**.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105-1109.
- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.
- Tomazelli, L.J. & Villwock, J.A. (2005) Mapeamento geológico de planícies costeiras: o exemplo da costa do Rio Grande do Sul. *Gravel*, **3**, 109–115 (with Abstract in English).
- Veloso, H.P., Rangel-Filho, A.L.R. & Lima, J.C.A. (1991) Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro, Brazil.
- Villwock, J. A., Tomazelli, L.J., Loss, E.L., Dehnhardt, E.A., Horn Filho, N.O., Bachi, F.A. & Dehnhardt, B.A. (1986) Geology of the Rio Grande do Sul Coastal Province. *Quaternary of South America and Antartic Peninsula*, **4**, 79-97.
- Villwock, J.A. (1984) Geology of the Coastal Province of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. A Synthesis. *Pesquisas*, **16**, 5-49.



- Weschenfelder, J., Correa, I.C.S., Aliotta, S. & Baitelli, R. (2010) Paleochannels related to late Quaternary sea-level changes in southern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, **58**, 35-44.
- Westberg, E. & Kadereit, J.W. (2009) The influence of sea currents, past disruption of gene flow and species biology on the phylogeographical structure of coastal flowering plants. *Journal of Biogeography*, **36**, 1398–1410.
- Wolfe, K.H., Li, W-H. & Sharp, P.M. (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **84**, 9054–9058.
- Zuber, D. & Widmer, A. (2009) Phylogeography and host race differentiation in the European mistletoe (*Viscum album* L.). *Molecular Ecology*, **18**, 1946–1962.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Cladinara Roberts Sarturi for help with the sequencing. This project was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Especial em Taxonomia (CNPq/MCT/CAPES), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## TABLES

**Table 1** - Sampling details of *Calibrachoa heterophylla* populations used in the study

Population	<i>n</i>	Collection site	Geographical Coordinates	Voucher*
P1	03	Arambaré/RS	30° 55' 09"S/51° 29' 46"W	BHCB 143123
P2	23	Torres/RS	29° 25' 56"S/49° 47' 53"W	JRS 3251
P3	04	São Francisco de Assis/RS	29° 34' 59"S/55° 06' 03"W	BHCB 102097
P4	03	Mostardas/RS	30° 56' 15"S/50° 44' 21"W	BHCB 104889
P5	13	Mostardense balneary, Mostardas/RS	31° 06' 33"S/50° 54' 04"W	BHCB 104895
P6	26	Flores lagoon, Rio Grande/RS	32° 31' 26"S/52° 32' 48"W	BHCB 104902
P7	24	Barros lagoon, Santo Antônio da Patrulha/RS	29° 53' 34"S/50° 25' 46"W	BHCB 104866
P8	33	Bojuru, São José do Norte/RS	31° 40' 02"S/51° 25' 30"W	BHCB 104880
P9	02	Mar Grosso beach, São José do Norte/RS	32° 02' 47"S/52° 00' 36"W	BHCB 104900
P10	33	Mangueira lagoon, Santa Vitória do Palmar/RS	32° 59' 15"S/52° 43' 56"W	BHCB 104907
P11	26	Barba Negra island, Barra do Ribeiro/RS	30° 28' 31"S/51° 08' 46"W	BHCB 116990
P12	30	Horto Florestal da Aracruz, Barra do Ribeiro/RS	30° 25' 13"S/51° 13' 30"W	BHCB 116994
P13	11	Cacequi river, Cacequi/RS	29° 53' 41"S/54° 51' 13"W	BHCB 117016
P14	09	Santa Maria river, Cacequi/RS	29° 51' 17"S/54° 54' 31"W	BHCB 117021
P15	10	Laguna/SC	28° 27' 36"S/48° 45' 54"W	BHCB 143143

\*BHCB: Herbarium, Department of Botany, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; JRS: João Renato Stehmann. *n* = sampling size.

**Table 2** - Summary statistics for the datasets used.

	$\pi$ (SD) %	$h$ (SD)	Length/bp	Ts	Tv	Indels
<i>trnH-psbA</i>	0.46 (0.28)	0.8479 (0.0107)	456	4	12	0
<i>trnS-trnG</i>	0.38 (0.22)	0.7978 (0.0143)	779–784	5	10	1*
Concatenated	0.41 (0.22)	0.8815 (0.0096)	1240–1236	9	22	1*

$\pi$ , nucleotide diversity;  $h$ , haplotype diversity; SD, standard deviation;

\* Duplication of 5 bp. Tv: transversion; Ts: transition

**Table 3** - Summary statistics for each population.

Population*	$N$	Haplotypes ( $n$ )	$h$ (SD)	$\pi$ (SD)%
P2	23	H2(22); H3(1)	0.087 ± 0.078	0.007 ± 0.015
P5	13	H6(12); H7(1)	0.154 ± 0.126	0.013 ± 0.021
P6	26	H6(14); H8(2); H9(10)	0.579 ± 0.057	0.052 ± 0.047
P7	24	H2(20); H10(3); H11(1)	0.301 ± 0.112	0.030 ± 0.033
P8	33	H6(27); H12(1); H13(4), H14(1)	0.324 ± 0.098	0.033 ± 0.034
P10	33	H15(27); H16(4); H17(1); H18(1)	0.324 ± 0.098	0.028 ± 0.031
P11	26	H19(15); H20(11)	0.508 ± 0.040	0.288 ± 0.168
P12	30	H20(26); H21(1); H22(3)	0.295 ± 0.102	0.096 ± 0.070
P13	11	H4(3); H23(6); H24(1); H25(1)	0.673 ± 0.123	0.070 ± 0.060
P14	09	H4(7); H26(1); H27(1)	0.417 ± 0.191	0.067 ± 0.060
<b>Whole species</b>	<b>250</b>	<b>28</b>	<b>0.882 ± 0.010</b>	<b>0.41 ± 0.22</b>

\*Monomorphic populations ( $n$  and haplotype number) are: P1 (3, H1); P3 (4, H4); P4 (3, H5); P9 (2, H6), and P15 (10, H28).

$\pi$ , nucleotide diversity;  $h$ , haplotype diversity; SD, standard deviation;  $N$ , sampling size;  $n$ , haplotype frequency in population.

**Table 4** - Summary statistics and population growth rate for the four clades.

<i>Clades*</i>	<i>n</i>	<i>Haplotypes</i>	<i>Tajima's D</i>	<i>Fu's Fs</i>	<i>h (SD)</i>	<i>π (SD)%</i>	<i>g(CI)</i>
<b>G1</b>	33	H15, H16, H17, H18	-1.235	-2.016 <sup>§</sup>	0.324 ± 0.098	0.027 ± 0.031	873.35 (-466.71; 993.62)
<b>G2</b>	95	H5, H6, H7, H8, H9, H12, H13, H14, H19, H22	0.018	-0.348	0.631 ± 0.050	0.183 ± 0.112	882.33 (-499.55; 985.88)
<b>G3</b>	95	H2, H3, H10, H11, H20, H21, H28	-0.614	-1.215	0.647 ± 0.028	0.081 ± 0.061	591.56 (-382.57; 983.13)
<b>G4</b>	27	H1, H4, H23, H24, H25, H26, H27	-1.006	-2.242 <sup>§</sup>	0.690 ± 0.079	0.098 ± 0.072	678.42 (-402.82; 988.64)
<b>Total</b>	250		-0.283	-3.334	0.882 ± 0.010	0.41 ± 0.22	495.01 (-258.82; 971.56)

\* See Fig. 3;  $\pi$ , nucleotide diversity;  $h$ , haplotype diversity; SD, standard deviation;  $n$ , haplotype frequency in population;  $g$ , population growth rate (95% CI, confidence interval); <sup>§</sup>, significant values.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

**Appendix S1:** Information about outgroups

**Appendix S2:** Haplotypes cpDNA

**Appendix S3:** Mantel test result

**Table S1** – Information about outgroup used in the phylogenetic analysis.

<i>Species</i>	<i>Geographical Coordinates</i>	<i>Collection number</i>	<i>Genbank accession</i>
<i>Calibrachoa paranensis</i> (Dúsen) Wijsman	25° 27' 57"S/ 49° 43' 16"W	JRS 4215	JQ082472; JQ082475
<i>Calibrachoa serrulata</i> (L.B.Sm. & Downs) Stehmann & Semir	28° 23' 16"S/ 49° 32' 38"W	JRS 4394	JQ082473; JQ082476
<i>Calibrachoa elegans</i> (Miers) Stehmann & Semir	20° 05' 35"S/ 43° 59' 01"W	JRS 2414	JQ082471; JQ082474

**Table S2** - Haplotypes identified in the cpDNA of *Calibrachoa heterophylla*.

Haplotype	Nucleotide position																												n	sampled Population				
	<i>trnH-psbA</i>														<i>trnS-trnG</i>																			
	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3	3	4	7	7	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	0			2			
H1	2	2	4	7	1	2	7	9	0	4	5	7	8	1	5	4	0	1	2	4	4	5	8	8	1	4	6	0	0	8	2	2	3	P1
H2	6	7	6	5	6	8	1	2	5	3	5	5	0	4	3	3	6	8	4	1	9	6	1	8	1	7	4	0	8	3	8	4	42	P2, P7
H3	T	A	A	T	G	G	T	C	T	A	A	G	T	G	C	A	T	G	G	T	A	T	G	C	T	A	A	G	*	G	C	C	1	P2
H4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	G	.	.	.	*	T	.	.	14	P3, P13-14
H5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	T	.	.	3	P4
H6	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	-	T	.	.	55	P5-6, P8,-9	
H7	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	A	.	.	.	.	T	.	.	.	.	-	T	.	.	1	P5	
H8	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	-	T	.	G	2	P6	
H9	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	-	T	.	.	10	P6	
H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	T	*	T	.	.	3	P7	
H11	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	T	*	T	.	.	1	P7	
H12	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	-	T	.	.	1	P8		
H13	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	A	T	.	.	.	-	T	.	.	4	P8		
H14	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	T	.	.	1	P8		
H15	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	*	T	.	.	27	P10		
H16	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	*	T	.	.	4	P10	
H17	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	T	.	*	T	.	.	1	P10	
H18	C	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	*	T	.	.	1	P10		
H19	.	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	-	T	G	.	.	15	P11		
H20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	*	T	.	.	37	P11-12		
H21	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	*	T	.	.	1	P12		
H22	.	.	T	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	-	T	G	.	.	3	P12		
H23	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	T	.	.	6	P13		
H24	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	T	.	.	1	P13		
H25	.	.	.	.	C	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	T	.	.	1	P13		
H26	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	*	T	.	.	1	P14		
H27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	*	T	.	.	1	P14		
H28	.	.	.	.	A	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	A	A	C	.	.	.	.	.	.	*	T	.	.	10	P15		

\* 5-bp duplication (ATTTT); n, haplotype frequency

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** Southern Brazil and Uruguay physiographic map modified from Weschenfelder *et al.* (2010), indicating SACP location and Barrier–Lagoon Systems I to IV positions according Tomazelli & Villwock (2005).

**Fig. 2.** (A) Map showing the sampling sites. The colors of the populations are related to the clusters identified by the network and phylogeny. Dotted lines represent paleochannels (Correa 1986; Weschenfelder *et al.*, 2010). (B) *Calibrachoa heterophylla* flower.

**Fig. 3.** Evolutionary relationships among haplotypes of *Calibrachoa heterophylla* cpDNA using Median-joining network approach. Colors identified the clades. Circle sizes are proportional to haplotype frequency and crossed lines are substitutions inferred in the branches.

**Fig. 4.** Bayesian chronogram, with clade posterior probability (>0.5) in black, and ages in red indicated for selected ones. Colors identified the clades. Confidence intervals are presented in millions of years. Bottom panel, inverted  $\delta^{18}\text{O}$  time series of globally distributed benthic records (Lisiecki & Raymo, 2005).

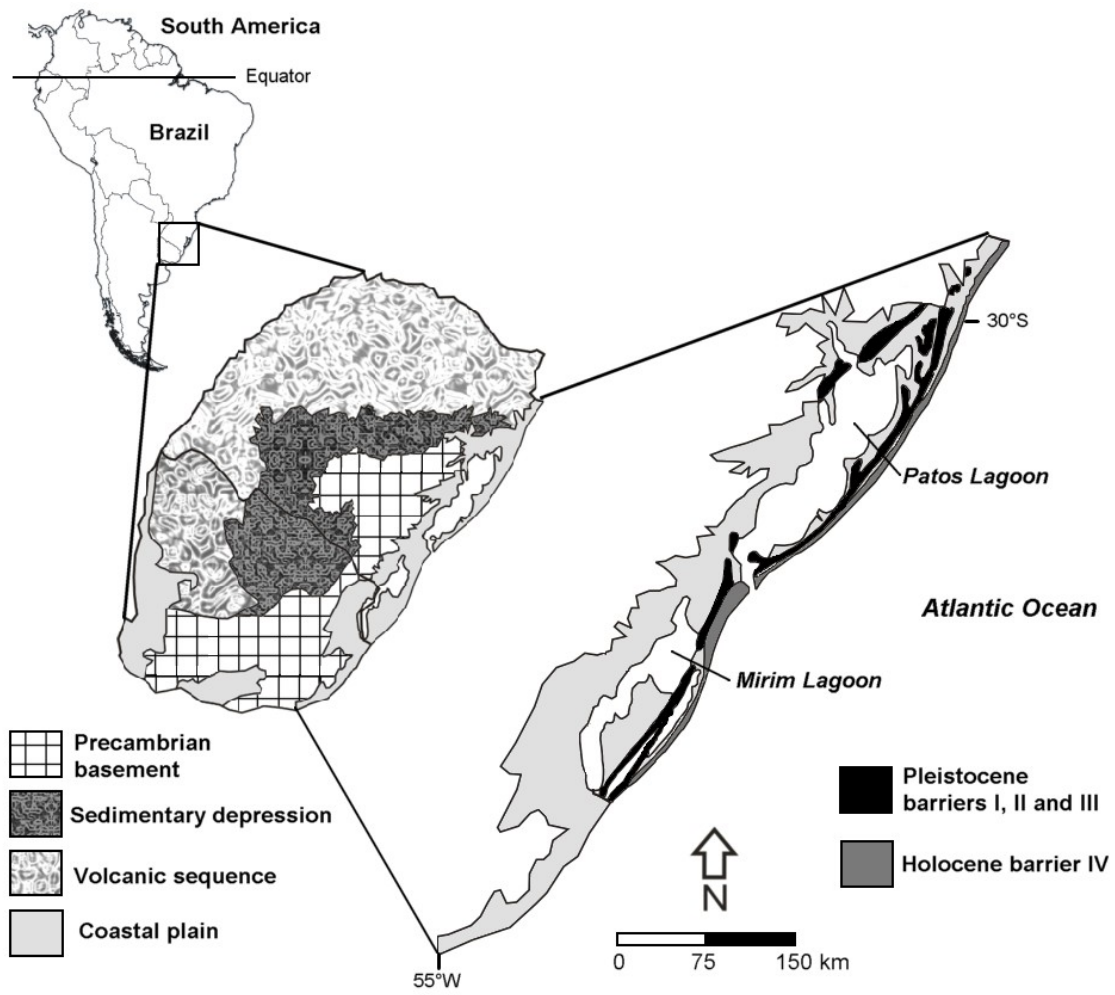
**Fig. 5.** Bayesian Skyline Plot for *Calibrachoa heterophylla* cpDNA showing the effective fluctuation in population size over time, the thick solid line representing the median estimates and the shaded area the 95% confidence interval.

**Fig. 6.** Approximate paleogeographic reconstruction of sea level, based on reports in the literature and plotted on current data of altitude and bathymetry. Maximum transgressive

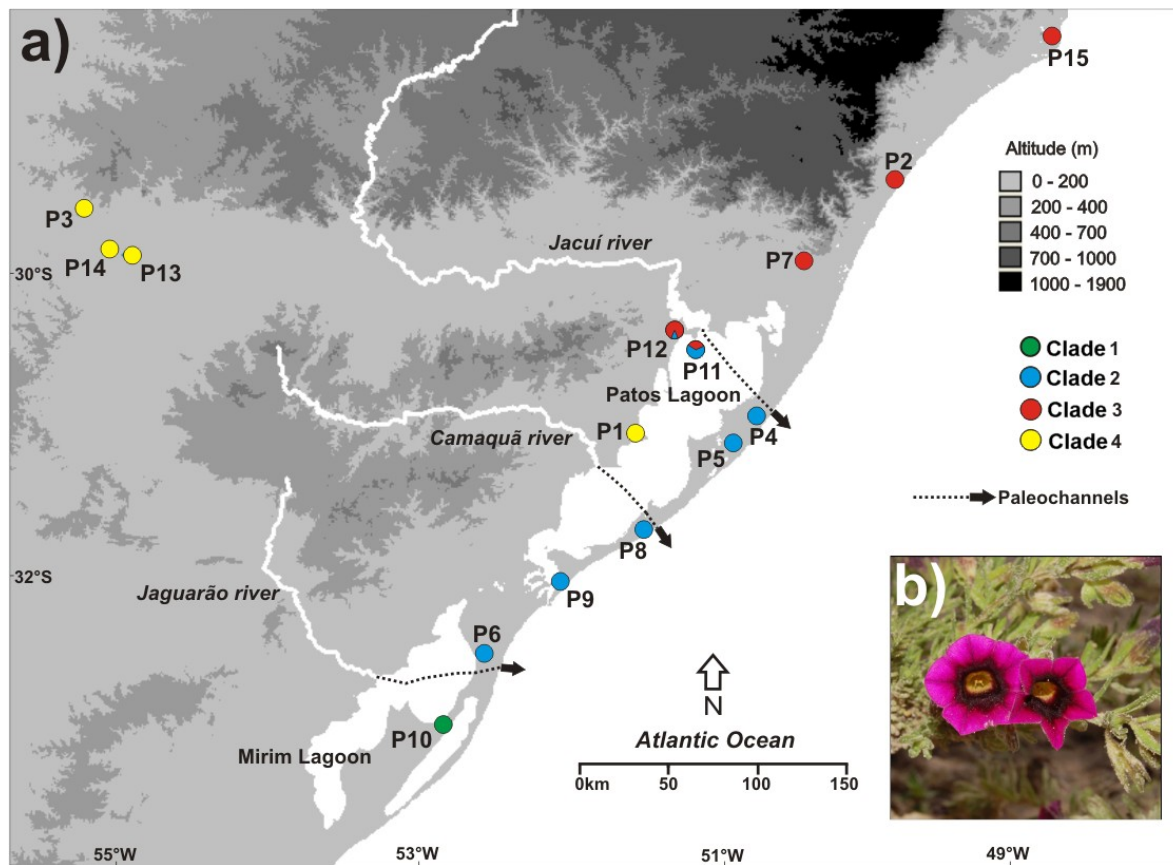
event which led to the formation of Barrier–Lagoon System I, Middle Pleistocene, 0.4 Myr ago, 21 m above current sea-level (Olson & Hearty, 2009).

**Fig S3.** Spatial autocorrelation analyses for *Calibrachoa heterophylla*.  $A_y$  = average genetic distance between pairs of individuals (= 0.886). \*  $P < 0.05$ .

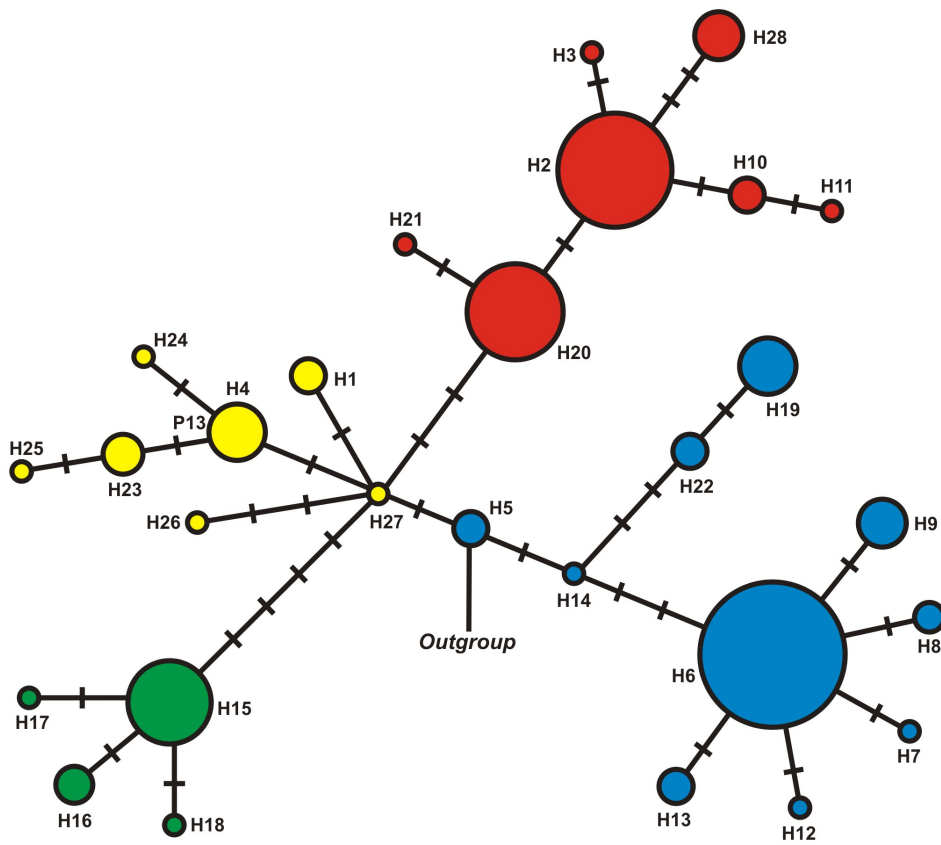




**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

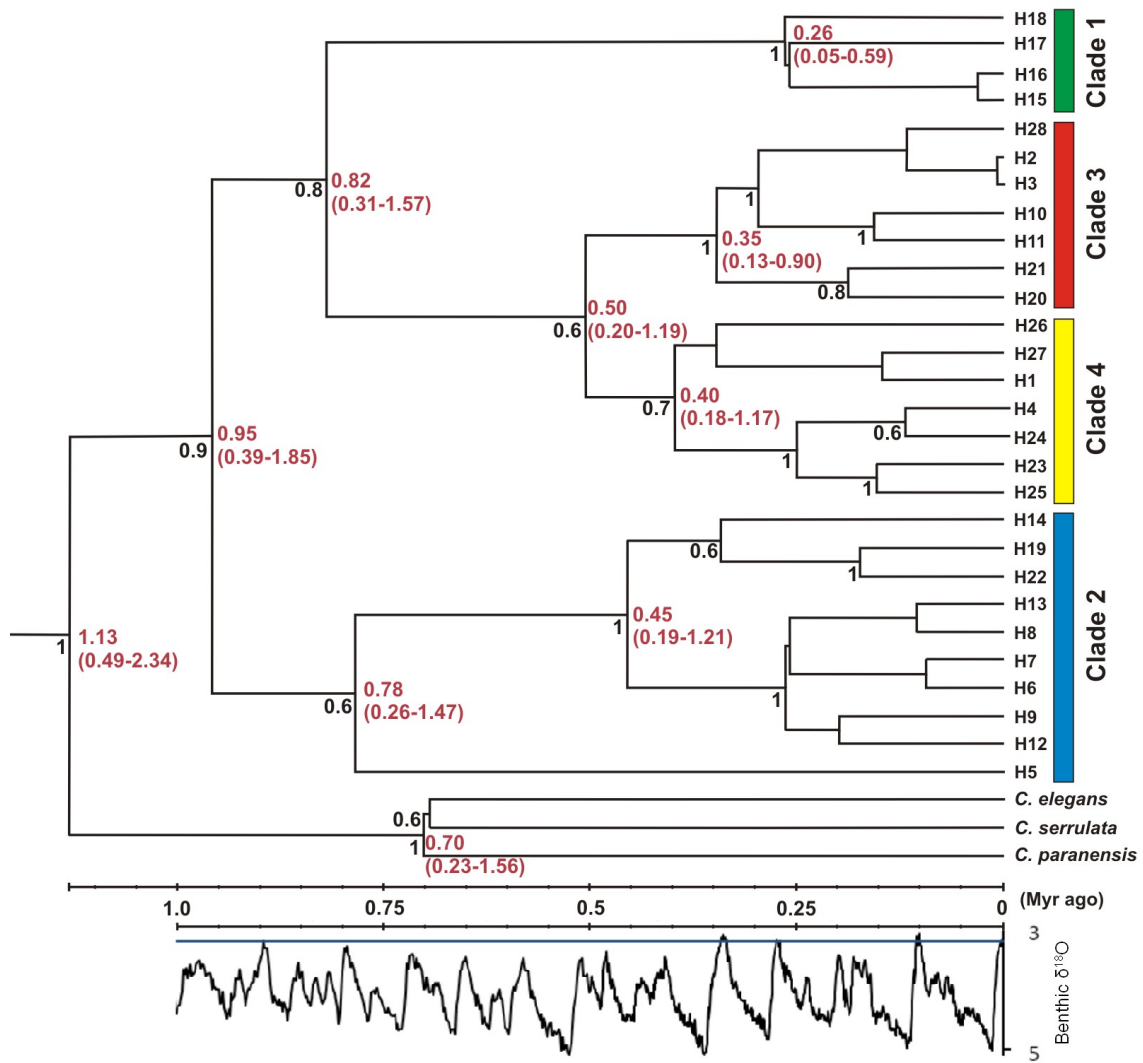
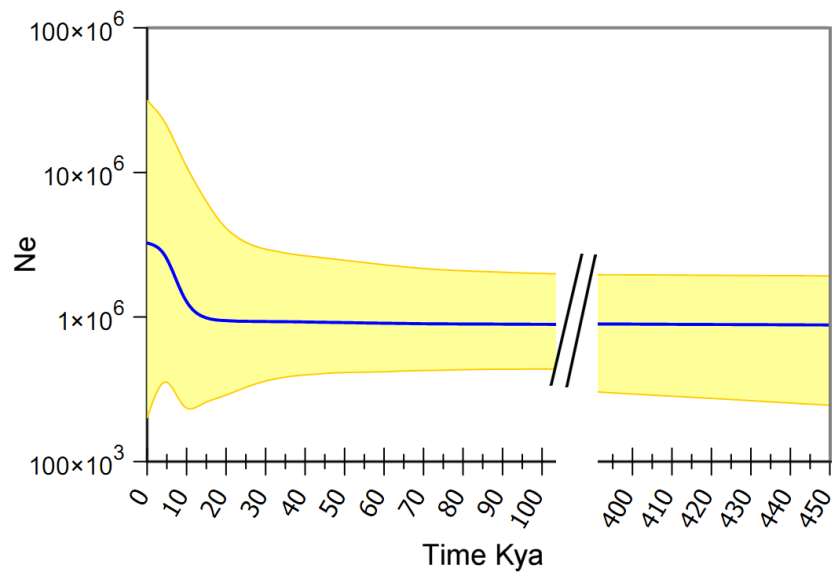
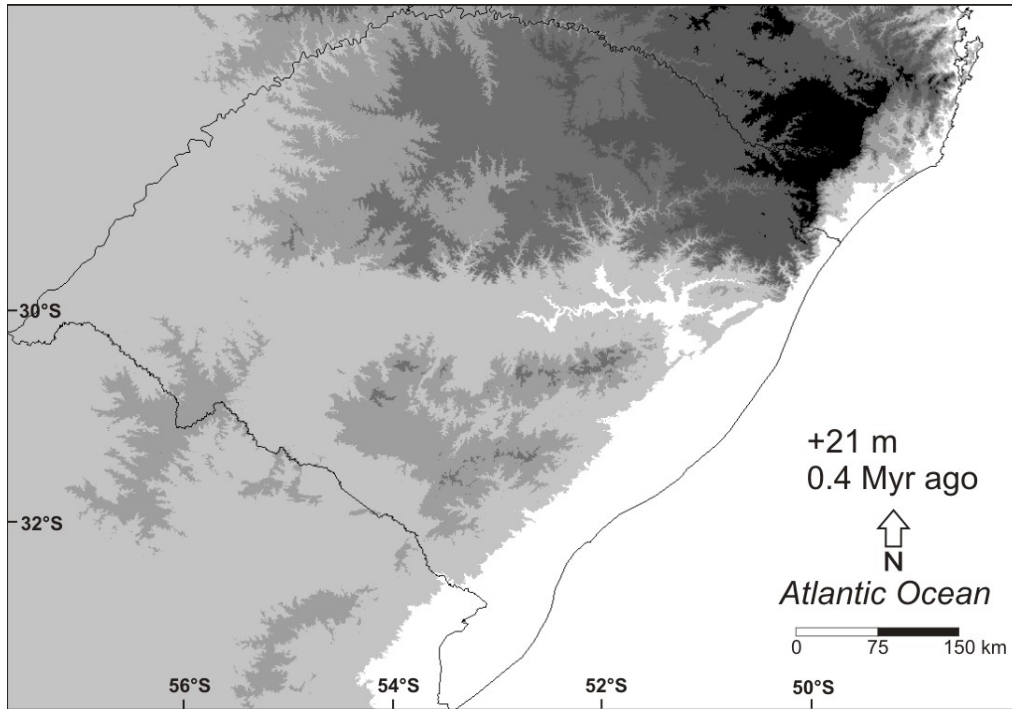


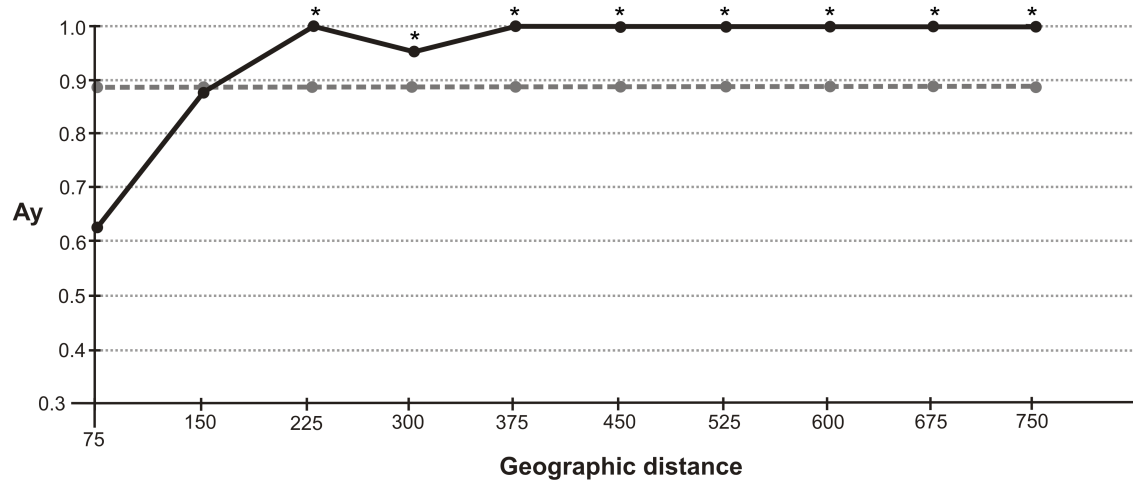
Fig. 4



**Fig. 5**



**Fig.6**



**Fig. S3**

## **CAPÍTULO IV**

### **ARTIGO 2**

#### **Manuscrito submetido à revista *Diversity and Distributions***

Demographic and range expansion in Subtropical South America invasive populations of fireweed, *Senecio madagascariensis*



# Demographic and range expansion in subtropical South American invasive populations of fireweed, *Senecio madagascariensis*

Mader, G.<sup>1</sup>, Castro, L.<sup>1</sup>, Bonatto, S.L.<sup>2</sup>, Freitas, L.B.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Evolution, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P.O. Box 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>2</sup>Laboratory of Genomic and Molecular Biology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ipiranga 6681, 90610-001 Porto Alegre, RS, Brazil

\*Correspondence: Loreta B. Freitas, Ph.D., Department of Genetics, UFRGS, P.O. Box 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil; Tel.: 55 51 3308-6731; Fax: 55 51 3308-9823.

E-mail: loreta.freitas@ufrgs.br

**Running title: Invasive fireweed in South America**

## ABSTRACT

**Aim** The aims of this study were to investigate the genetic structure of *S. madagascariensis* populations using molecular markers to determine levels of genetic diversity, to measure its invasiveness, and to investigate the history of its introduction in Atlantic subtropical South America, testing hypotheses of single and multiple invasion events.

**Location** Atlantic subtropical South America.

**Methods** Genetic analysis was carried out using a combination of nuclear sequences (ITS) and eight microsatellite loci (SSR) in 161 samples from 15 populations.

**Results** Field results showed rapid spread of *S. madagascariensis* in Brazilian Pampa Biome. A moderate degree of global genetic structure was observed. However, less structure was observed in South American populations (ITS and SSR data). *Senecio madagascariensis* populations showed low nucleotide diversity with ITS sequences distributed in a star-like median-joining network, consistent with a recent, worldwide exponential expansion. A prominent feature in the network was the close relationship of the South American populations to the sequences from Hawaii and South Africa. The neutrality tests, mismatch and *Pk* distribution were consistent with a model of sudden range expansion. The results from the SSR Bayesian cluster and Neighbor-Joining (NJ) dendrogram suggest the presence of a structured genetic diversity consisting of two groups.

**Main conclusions** The considerable levels of genetic diversity, gene flow determined according to estimates of migrants, and moderate levels of inbreeding indicate that this species has great potential for success in new environments throughout the Pampa biome in Southern Brazil and Uruguay. Genetic diversity should be the result of multiple introductions related to shipping activities whose source of origin is South

Africa. The results found in this study suggest that this species is expanding geographically and demographically, becoming an increasingly significant threat to native species as well as livestock production, as livestock may be intoxicated by the ingestion of *S. madagascariensis*.

### **Keywords**

***Senecio madagascariensis*, biological invasion, demographic expansion, ITS, microsatellites, genetic structure.**

## INTRODUCTION

Invasive plants have different attributes and mechanisms that allow for their dispersal and establishment in new environments. Not only are they highly aggressive competitors to native plants for light and soil nutrients, but they have large seed production, longevity and dispersal capacities (López-García & Maillet, 2005; Le Roux *et al.*, 2006; Murray & Phillips, 2010). The absence of herbivores and pathogens is also responsible for the success of invasive plants (Keane & Crawley, 2002; Allendorf & Lundquist, 2003). These plants produce a direct impact on natural ecosystems and are serious threats to global biodiversity (Sala *et al.*, 2000; Allendorf & Lundquist, 2003; Strauss *et al.*, 2006). The success of an invasion event is also of great relevance to evolutionary processes (Mooney & Cleland, 2001; Sakai *et al.*, 2001; Lee, 2002; Barrett *et al.*, 2008; Rosenthal *et al.*, 2008). Richardson *et al.* (2000) have distinguished three main stages in the development of successful invasions: first, species disperse to a new geographic region (introduction); second, they form persistent populations in the new environment (naturalization); and finally, they spread successfully (invasion). To progress through each of these phases, invasive species must overcome barriers that are directly linked to genetic processes such as the founder effect, genetic drift, gene flow and natural selection. Small founder populations have a genetic substrate limited by the founder effect and genetic drift hindering their establishment in new environments (Sakai *et al.*, 2001).

However, many invasive plant species reproduce asexually by apomixis or vegetative propagation (Baker, 1995; Calzada *et al.*, 1996). In both cases, the effects of inbreeding depression are avoided because the progeny are genetically identical to the parental plants and heterozygosity does not decrease (Allendorf & Lundquist, 2003; Murray & Phillips, 2010). Another factor that may increase the chance of success for an

invasive species is the decrease of founder effect through multiple sources of introduction, as has been observed in several studies (Genton *et al.*, 2005; Novak, 2007; Chun *et al.*, 2009; Ghabooli *et al.*, 2010).

Crawford & Whitney (2010) revealed that an increase in genetic diversity raises the colonization success of experimental populations, thereby increasing their biomass, fruit production and reproductive period. These changes extend the adaptive potential of populations introduced into a new environment (Sakai *et al.*, 2001). Bossdorf *et al.* (2008) observed in greenhouse testing of *Senecio inaequidens* DC. that invasive populations (from Europe) showed higher growth and phenotypic plasticity in different nutritional conditions and were more tolerant to insect herbivory than natural populations (from Africa). A small number of genes could facilitate invasion success and are generally related to biotic stress, reproduction, phenology (Lee, 2002; Abbott *et al.*, 2009; Prentis *et al.*, 2008) and energy use strategies (Feng *et al.*, 2011).

The interaction of multiple genetic and environmental factors and their relative importance for invasion success may vary among the three invasive stages. In the introduction stage, the genetic diversity strongly depends on the colonization form: multiple introductions from different sources or large-scale introductions. Although often the transition from introduction to invasion involves a considerable amount of time (Lamutch *et al.*, 2010), contemporary genetic studies demonstrate that adaptation to novel environments can occur within 20 generations or less (Prentis *et al.*, 2008). After population establishment, genetic diversity may increase through new entries or gene flow with other populations from different introduction sources. Only detailed knowledge of these processes allows for understanding of the dynamics of invasion (Lachmuth *et al.*, 2010). An indispensable condition for the investigation of these processes is the reconstruction of the spatio-temporal invasion dynamics; by

reconstructing the introduction scenario, the subsequent spread and mixing could allow us to investigate genetic differentiation along invasion routes, and the development of genetic diversity during the different invasion stages (Lamutch *et al.*, 2010). Thus, while biological invasions are serious threats to biodiversity, they are also an excellent opportunity to study how ecological and evolutionary processes are influenced by migration and sudden change in environmental conditions (Sax *et al.*, 2007).

Trade and travel results in the transportation of plants, animals and pathogens across the globe (Keller *et al.*, 2011). The majority of world trade is carried by sea (ca. 90%), and the global network of merchant ships provides one of the most important modes of transportation (Kaluza *et al.*, 2010). Unfortunately, terrestrial species are sometimes inadvertently transported in shipping containers (Lounibos, 2002), allowing for the high spread of bioinvasive organisms (Kaluza *et al.*, 2010). Weeds (frequently associated with seeds) are most often recovered as unknown contaminants in baggage but also could be associated with knowingly transported edible seeds, spices, grains or other plants (McCullough *et al.*, 2006). *Senecio inaequidens*, a sister species of *Senecio madagascariensis* Poir., invaded Europe due to the shipping wool from South Africa and spread across the continent mainly along railways (López-García & Maillet, 2005; Lafuma & Maurice, 2007). In Atlantic subtropical South America, the majority of inbound ships originate in Europe and Africa (Kaluza *et al.*, 2010).

*Senecio madagascariensis*, widely known as fireweed, is a member of the Asteraceae family, native to Madagascar, the Mascarene Islands and Southern Africa (Le Roux *et al.*, 2006). It is characterized as an annual herb, sometimes behaving as a perennial under favorable conditions, with intense growth during the spring. This species, as well as *S. inaequidens* (Lafuma & Maurice, 2007), appears to have a mixed mating system, often showing high levels of self-compatibility (Ernst, 1998). For

example, in the absence of partners, outlying and isolated fireweed plants appear to be fully self-compatible (Le Roux *et al.*, 2009). They produce large amounts of seeds that disperse long distances by wind. The seed dormancy characteristic of this taxon is also an important determinant of the likelihood of a successful infestation, especially in poor soils (López-García & Maillet, 2005). Very resistant to droughts and cold, this species is a strong competitor to agricultural activities, while toxic alkaloids in their constitution may result in death when ingested by animals (Le Roux *et al.*, 2006). Because of these factors, this species is able to invade a large number of habitats (Le Roux *et al.*, 2006). *Senecio madagascariensis* was accidentally introduced to Australia and Hawaii in the early 1980s and within 30 years became naturalized over a wide range of different habitats. In these locations, this species competed strongly with existing pasture flora, ultimately leading to the deterioration of pastures (Le Roux *et al.*, 2006). In Australia, Sindel *et al.* (1998) reported that the species has a high degree of competitiveness as a weed, causing great economic losses due to the mortality of cattle.

In Brazil, this species was first found in 1995 (Matzenbacher & Schneider, 2008), and in recent years, it has been spreading quickly throughout the Pampa biome (South Brazil). More recently obtained data have reported that the species, together with other *Senecio* species, has caused great economic losses to livestock in southern Brazil, with around 45000 animals lost annually (Cruz *et al.*, 2010). Cattle production has existed in the Pampa biome since the sixteenth century, but the most important environmental changes have occurred in recent decades due to agriculture expansion in South America (Vickery *et al.* 1999). In addition, long periods of drought have recently occurred in Southern Brazil and Uruguay, promoting the spread of fireweed in the region, where it often dominates the fields of Pampa biome (Fig S1). Molecular genetics studies allow us to better understand biodiversity, the impacts of invasive species and

the conservation of rare and endangered species. The effective management of invasive plant species requires knowledge of biological processes that were, prior to recent advances in molecular genetics, hard to clarify or quantify under field conditions. The aims of this study were to investigate the genetic structure of *Senecio madagascariensis* populations using molecular markers to a) determine levels of genetic diversity; b) measure its invasive potential; and c) investigate its introduction in Atlantic subtropical South America, verifying the origin of invasive populations and the hypotheses of single or multiple invasion events.

## **METHODS**

### **Sample collection and DNA extraction**

A total of 307 *Senecio madagascariensis* individuals were obtained from 15 field collection sites (referred to as populations) in South Brazil and Uruguay (Tab. 1; Fig. 1). Exsiccates were made from one plant of each population, and young leaves were carefully collected for genetic analysis. The dried leaves were frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder. Subsequently, DNA was extracted from the powdered leaves as described by Roy *et al.* (1992).

### **ITS analysis**

For these analyses we used 139 samples belonging to 15 field populations (Table 1) and 22 GenBank sequences from Madagascar (8), South Africa (7), Swaziland (2) and Hawaii (5) (DQ322598-DQ322619). The internal transcribed spacers (ITS 1 and 2) were amplified using primers and reaction conditions described by Desfeux & Lejeune (1996). 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) was used to exclude the presence of low stability templates (Buckler *et al.*, 1997; Fuertes-Aguilar & Nieto-Feliner, 2003). All PCR products were purified using 20% polyethyleneglycol (PEG) precipitation method



(Dunn & Blattner, 1987). Sequencing was performed in a MegaBACE 1000 automatic machine using the ET Terminator Kit (GE Healthcare) following the manufacturer's protocols. The sequences were aligned manually using the GeneDoc program (Nicholas *et al.*, 1997; available at [www.technelysium.com.au](http://www.technelysium.com.au)) and deposited in GenBank (accession numbers: JQ653968-JQ654097). The sequence types were determined by DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009). Basic sequence statistics such as haplotype ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) (Nei, 1987), and analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al.*, 1992) among collection sites using  $F_{ST}$  (pairwise differences) were obtained in Arlequin ver. 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Statistical tests of neutrality, Fu's  $F_s$  (Fu, 1997) and Tajima's  $D$  (Tajima, 1989), were used to verify a possible, recent population expansion. We also calculated the raggedness index, which measures the smoothness of observed mismatch curves (Harpending, 1994), and tested for significant departure from unimodal (performed in Arlequin) with 10,000 bootstrap replications. A multimodal distribution of differences among haplotypes is usually found in samples drawn from populations at demographic equilibrium, whereas the distribution is usually unimodal in populations that have passed through a recent demographic expansion. The evolutionary relationships among the sequences were estimated by the Median-Joining method ( $\epsilon=0$ ; Bandelt *et al.*, 1999) as implemented in Network 4.5.0.0 software (available at <http://www.fluxus-engineering.com>). Sequences of *S. inaequidens* from GenBank were used as an outgroup (DQ322620 and DQ322621).

### **SSR analysis**

We used all 307 individuals sampled (Tab. 1) to assess the genetic variability among eight nuclear microsatellite loci (SSR). Details of PCR protocols, isolation,

characterization and internal repeats structure of the *S. madagascariensis* microsatellite loci used in this study can be found in Le Roux & Wieczorek (2006). In the present work, we excluded two loci used by Le Roux *et al.* (2009) due to excessive failure to successfully amplify our samples. PCR amplifications were performed in 15  $\mu$ l reactions and 2.5-5 ng of genomic DNA used. Microsatellite genotyping was performed using a MegaBACE 1000 automated sequencer and the ET550-R Size Standards (GE Healthcare). Allele sizes were scored using *Genetic Profiler 2.2 software* (Amersham Biosciences).

Genetic diversity was measured for each population by the number of alleles ( $A$ ) and allelic richness ( $A_R$ ); expected ( $H_E$ ) and observed ( $H_O$ ) heterozygosities, deviations of genotype frequencies from those expected under Hardy-Weinberg equilibrium; and the inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) using Arlequin and FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). The analysis of molecular variance among populations (AMOVA) using  $F_{ST}$  (pairwise differences) was also obtained by Arlequin. To evaluate if microsatellite data support the hypothesis of population expansion, the  $Pk$  distribution of Shriver *et al.* (1997) was applied. The  $Pk$  distribution is analogous to the mismatch distribution developed for DNA sequences. It consists of a graphical method whereby the differences in allele sizes are estimated for each locus and then the weighted average is calculated across loci. Expanding populations show a peak at 0 differences. After a population expands, the peak is shifted from 0 differences to non-zero differences, showing a plateau in intermediate states. A steady state is reached at approximately  $4N_e$  generations when a new equilibrium is reached.

The ISOLDE program (in the Genepop 4.1 package, available at <http://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm>) was used to test the relationship between geographic and genetic ( $F_{ST}$ ) distances among populations, with the statistical

significance assessed using a Mantel test with 10,000 permutations. To test the structure and assess the scale of geographic differentiation among populations, we used STRUCTURE 2.3.3 (Falush *et al.*, 2007) with a burn-in of 250,000, a run length of 1,000,000 *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC), and a model allowing for admixture and correlated allele frequencies. Five independent runs were performed by setting the number of populations (K) from 1 to 10, and an average likelihood value,  $L(K)$ , was calculated for each K across all runs. We also calculated  $\Delta K$  (Evanno *et al.*, 2005) by taking into account the shape of the log-likelihood curve with increasing K and variance among estimates among multiple runs. An unrooted Neighbor-Joining (NJ) dendrogram was constructed from the genetic distance (proportion shared alleles) calculated with the Microsat program using the MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). In addition, to verify the existence of migrants between populations, we ran 10,000 MCMC simulations per population in GeneClass2 (Piry *et al.*, 2004) using the  $L_h/L_{max}$  likelihood computation, where  $L_h$  is the likelihood of an individual being assigned to the population from which it was sampled and  $L_{max}$  is the maximum likelihood for all populations considered. An individual was considered a migrant if the  $L_h/L_{max}$   $P$  value was below 0.01.

## **RESULTS**

### **Range distribution**

During the field-work it was possible to observe the rapid spread of *S. madagascariensis*, more particularly in Rio Grande do Sul Brazilian state. The growth of populations could be observed in different populations (P10 and P11) where this species was not registered previously. In other populations (P5 and P15), it was dominant to local vegetation, forming dense yellow fields in the Pampa biome (Fig. S1).

## ITS

Due to reduced number of sequence types found, we sequenced four to 10 samples per population. A total of 161 samples were analysed (139 sequenced in the present work plus 22 obtained from GenBank). ITS length varied between 665 and 666 bp in all samples analysed with 31 polymorphic sites in the alignment, one insertion/deletion event and 30 substitutions (11 transitions and 19 transversions). Among the 26 sequence types inferred by DNasp, nucleotide diversity ( $\pi$ ) was  $0.0023 \pm 0.002$ , while genetic diversity was  $0.763 \pm 0.017$  (Tab. 2). Of 25 sequence types, 19 corresponded to samples collected in South America whose genetic diversity value was similar to the global sample ( $0.624 \pm 0.02$ ) (Tab. 2). A moderate degree of genetic structure was observed [ $F_{ST} = 0.312$  ( $P < 0.001$ )] in the global dataset when the populations were clustered into five geographical regions: South America, South Africa, Madagascar, Swaziland, and Hawaii. When we analysed the 15 populations from South America independently from the other global populations (Tab. 1), the observed  $F_{ST}$  fell to 0.146 ( $P < 0.001$ ), showing a reduction in the genetic structure. Median-joining network analysis verified the absence of a geographic structure in South America populations (Tab. 1; Fig. 2). *Senecio madagascariensis* populations showed low nucleotide diversity with sequences distributed in a star-like network, consistent with a recent worldwide, exponential expansion. Among the South American populations, P1 was the only population that did not show the central sequence type (S1), while S2 was not sampled only in P1 and P5. Only P6, P7 and P9 presented no exclusive sequence types. All South American populations had at least two sequence types. A prominent network feature was the relationship of the South American populations (P2 to 15) with the sequences from Hawaii and South Africa. The sequences of plants from Madagascar remained in an isolated cluster (sequence types S22-S26), and the Swaziland samples

presented only one unique sequence type (S21) (Fig. 2). The neutrality tests for the complete data set and for the South American populations only were strongly significant (Tab. 2). The results of statistical tests showed significant deviation from expectations of neutral mutations that suggested population growth. The South American population results were corroborated by the mismatch distribution, which clearly presents as unimodal and is consistent with a model of sudden range expansion ( $P = 0.01$ , Harpending's raggedness index) (Fig. 3).

## SSR

The eight microsatellite loci tested were polymorphic across all 307 individuals from the 15 populations. Across all individuals, the number of alleles per locus ranged from ten (Se-194) to 44 (Se-136); within populations the number of alleles ranged from 2 to 17 (mean = 7.025) and allelic richness ranged from 2.71 to 3.75 (mean = 3.387) (Tab. 1). Expected heterozygosity ( $H_E$ ) ranged from 0.577 to 0.771 (mean = 0.715), observed heterozygosity ( $H_O$ ) from 0.352 to 0.597 (mean = 0.456) and  $F_{IS}$  ranged from 0.071 to 0.490 (mean = 0.334) across all loci (Tab. 1). Except for the Uruguayan population (P1), all populations showed a deficit of heterozygotes under Hardy-Weinberg Equilibrium ( $\alpha$  0.05). The majority of microsatellite diversity (89.68%) resided within populations ( $F_{ST}$  de 0.103), similar to the results from the sequence data (ITS). The  $Pk$  test provided evidence for population expansion, showing a peak at 0 in the distribution of allele differences (Fig. 4).

Across fireweed populations, the Mantel test showed a moderately significant positive correlation between genetic and geographic distances ( $r^2 = 0.37$ ;  $P < 0.001$ ) (Fig. 5). The results of Bayesian cluster analyses evidenced the presence of a structured genetic diversity among the groups. Following the method of Evanno *et al.* (2005), the model-based clustering method implemented in STRUCTURE found two distinct,

major genetic clusters (K) (Fig. 6). A cluster including four populations (P12 to P15), that presented more continental geographic distribution (latitude ca. 30 ° S), was named "Central Group". The second cluster was composed of the remaining populations, found in the Coastal Plain region (except for P5), and was named "Coastal Group". Detailed analysis of each genetic group did not allow for the identification of other genetic subgroups. The unrooted NJ dendrogram (Fig. 7) distinguished two clades of samples, corresponding to the same groups obtained by STRUCTURE, and similarly showed admixture between Central and Coastal groups. Some samples were found in the clade of the opposite group (arrows in Fig. 7). More precisely, 30 individuals of Central Group were found in the Coastal clade and 10 of Coastal Group positioned in the Central clade.

Contemporary estimates of dispersal calculated in GeneClass2 identified 38 of 307 individuals as potential 'first generation migrants' ( $P = 0.01$ ). However, given the low genetic structure observed between pairwise populations ( $0.03 \leq F_{ST} \leq 0.23$ ), the results based on the identification of immigrants should be interpreted with caution because a decrease in genetic differentiation and limited number of loci reduces the ability to correctly identify immigrants. We therefore only focused on overall patterns of potential migration. Not surprisingly, the majority of migrants between Central and Coastal groups corresponded to those individuals that showed a distinct population pattern in the dendrogram (indicated by arrows in Fig. 7) and STRUCTURE analysis. On average, populations from the Central Group differed significantly from Coastal Group populations in the amount of heterozygosity ( $H_o$ ), inbreeding ( $F_{IS}$ ) and levels of differentiation among populations ( $F_{ST}$ ). However, there were no significant differences in observed allelic richness ( $A_r$ ) or unbiased gene diversity ( $H_s$ ) between the two groups (Tab. 3).

## DISCUSSION

### Genetic variability

The ITS data showed that a large portion of global, genetic variability is represented in South American populations. Over 75% of the sampled sequence types (20 of 26) were found in South America, where the indices of genetic diversity were similar to the overall sampling. Similarly, microsatellite analysis demonstrated considerable levels of genetic diversity, even though our results indicate values lower (number of alleles and allelic richness) than those obtained from Hawaiian populations (Le Roux *et al.*, 2009). In Hawaii, *S. madagascariensis* was introduced more than a decade before the populations studied in this work (Le Roux *et al.*, 2009). This amount of time may be sufficient to increase genetic diversity through new introductions from distinct African populations.

The two clusters observed in STRUCTURE analysis (Fig. 6) and the NJ dendrogram (Fig. 7) resulting from SSR data suggested at least two independent introduction events. Although the ITS sequences of *S. madagascariensis* have presented low variability when compared with other groups of plants (Nettel & Dodd, 2007; Yamaji *et al.*, 2007; Mäder *et al.*, 2010), this low variability was similar to results obtained in other studies of the *Senecio* genus (Pelser *et al.*, 2003; Pelsner *et al.*, 2007). Therefore, due to insufficient variability, the ITS analysis did not allow us to explore the relationships among South American populations, but instead, such relationships were analysed on a global scale.

These results suggest that invasive populations in South America have a genetic diversity that may be related to multiple introduction events. Several studies have shown, using historical and molecular data, that many invasive weeds have significant

genetic diversity as a result of multiple introductions (for example: *Ambrosia artemisiifolia*, Genton *et al.*, 2005; *Alliaria petiolata*, Durka *et al.*, 2005; and *Phalaris arundinacea*, Lavergne & Molofsky, 2007). However, another possibility is that part of the identified genetic variability is associated with changes in selective pressure that resulted in a rapid and efficient adaptation to the new environment, as Lachmuth *et al.* (2010) suggested regarding *S. inaequidens* in Europe.

### **Native origin**

Based on the ITS data, the South American populations were most related to the samples from Hawaii and South Africa, while samples from Madagascar and Swaziland stayed isolated in the network (Fig. 2). This suggests that the South American populations most likely came from South Africa, or alternatively, originated in Australia or Hawaii and constitute a secondary invasion. Several works have attributed the arrival of invasive plants via cargo ships from South Africa (McCullough *et al.*, 2006; Lamutch *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2011). The first hypothesis is the most probable given the large trade routes between Atlantic subtropical South America and southern Africa, while the same is not true of Australia or Hawaii (Kaluza *et al.*, 2010). Furthermore, when *S. madagascariensis* was introduced in South America, this species did not had dense populations in Australia and Hawaii as today (Le Roux *et al.*, 2006). Our results (Figs. 6 and 7, and Tab. 3) indicate the existence of at least two independent introduction events that have a close geographical origin, most likely in South Africa. One possible explanation for this relationship is that South American populations came from different ports in South Africa, for example, Cape Town and Durban, the main ports with traffic to South America (Kaluza *et al.*, 2010), thus transporting seeds from different native populations.



## Gene flow and demography

The success of an invasive weed depends significantly on how this species can spread. The *Senecio* genus is known for the great dispersal of its seeds. Analyses conducted in this work, as well as actual findings from the field, demonstrate that *S. madagascariensis* are under geographic and population expansion in South America. According to the ITS sequence verified deviation of neutrality tests (Tajima's  $D$  and Fu's  $F_s$ ), a star-like network, and a unimodal pattern in mismatch distribution (Fig. 3), these results suggest a remarkable expansion in the South American populations. An increase in population size was also apparent from the  $P_k$  distribution.

The two clusters (Fig. 6) and the moderate correlation between genetic and geographic variation (Fig. 5) appear more related to a historical question that involves multiple sources of introduction, given that ITS and SSR data showed low  $F_{ST}$  values in local populations. Several studies, such as those conducted by Lavergne & Molofsky (2007) and Ghabooli *et al.* (2010), found low  $F_{ST}$  values in invasive populations. Furthermore, we found a proportionally higher number of migrants than was reported by Le Roux *et al.* (2009) in Hawaii. This difference can be explained by the greater ability of seeds to disperse in an environment of continuous lowlands as in the Pampa biome (Chaneton & Lavado, 1996).

Our results, like Le Roux *et al.* (2009), showed moderate levels of inbreeding that are commonly reported in several introduced species (e.g., Bjorkland & Baker, 1996; Neuffer & Hurka, 1999; Young & Murray, 2000). Inbreeding may be an indirect consequence of crossing between close relatives due to founder effect and/or excessive self-fertilization (Le Roux *et al.*, 2009). The high levels of inbreeding found may provide some evidence of self-fertilization for *S. madagascariensis* in the field (Le Roux *et al.*, 2009). Alternatively, population admixture resulting from multiple

introductions of different source populations could temporally contribute to the low heterozygosity observed.

## CONCLUSION

Despite the recent introduction of *S. madagascariensis* to the region studied, this species has been very effective in its dispersal and establishment in new environments. Just as Sindel *et al.* (1998) and Le Roux *et al.* (2009) reported exponential infestations after the introduction of *S. madagascariensis* in Australia and Hawaii, respectively, the expansion of this species in southern Brazil seems to be getting worse. This species is now dominant in open areas where 10 years ago it was not found. The genetic results presented here reinforce this idea.

The hairy diaspore of fireweed may be caught up in wind more easily than other anemochorous *Senecio* species (Sindel *et al.*, 1998). Thus, coupled with high seed production, continuous terrain, soils impoverished by drought and agronomical use, the ease of seed dispersal contributes to the rapid spread of *S. madagascariensis* in the Pampa biome. Genetic diversity of *S. madagascariensis* in the Pampa biome should be the result of multiple introductions related to shipping activities, whose source of origin is South Africa. However, further analysis using the same SSR loci with samples collected in South Africa should be undertaken in order to frame more accurate conclusions.

The considerable levels of genetic diversity in ITS and SSR data, gene flow determined through estimates of migrants, and moderate levels of inbreeding indicate that this species has great potential for successful establishment in new environments, such as that found with the Pampa biome. This species is quickly expanding

geographically and demographically and becoming a significant threat to native species and livestock production in this region.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Nelson J. R. Fagundes for help in the analyses, Priscilla M. Zamberlan for sequencing facilities and Fernando C. Karam for personal communications. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul; and Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## **REFERENCES**

Allendorf, F.W. & Lundquist, L.L. (2003) Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species. *Conservation Biology*, **17**, 24-30.

Abbott, R.J., Brennan, A.C., James, J.K., Forbes, D.G., Hegarty, M.J. & Hiscock S.J. (2009) Recent hybrid origin and invasion of the British Isles by a self-incompatible species, Oxford ragwort (*Senecio squalidus* L., Asteraceae). *Biological Invasions*, **11**, 1145-1158.

Baker, H.G. (1995) Aspects of the genecology of weeds. *Genecology and ecogeographic races* (ed. by A.R. Kruckeberg, R.B. Walker, and A.E. Leviton), pp. 189-224. Pacific Division of the American Association for the Advancement of Science, San Francisco.

Bandelt, H-J., Forster, P. & Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.

Barrett, S.C.H., Colautti, R.I. & Eckert, C.G. (2008) Reproductive systems and evolution during biological invasion. *Molecular Ecology*, **17**, 373-383.

Bjorkland, M.J. & Baker, A.J. (1996) The successful founder: genetics of introduced *Carduelis chloris* (greenfinch) populations in New Zealand. *Heredity*, **77**, 410-422.

Bossdorf, O., Lipowsky, A. & Prati, D. (2008) Selection of preadapted populations allowed *Senecio inaequidens* to invade Central Europe. *Diversity and Distributions*, **14**, 676-685

Buckler, E.S., Ippolito, A. & Holtsford, T.P. (1997) The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. *Genetics*, **145**, 821-832

Calzada, J.P.V., Crane, C.F. & Stelly, D.M. (1996) Botany - apomixis: the asexual revolution. *Science*, **274**, 1322-1323.

Chaneton, E.J. & Lavado, R.S. (1996) Soil nutrients and salinity after long-term grazing exclusion in a flooding Pampa grassland. *Journal of Range Management*, **49**, 182-187.

Chun, Y.J., Nason, J.D. & Moloney, K.A. (2009) Comparison of quantitative and molecular genetic variation of native vs. invasive populations of purple loosestrife (*Lythrum salicaria* L., Lythraceae). *Molecular Ecology*, **18**, 3020-3035.

Crawford, K.M. & Whitney, K.D. (2010) Population genetic diversity influences colonization success *Molecular Ecology*, **19**, 1253-1263.

Cruz, C.E.F., Karam, F.C., Dalto, A.C., Pavarini, S.P., Bandarra, P.M. & Driemeier, D. (2010) Fireweed (*Senecio madagascariensis*) poisoning in cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **30**, 10-12.

Desfeux, C. & Lejeune, B. (1996) Systematics of Euromediterranean *Silene* (Caryophyllaceae): evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequence. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, **319**, 351-358.

Dunn, I.S. & Blattner, F.R. (1987) Sharons 36 to 40: multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. *Nucleic Acids Research*, **15**, 2677-2698.

Durka, W., Bossdorf, O., Prati, D. & Auge, H. (2005) Molecular evidence for multiple introductions of garlic mustard (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae) to North America. *Molecular Ecology*, **14**, 1697-1706.

Ernst, W.H.O. (1998) Invasion, dispersal and ecology of the South African neophyte *Senecio inaequidens* in The Netherlands: from wool alien to railway and road alien. *Acta Botanica Neerlandica*, **47**, 131-151.

Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611-2620.

Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564-567.

Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.

Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. (2007) Inference of population STRUCTURE using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 574-578.

Feng, Y.-L., Li, Y.P., Wang, R.F., Callaway, R.M., Valiente-Banuet, A. & Inderjit (2011) A quicker return energy-use strategy by populations of a subtropical invader in the non-native range: a potential mechanism for the evolution of increased competitive ability. *Journal of Ecology*, **99**, 1116-1123.

Fu, Y.X. (1996) New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics*, **143**, 557-570.

Fuertes-Aguilar, J. & Nieto-Feliner, G. (2003) Additive polymorphisms and reticulation in an ITS phylogeny of thrifts (*Armeria*, Plumbaginaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **28**, 430-447

Ghabooli, S., Shiganova, T.A., Zhan, A., Cristescu, M.E., Eghtesadi-Araghi, P. & MacIsaac, H.J. (2010) Multiple introductions and invasion pathways for the invasive ctenophore *Mnemiopsis leidyi* in Eurasia. *Biological Invasions*, **13**, 679-690.

Genton, B.J., Shykoff, J.A. & Giraud, T. (2005) High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Molecular Ecology*, **14**, 4275-4285.

Goudet, J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> (accessed Nov 2011).

Harpending, H. (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, **66**, 591-600.

Kaluza, P., Kölzsch, A., Gastner, M.T. & Blasius, B. (2010) The complex network of global cargo ship movements. *Journal of the Royal Society Interface*, **7**, 1093-1103.

Keane, R.M. & Crawley, M.J. (2002) Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis, *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 164-170.

Keller, R.P., Drake, J.M., Drew, M.B. & Lodge, D.M. (2011) Linking environmental conditions and ship movements to estimate invasive species transport across the global shipping network. *Diversity and Distributions*, **17**, 93-102.

Lafuma, L., & Maurice, S. (2007) Increase in mate availability without loss of self-incompatibility in the invasive species *Senecio inaequidens* (Asteraceae). *Oikos*, **116**, 201-208.

Lachmuth, S., Durka, W. & Schurr, F.M. (2010) The making of a rapid plant invader: genetic diversity and differentiation in the native and invaded range of *Senecio inaequidens*. *Molecular Ecology*, **19**, 3952-3967.

Lavergne, S. & Molofsky, J. (2007) Increased genetic diversity and evolutionary potential drive the success of an invasive grass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 3883-3888.

Le Roux, J.J. & Wiczorek, A.M. (2006) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from fireweed, *Senecio madagascariensis* Poir. (Asteraceae). *Molecular Ecology Notes*, **7**, 327- 329.

Le Roux, J.J., Wiczorek, A.M., Ramadan, M.M. & Tran, C.T. (2006) Resolving the native provenance of invasive fireweed (*Senecio madagascariensis* Poir.) in the Hawaiian Islands as inferred from phylogenetic analysis. *Diversity and Distributions*, **12**, 694-702.

Le Roux, J.J., Wiczorek, A.M., Tran, C.T. & Vorsino, A. (2009) Disentangling the dynamics of invasive fireweed (*Senecio madagascariensis* Poir. species complex) in the Hawaiian Islands. *Biological Invasions*, **12**, 2251-2264.

Lee, C.E. (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 386-391.

Librado, P. & Rozas, J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452.

López-García, M.C. & Maillet, J. (2005) Biological characteristics of an invasive South African species. *Biological Invasions*, **7**, 181-194.

Lounibos, L. P. (2002) Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, **47**, 233-266.

Mäder, G., Zamberlan, P.M., Fagundes, N.J.R., Magnus, T., Salzano, F.M., Bonatto S.L. & Freitas, L.B. (2010) The use and limits of ITS data in the analysis of intraspecific variation in *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Genetics and Molecular Biology*, **33**, 99-108.

Matzenbacher, N.I. & Schneider, A.A. (2008) Nota sobre a presença de uma espécie adventiciada *Senecio* (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, **6**, 111-115.

McCullough, D.G., Work, T.T., Cavey, J.F., Liebhold, A.M. & Marshall D. (2006) Interceptions of nonindigenous plant pests at US ports of entry and border crossings over a 17-year period. *Biological Invasions*, **8**, 611-630.

Mooney, H.A. & Cleland, E.E. (2001) The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 5446-5451.

Murray, B.R. & Phillips, M.L. (2010) Investment in seed dispersal structures is linked to invasiveness in exotic plant species of south-eastern Australia. *Biological Invasions*, **12**, 2265-2275.

Nei, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.



- Nettel, A. & Dodd, R.S. (2007) Drifting propagules and receding swamps: genetic footprints of mangrove recolonization and dispersal along tropical coasts. *Evolution*, **61**, 958-71.
- Neuffer, B. & Hurka, H. (1999) Colonization history and introduction dynamics of *Capsella bursa-pastoris* (Brassicaceae) in North America: isozymes and quantitative traits. *Molecular Ecology*, **8**, 1667-1681.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr. & Deerfield, D.W. (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNET.news*, **4**, 14.
- Novak, S.J. (2007) The role of evolution in the invasion process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 3671-3672.
- Pelser, P.B., Gravendeel, B. & van der Meijden, R. (2003) Phylogeny reconstruction in the gap between too little and too much divergence: the closest relatives of *Senecio jacobaea* (Asteraceae) according to DNA sequences and AFLPs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**, 613-28.
- Pelser, P.B., Nordenstam, B., Kadereit, J.W. & Watson, L.E. (2007) An ITS phylogeny of Tribe Senecioneae (Asteraceae) and a new delimitation of *Senecio* L. *Taxon*, **56**, 1077-1104.
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J-M., Paetkau, D., Baudouin, L. & Estoup, A. (2004) GeneClass2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, **95**, 536-539.
- Prentis, P.J., Wilson, J.R., Dormontt, E.E., Richardson, D.M. & Lowe, A.J. (2008) Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science*, **13**, 288-294.
- Richardson, D.M., Pysek, P., Rejmanek, M., Barbour, M.G., Panetta, F.G. & West, C.J. (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions*, **6**, 93-107.

Rosenthal, D.M., Ramakrishnan, A.P. & Cruzan, M.B. (2008) Evidence for multiple sources of invasion and intraspecific hybridization in *Brachypodium sylvaticum* (Hudson) Beauv. in North America. *Molecular Ecology*, **17**, 4657-4669.

Roy, A., Frascaria, N., MacKay, J. & Bousquet, J. (1992) Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theoretical and Applied Genetics*, **85**, 173-180.

Sakai, A.K., Weller, S.G., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A., Baughman, S., Cabin, R.J., Cohen, J.E., Ellstrand, N.C., McCauley, D.E., O'Neil, P., Parker, I.M., Thompson, J.N. & Weller, S.G. (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **32**, 305-332.

Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Oesterheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M. & Wall, D.H. (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, **287**, 1770-1774.

Sax, D.F., Stachowicz, J.J., Brown, J.H., Bruno, J.F., Dawson, M.N., Gaines, S.D., Grosberg, R.K., Hastings, A., Holt, R.D., Mayfield, M.M., O'Connor, M.I. & Rice, W.R. (2007) Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**, 465-471.

Shriver, M.D., Jin, L., Chakraborty, R. & Boerwinkle E. (1993) VNTR allele frequency distributions under a stepwise mutation model: A computer simulation approach. *Genetics*, **134**, 983-993.

Sindel, B.M., Radford, I.J., Holtkamp, R.H. & Michael, P.W. (1998) *Senecio madagascariensis* Poir. The biology of Australian weeds. 33. *Plant Protection Quarterly*, **13**, 2-15.

Strauss, S.Y., Lau, J.A. & Carroll, S.P. (2006) Evolutionary responses of natives to introduced species: what do introductions tell us about natural communities? *Ecology Letters*, **9**, 354-371.

Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-595.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.

Vickery, P.D., Tubaro, P.L., Silva, J.M.C., Petterjohn, B.G., Herkert, J.R. & Cavalcanti, B. (1999) Conservation of grassland birds in the western hemisphere. *Studies in Avian Biology*, **19**, 2-26.

Yamaji, H., Fukuda, T., Yokoyama, J., Pak, J-H., Zhou, C-Z., Yang, C-S., Kondo, K., Morota, T., Takeda, S., Sasaki, H. & Maki, M. (2007) Reticulate evolution and phylogeography in *Asarum* sect. *Asiasarum* (Aristolochiaceae) documented in internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**, 863-884.

Young, A.G. & Murray, B.G. (2000) Genetic bottlenecks and dysgenic gene flow into re-established populations of the grassland daisy, *Rutidosia leptorrhynoides*. *Australian Journal of Botany*, **43**, 409-416.

## **BIOSKETCHES**

This research is part of a project using genetic techniques to improve our understanding about Brazilian plant species developed at the Laboratório de Evolução Molecular (LEM) - UFRGS. Geraldo Mäder is currently undertaking his PhD at the LEM, with a research focus on the population genetics, biogeography and environmental distribution of native and invasive plant species in South Brazil.

**Table 1** Genetic diversity and collection information for the *Senecio madagascariensis* populations sampled.

Population	Local information			Geographical coordinates	Voucher*	ITS	Microsatellite diversity					
	$n^1$	$n^2$	Collection site			Sequence types	$A$	$A_R$	$Ho$	$He$	$F_{IS}$	
P1	04	04	URU, San José, Delta del Tigre	34°45' 53"S/ 56°24' 25"W	166599	S3; S4	3.000	2.710	0.412	0.577	0.316	
P2	10	21	BRA, Porto Alegre	30°04' 01"S/51°07' 14"W	166600	S1-2; S6; S11-12	7.500	3.670	0.454	0.763	0.411	
P3	11	22	BRA, Nova Santa Rita	29°50' 45"S/51°16' 38"W	166601	S1-2; S6; S13; S17	8.125	3.477	0.377	0.731	0.490	
P4	08	12	BRA, Palmares do Sul	30°25' 37"S/50°30' 04"W	169680	S1-2; S20	4.000	2.726	0.584	0.626	0.071	
P5	07	33	BRA, Bagé	31°17' 57"S/54°04' 46"W	170944	S1; S14	8.250	3.451	0.534	0.711	0.252	
P6	18	24	BRA, Rio Grande, Povo Novo	31°56' 31"S/52°18' 39"W	166604	S1-2	5.875	2.937	0.352	0.652	0.465	
P7	13	21	BRA, Viamão	30°08' 15"S/50°52' 05"W	166605	S1-2	6.750	3.276	0.452	0.698	0.358	
P8	13	22	BRA, Capivari do Sul	30°08' 51"S/50°30' 31"W	166606	S1-2; S18	8.125	3.624	0.467	0.738	0.374	
P9	10	14	BRA, Glorinha	29°53' 25"S/50°42' 08"W	166607	S1-2	6.375	3.587	0.402	0.759	0.479	
P10	06	17	BRA, Osório	29°45' 05"S/50°12' 47"W	166608	S1-2; S19	6.125	3.313	0.477	0.710	0.337	
P11	08	26	BRA, Torres	29°18' 17"S/49°46' 21"W	169679	S1-2; S10	8.000	3.579	0.548	0.756	0.279	
P12	10	22	BRA, Eldorado do Sul	30°03' 58"S/51°33' 27"W	166602	S1-2; S7	7.500	3.337	0.597	0.722	0.177	
P13	04	18	BRA, Minas do Leão	30°08' 59"S/52°04' 18"W	170943	S1-2; S8	8.500	3.850	0.551	0.771	0.292	
P14	11	21	BRA, Barra do Ribeiro	30°25' 22"S/51°28' 03"W	166603	S1-2; S9	8.125	3.669	0.451	0.764	0.417	
P15	06	30	BRA, Cachoeira do Sul	30°16' 30"S/52°56' 13"W	166946	S1-2; S16	9.125	3.606	0.529	0.747	0.295	
<b>30</b>												
<b>Total</b>	<b>139</b>	<b>7</b>				<b>Average</b>	<b>7.025</b>	<b>3.387</b>	<b>0.479</b>	<b>0.715</b>	<b>0.334</b>	

Sample size ( $n^1$  = ITS data;  $n^2$  = SSR data); number of alleles per population ( $A$ ); allelic richness ( $A_R$ ); average observed heterozygosity across loci ( $He$ ); expected heterozygosity ( $Ho$ ) and fixation index ( $F_{IS}$ ). \*ICN Herbarium, Department of Botany, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**Table 2** Diversity and neutrality indices in *Senecio madagascariensis* by ITS data.

<i>Parameter</i>	<i>South America</i>	<i>Complete data set*</i>
Sample size	139	161
No. sequence types	19	25
$\pi$ (SD)	0.001 $\pm$ 0.001	0.002 $\pm$ 0.002
Genetic diversity (SD)	0.624 $\pm$ 0.02	0.763 $\pm$ 0.017
$F_{ST}$	0.146 ( $P < 0.001$ )	0.312 ( $P < 0.001$ )
Tajima's $D$	-1.79 ( $P < 0.05$ )	-1.86 ( $P < 0.05$ )
Fu's $F_s$	-17.67 ( $P < 0.02$ )	-23.18 ( $P < 0.02$ )

\* South America samples more sequences from South Africa (7); Swaziland (2);

Madagascar (8) and Hawaii (5);  $\pi$ = Nucleotide diversity; SD= Standard deviation.

**Table 3** Statistical comparison of allelic richness ( $A_R$ ), unbiased gene diversity ( $H_s$ ), observed heterozygosity ( $H_o$ ), inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) and levels of differentiation among populations ( $F_{ST}$ ) for the two genetic groups of *Senecio madagascariensis*.

	$n$	$A_R$	$H_s$	$H_o^*$	$F_{IS}^*$	$F_{ST}^*$
<b>Coastal group</b>	216	3.305	0.739	0.460	0.348	0.073
<b>Central group</b>	91	3.616	0.794	0.532	0.295	0.103

\* $P < 0.05$ .  $n$ =sample size.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1** Map of South America highlighting Rio Grande do Sul Brazilian state and Uruguay. Colored dots indicate all collected populations of *Senecio madagascariensis* Poir. included in this study. The different colors are related to the clusters identified by STRUCTURE and N-J dendrogram.

**Figure 2** Evolutionary relationships of *Senecio madagascariensis* Poir. based on ITS sequence types obtained by Median-joining network approach. Colors identify the geographic origin. Circle sizes are proportional to haplotype frequency. Crossed lines represent substitutions inferred in the branches.

**Figure 3** *Pairwise mismatch distribution* of South American samples. The mismatch distributions unimodal curve of the ITS sequences for *Senecio madagascariensis* Poir. populations in southern South America. Expected values under expanding population and constant population models are indicated as solid and dotted lines, respectively.  $P = 0.01$ , Harpending's raggedness index.

**Figure 4**  $P_k$  distribution of differences in repeat number among alleles averaged in a weighted fashion across eight loci in the *Senecio madagascariensis* Poir. samples.

**Figure 5** Relationship between geographical (km) and genetic ( $F_{ST}$ ) distances among all populations of *Senecio madagascariensis* Poir. included in this study by regression analysis ( $r^2 = 0.57$ ;  $P < 0.001$ ).

**Figure 6** STRUCTURE analysis of *Senecio madagascariensis* Poir. populations based on SSR data. Bars represent the membership coefficients (Q) of individual plants (307 total distributed in 15 populations), according their allele frequencies,  $K=2$ . Numbers on the horizontal axes correspond to the population numbers in Table 1.

**Figure 7** Unrooted Neighbor-Joining dendrogram based on the proportion of shared alleles distances obtained by SSR genotypes. The branch colors indicate the two groups inferred by the STRUCTURE software. Red: Central group. Green: Coastal group.

Arrows: first generation migrants among groups by estimates of dispersal in GeneClass2.

## **SUPPORTING INFORMATION**

**Figure S1** {*Senecio madagascariensis* forming dense populations in Bagé-BRA}



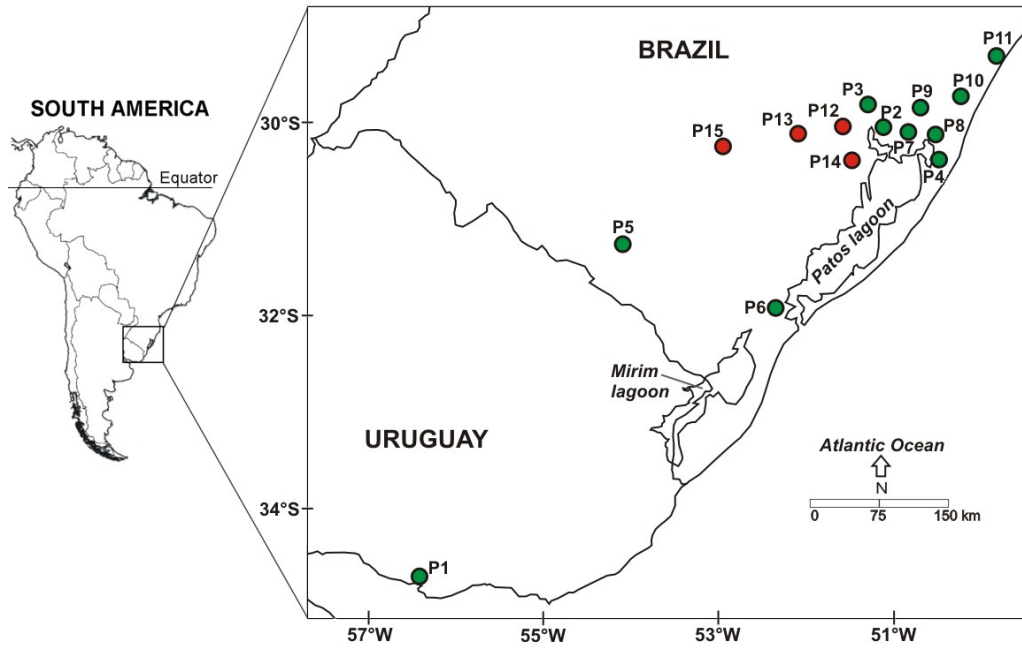


Figure 1

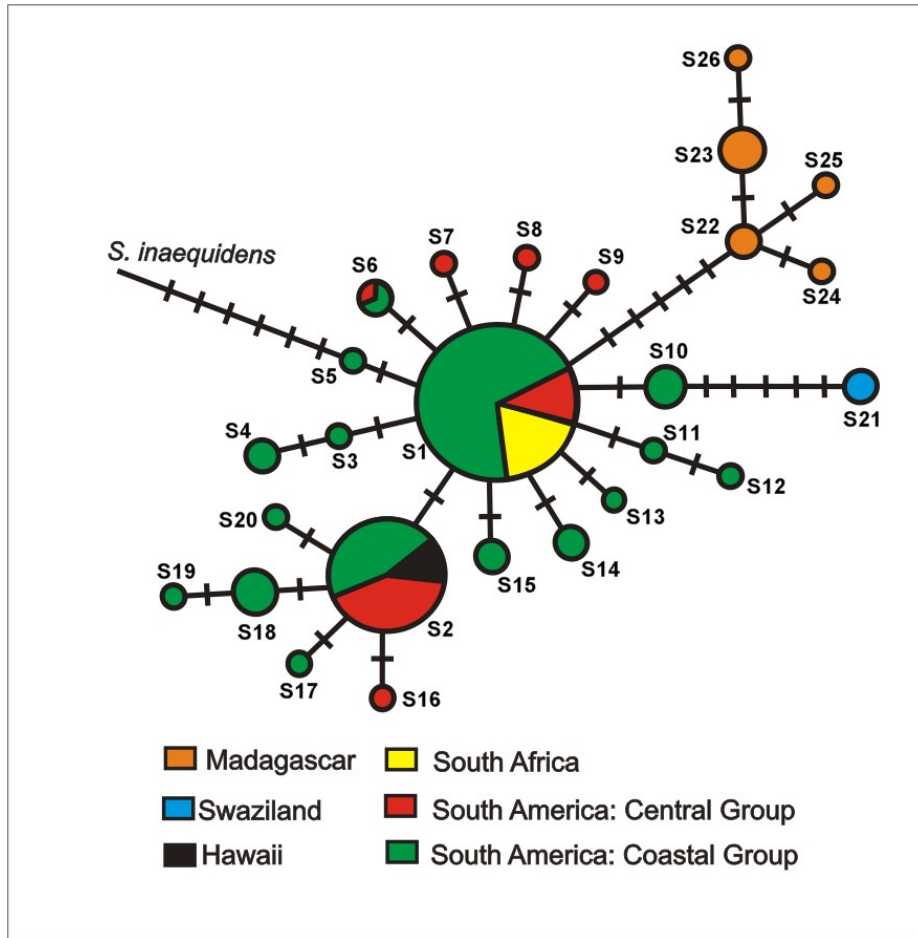
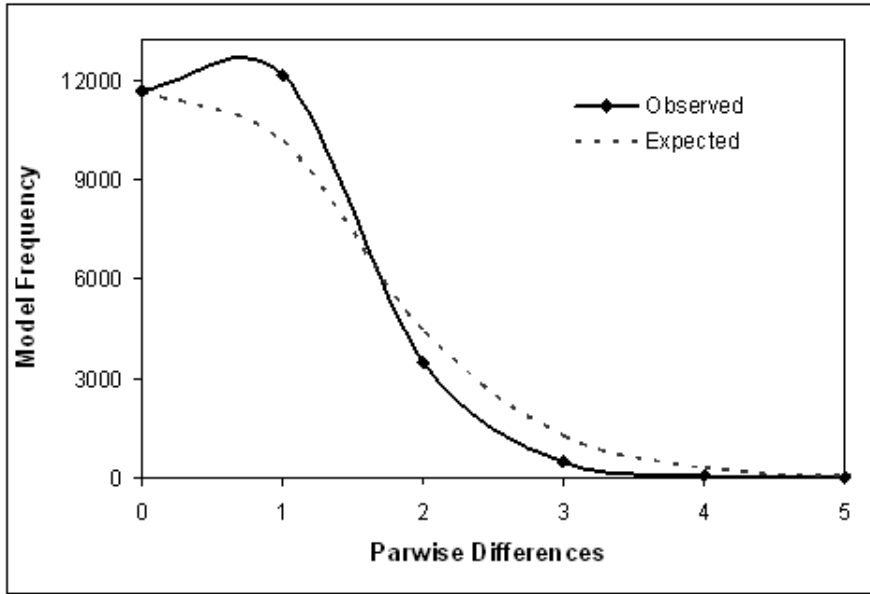
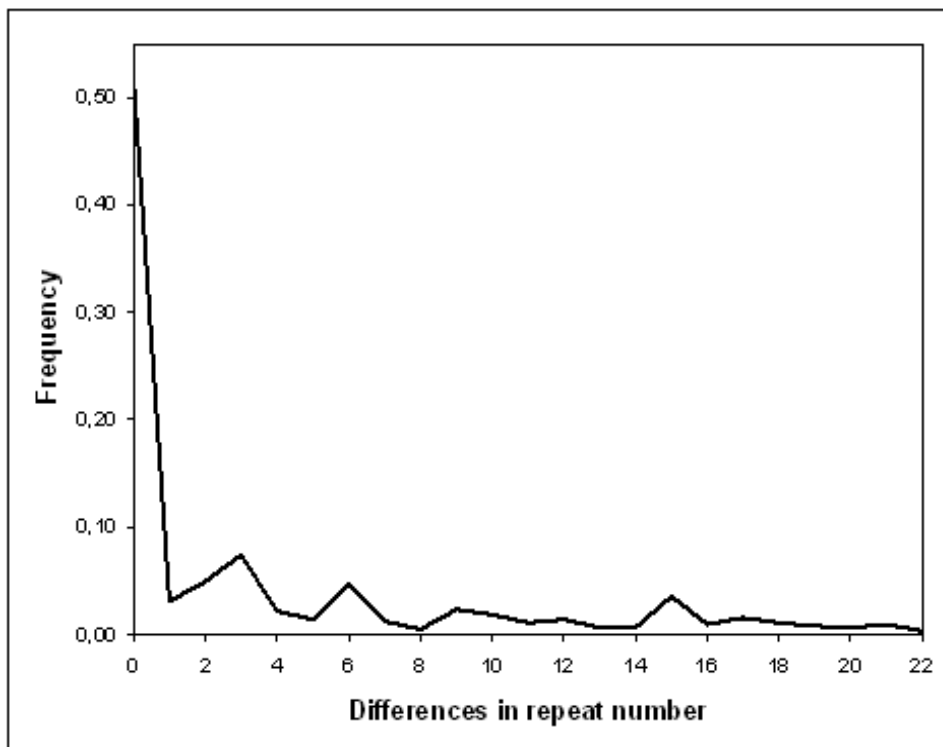


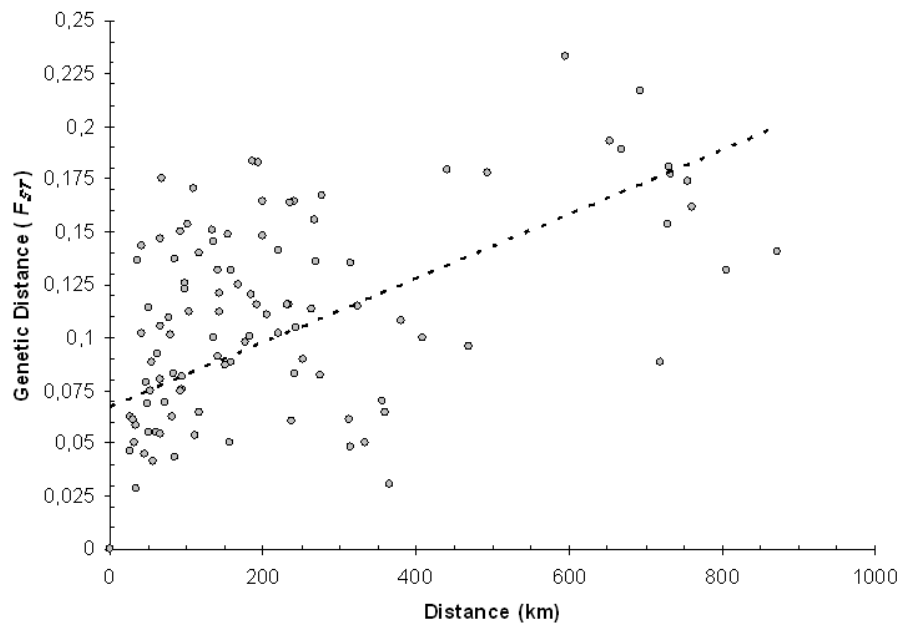
Figure 2



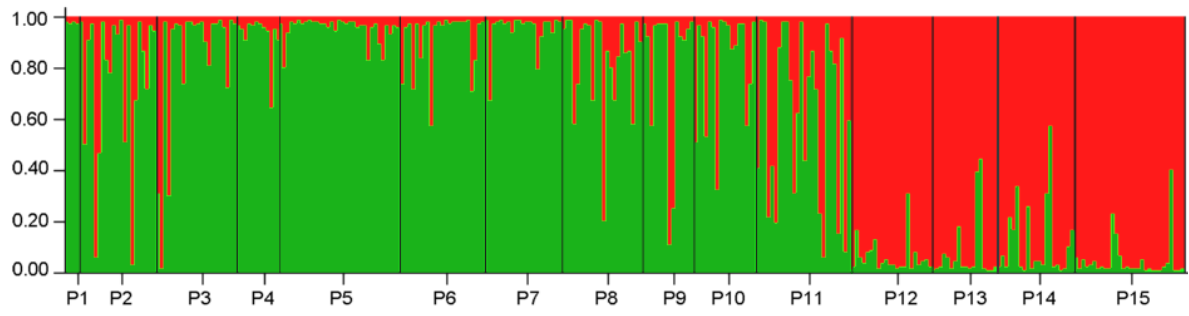
**Figure 3**



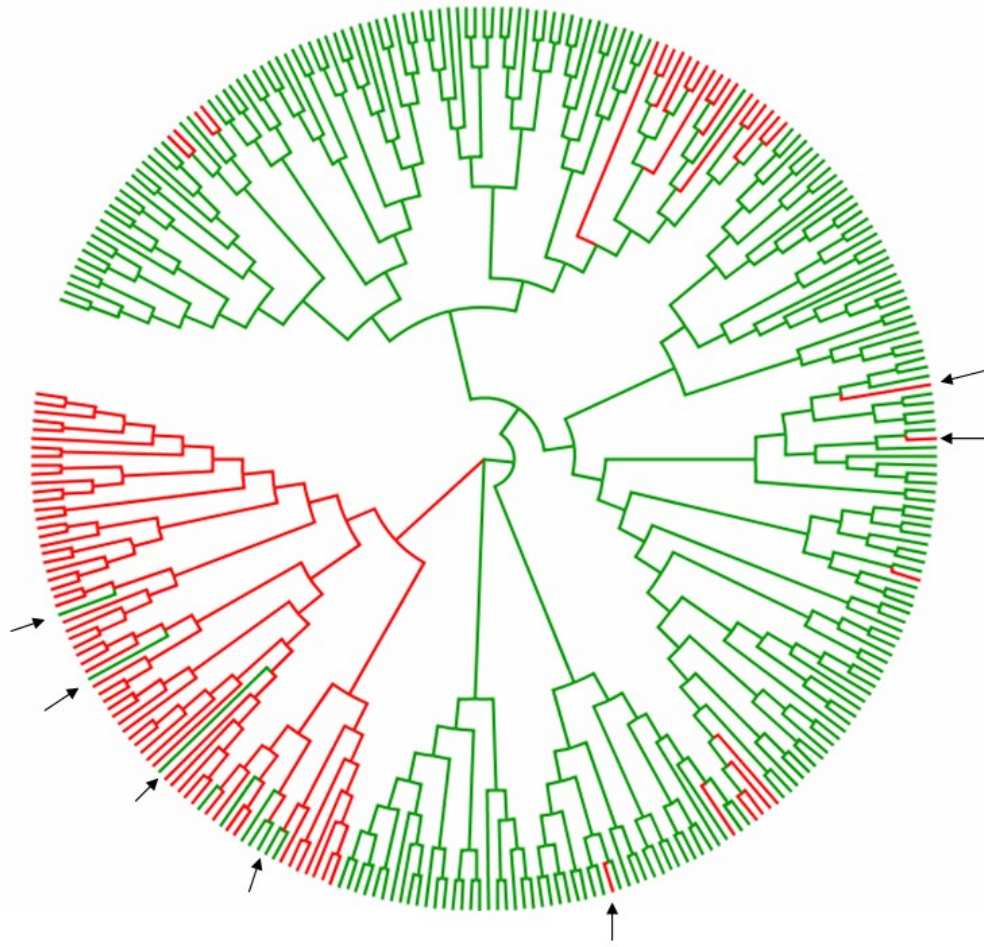
**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**



**Figure 7**



**Figure S1**



## **CAPÍTULO V**

### **ARTIGO 3**

**Manuscrito em preparação a ser submetido à revista *Acta Botânica Brasilica***

Taxonomia e posicionamento filogenético de duas espécies de *Senecio* (Asteraceae)  
naturais do bioma Pampa: *Senecio crassiflorus* e *Senecio ceratophylloides*

**Taxonomia e posicionamento filogenético de duas espécies de *Senecio* (Asteraceae)  
naturais do bioma Pampa: *Senecio crassiflorus* e *Senecio ceratophylloides***

Geraldo Mäder e Loreta Brandão de Freitas\*

*Laboratório de Evolução Molecular, Departamento de Genética, Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul, P.O. Box 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil.*

\*Autor para correspondência: Loreta B. Freitas, Departamento de Genética, UFRGS,  
P.O. Box 15053, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil; Tel.: 55 51 3308-6731; Fax: 55  
51 3308-9823; E-mail: loreta.freitas@ufrgs.br

## RESUMO

(Taxonomia e posicionamento filogenético de duas espécies de *Senecio* (Asteraceae) naturais do bioma Pampa: *Senecio crassiflorus* e *Senecio ceratophylloides*)

A família Asteraceae apresenta ampla distribuição geográfica, estando mais bem representada em regiões temperadas e subtropicais. O gênero *Senecio* L., um dos maiores de Asteraceae, tem sua classificação taxonômica considerada bastante complexa. Trabalhos anteriores têm mostrado grande dificuldade na delimitação das espécies. As causas dessa dificuldade podem ser: divergência filogenética recente, introgressão e plasticidade fenotípica. No sul da América do Sul, duas espécies de determinação taxonômica bastante complexa têm ocorrência associada às planícies arenosas do Pampa (Brasil, Argentina e Uruguai): *Senecio ceratophylloides* Griseb e *Senecio crassiflorus* (Lam.) DC com suas variedades. Neste estudo, foi realizada uma amostragem na região de sobreposição geográfica dessas espécies para, a partir de dados moleculares e medições morfológicas, investigar sua taxonomia e relacionamento evolutivo com as demais espécies do gênero *Senecio*. Foram coletadas 25 plantas em cada uma das 18 populações existentes e, através da medição de quatro características morfológicas, foi realizada uma análise de componentes principais. Além disso, para investigar a variabilidade genética dessas espécies e posicioná-las filogeneticamente no gênero foram seqüenciados os espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal (ITS) entre outros marcadores moleculares nucleares e plastidiais. Os táxons analisados apresentaram grande variação morfológica. Surpreendentemente, *S. crassiflorus* var. *maritimus* apresentou a distribuição da variação de seus caracteres morfológicos parcialmente sobreposta à de *S. ceratophylloides*. Esses resultados indicam que *S. crassiflorus* var. *maritimus* deve ser uma forma morfológica de *S. ceratophylloides*. Apesar dos esforços, não foi possível detectar variabilidade molecular entre *S.*

*ceratophylloides* e *S. crassiflorus*. As análises filogenéticas realizadas a partir das sequências de ITS apontaram *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus* como espécies próximas de *S. niveoaurous*, *S. volckmannii* e *S. chilensis*. Outras técnicas moleculares capazes de detectar variabilidade em uma escala mais fina devem ser empregadas com o objetivo de elucidar o relacionamento entre *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus*.

**Palavras-chave:** marcadores moleculares, variabilidade genética, variabilidade morfológica, Análise de Componentes Principais e plasticidade fenotípica.

## ABSTRACT

(Taxonomy and phylogenetic position of two *Senecio* species (Asteraceae) from Pampa biome: *Senecio crassiflorus* and *Senecio ceratophylloides*)

The Asteraceae wide distribution is mainly in temperate and subtropical regions. The genus *Senecio* L. (one of the most numerous in Asteraceae) has its taxonomic classification considered rather complex. Previous works have shown great difficulty in species delimitation. The causes this difficulty may be: recent phylogenetic divergence, introgression and phenotypic plasticity. In southern South America, two species of determination taxonomic very complex are associated with the sandy plains of the Pampa biome (Brazil, Argentina and Uruguay): *Senecio ceratophylloides* Griseb and *Senecio crassiflorus* (Lam.) DC with their two varieties. In this study, the sampling was conducted in the region of geographic overlap these species, from molecular and morphological data, to investigate its taxonomy and phylogenetic relationship with other species of *Senecio* genus. We collect samples of 25 plants in each of the eighteen living populations and through the measurement of four morphological features we performed a Principal Components Analysis. Furthermore, to investigate the genetic variability and phylogenetic position of these species in *Senecio* genus we sequenced

the internal transcribed spacers of ribosomal DNA (ITS) as well as other nuclear and plastid markers. The taxa analyzed showed large morphological variation. Surprisingly, by morphometric components, *S. crassiflorus* var. *maritimus* was more related to *S. ceratophylloides* than to *S. crassiflorus* var. *crassiflorus*. These results indicate that *S. crassiflorus* var. *maritimus* should be a morphological variant of *S. ceratophylloides*. Despite the efforts, we could not detect molecular variability between *S. ceratophylloides* and *S. crassiflorus*. Phylogenetic analyzes performed with ITS sequences showed *S. ceratophylloides* and *S. crassiflorus* as related to *S. niveoaureos*, *S. volckmannii* and *S. chilensis*. Others molecular techniques able to detect variation in a fine-scale shall be used to elucidate the relationship between *S. ceratophylloides* and *S. crassiflorus*.

**Keywords:** molecular markers, genetic variability, morphological variability, Principal Component Analysis and phenotypic plasticity.

## Introdução

Asteraceae (Compositae) é a maior família entre as Magnoliopsida (Dicotyledoneae), possuindo entre 24.000-30.000 espécies conhecidas, distribuídas em até 1.700 gêneros. Este grupo apresenta ampla distribuição geográfica, estando mais bem representado em regiões temperadas e subtropicais, com formações vegetais abertas. Cerca de 2.000 espécies pertencem à flora brasileira, sendo uma das famílias dominantes nos tipos de vegetação árida, semi-árida e montanhosa, porém muito pouco representada na floresta tropical úmida (Souza & Lorenzi 2008). Segundo Bremer (1994), a abundância de ocorrências e as bases filogenéticas indicam que o centro de origem de Asteraceae é a América do Sul. Asteraceae também pode ser dividida em quatro subfamílias (Barnadesioideae, Carduoideae, Cichorioideae e Asteroideae)

contendo no total 17 tribos. As maiores tribos em número de espécies e amplitude de distribuição são Astereae e Senecioneae. A distribuição cosmopolita da tribo Senecioneae sugere um desenvolvimento muito antigo sobre uma região bastante ampla, porém os ancestrais mais distantes na escala geológica parecem estar mais bem distribuídos na África e na América do Sul (Turner, 1977).

O gênero *Senecio* L. é o maior gênero de sua tribo (com aproximadamente 1.000 espécies) e tem sua classificação taxonômica considerada bastante complexa devido a este grande número de espécies e também pela ampla diversidade morfológica (Pelser *et al.* 2010). Em um estudo incluindo 186 espécies de *Senecio*, sequências dos espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear (ITS) foram utilizadas para reconstruir uma filogenia da tribo Senecioneae com o objetivo de propor uma nova delimitação do gênero, anteriormente considerado como polifilético (Pelser *et al.* 2007). No referido trabalho, observa-se a dificuldade na delimitação e relacionamento entre as espécies tanto pela ausência de variabilidade entre as sequências como pelos baixos valores de suporte observados ao longo dos ramos da filogenia.

Estudos genéticos de especiação têm mostrado que mutações em poucos genes podem ser responsáveis pelo isolamento reprodutivo e demais diferenças fenotípicas entre espécies próximas (Noor & Feder 2006). Quando a especiação ocorre em função de mutações em genes que contribuem para a evolução do isolamento reprodutivo, esses genes são denominados genes de especiação (Nosil & Schluter 2011).

As causas das dificuldades de delimitação de espécies em alguns grupos de plantas são consequência da falta de caracteres diagnósticos claros para sua determinação. Muitos processos evolutivos podem explicar este problema, incluindo divergência filogenética recente, introgressão e plasticidade fenotípica. Estes processos são geralmente considerados quando se tenta definir um complexo de espécies que não

apresentam claras diferenças morfológicas. Geralmente é indicado que seja examinado um conjunto de marcadores morfológicos e moleculares para entender melhor a história evolutiva das espécies (Duminil *et al.* 2012).

No sul da América do Sul, incluindo parte do Brasil, Uruguai e Argentina, duas espécies de determinação taxonômica bastante complexa têm ocorrência associada às planícies arenosas do Pampa: *Senecio crassiflorus* (Lam.) DC. que segundo Cabrera (1957) possui as variedades; *crassiflorus* (Malme) Cabr. (Fig. 1A) e *maritimus* (Fig. 1B), e *Senecio ceratophylloides* Griseb (Fig. 1C). *Senecio ceratophylloides* possui folhas inteiras ou tridentadas no ápice, com menos de 1,0 cm de largura, os capítulos podem aparecer solitários ou aos pares. A espécie possui acentuado polimorfismo foliar que resultou em diversas variações nomenclaturais de ordem taxonômica. Segundo Cabrera (1957), a razão de tanta variabilidade são as diferenças ambientais onde a planta se desenvolve. Esta espécie habita dunas, campos arenosos e pedregosos ao longo do Pampa, no estado do Rio Grande do Sul (Brasil), todo o Uruguai e parte da Argentina (Cabrera 1963). *Senecio crassiflorus* possui como características usadas na sua identificação folhas inteiras, trilobadas ou tridentadas nos ápices, com 1,0 cm ou mais de largura; tem de dois a cinco capítulos por corimbo. Essa espécie é descrita como endêmica das dunas do sul do Brasil, Uruguai e nordeste da Argentina (Cabrera 1963). As duas variedades de *S. crassiflorus* florescem e frutificam de setembro a novembro, diferem principalmente pela densa pilosidade em ambas as faces das folhas de *S. crassiflorus* var. *crassiflorus* quando comparadas com as de *S. crassiflorus* var. *maritimus*. Posteriormente, o mesmo Cabrera (1975) sinonimizou as duas variedades, entretanto alguns pesquisadores contestam esta alteração.

Neste estudo, foi realizada uma amostragem dos três táxons (*S. crassiflorus* var. *crassiflorus*, *S. crassiflorus* var. *maritimus* e *S. ceratophylloides*) na região de

sobreposição geográfica das suas distribuições. Em seguida, utilizamos dados moleculares (ITS e outros marcadores nucleares e plastidiais) e medições morfológicas para investigar as seguintes questões: 1) A variabilidade morfológica e molecular suporta a taxonomia atual? 2) Qual o posicionamento filogenético destas espécies no gênero *Senecio*?

## **Materiais e métodos**

O material analisado foi obtido através de coletas em campo. Foram coletadas 25 plantas em cada uma das 18 populações (seis de cada um dos táxons: *S. crassiflorus* var. *crassiflorus*, *S. crassiflorus* var. *maritimus* e *S. ceratophylloides*) ao longo da região onde os três táxons ocorrem em simpatria no Rio Grande do Sul (de Torres-RS até Balneário Pinhal-RS) (Tab.1, Fig. 2). As coordenadas geográficas dos locais de coleta foram obtidas através do sistema de posicionamento global (GPS) e de cada ponto foram confeccionadas exsicatas que estão depositadas no Herbário ICN, Departamento de Botânica, Instituto Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Além do número de capítulos por corimbo (X1), foi utilizado um paquímetro digital para obter as medidas, no campo, de outras três características morfológicas usadas por Cabrera (1963) e Matzenbacher (1998) na determinação dos táxons: o comprimento do involúcro floral (X2), o grau de pilosidade (X3), e o diâmetro foliar (X4) (Tab. 2). Para avaliar as características morfológicas descritas, medimos as flores e a folha mais basal de três diferentes ramos de cada planta e calculamos sua média. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para as quatro medidas (X1 a X4) utilizando uma matriz de correlação, e os dois componentes principais foram traçados para avaliar a dispersão dos dados. Resultados dessa análise também foram utilizados em uma análise de agrupamento *K-means* assumindo dois ou três grupos, que



visam encontrar as discontinuidades mais significativas nos dados, sem uma informação *a priori* sobre os táxons propostos. As análises de PCA e *K*-means foram realizadas através do software XLSTAT 2.02 ([www.xlstat.com](http://www.xlstat.com)).

As folhas coletadas, armazenadas em sílica gel para completa dessecação, foram pulverizadas manualmente com nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo. O DNA foi extraído pela técnica de Roy *et al.* (1992) e os produtos de extração foram testados através de eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com GelRed<sup>TM</sup>. Em uma análise preliminar para testar a variabilidade de marcadores moleculares foram selecionadas de 3-6 amostras de cada um dos táxons, representando extremos de distribuição e morfologia das populações estudadas, totalizando 36 amostras. Os marcadores moleculares inicialmente escolhidos foram os espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal nuclear (ITS1 e ITS2), os quais foram amplificados com iniciadores e protocolos descritos por Desfeux & Lejeune (1996). Posteriormente, outros marcadores de sequência foram incluídos na análise. Nucleares: GAPdH (Vaezi & Brouillet 2009), *CesA* e QG8140 (Álvarez *et al.* 2008); Plastidiais: *trnH-psbA* (Sang *et al.* 1997), *trnC-ycf6*, *rpS16* e *trnS-trnfM* (Shaw *et al.* 2005), *rps16-trnk*, *atpI-atpH* e *rpl32-trnL* (Shaw *et al.* 2007).

Antes do sequenciamento, as os produtos de amplificação foram purificados com polietilenoglicol (PEG, 20%) pela técnica de Dunn & Blatner (1987). O sequenciamento do DNA foi realizado em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences – GE Health Care), seguindo os protocolos que acompanham o aparelho e o *DYEnamic<sup>TM</sup>ET terminator sequencing premix kit*, com marcação terminal fluorescente, de acordo com as especificações do fabricante. As sequências foram alinhadas e

corrigidas manualmente, quando necessário, com auxílio do programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas 1997).

Para análises visando o posicionamento dos taxa estudados dentro do gênero *Senecio* foi realizada uma análise de similaridade de sequências de ITS através do BLAST (NCBI). A partir dessa análise, pudemos perceber o íntimo relacionamento de *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus* com espécies presentes no ramo *new world senecio clade 2* de Pelsler *et al.* (2007). Então, utilizamos as sequências de ITS de espécies pertencentes a esse clado obtidas no GenBank (EF538178, EF538313, EF538334, EF538347, EF538361, EF538374, EF538390, EF538391, EF538393 e EF538395), além das sequências de *S. madagascariensis*, *S. sylvaticus*, *S. lividus* e *S. flavus* (JQ654060, AF459928, AJ400795 e AF457414) usadas como grupo externo. Para a construção das árvores filogenéticas foram utilizados os métodos de Neighbor-Joining (NJ), Máxima Verossimilhança (ML) e inferência Bayesiana.

As probabilidades a priori das frequências dos nucleotídeos, o modelo para variação das taxas de substituição entre os sítios e o número de tipos de substituição para cada conjunto de dados foram estimados com o auxílio de dois programas. Nas reconstruções filogenéticas pelos métodos de NJ e ML foi usado o programa jModeltest 0.1.1 (Posada 2008). Para as inferências Bayesianas foram utilizados modelos determinados com auxílio do programa MrModeltest (Nylander 2004). A análise de NJ foi realizada no programa PAUP\* versão 4.0 (Swofford 1998) para Windows. Foram realizadas 1000 replicações de bootstrap (Felsenstein 1985). A análise de ML foi realizada no programa PhyML (Guindon & Gascuel 2003), com árvore inicial gerada pelo método de NJ, com 1000 replicações de bootstrap para cada análise. As reconstruções através de inferência Bayesiana (*Yule tree prior*) foram realizadas no programa Beast v1.6.1 (Drummond & Suchard 2010). Foram utilizadas duas cadeias de

Markov - Monte Carlo (MCMC) com 10 milhões de gerações em cada análise. As árvores foram amostradas a cada 100 gerações com *burn-in* de 10%.

## Resultados e Discussão

Na Fig. 3 é apresentada a distribuição da variação encontrada entre as medidas X1 a X4 foram consideradas, através da análise de componentes principais. Os dois componentes principais foram responsáveis por 85 % de variação total (PC1: 72 %, PC2: 13 %). Os taxa analisados apresentaram grande variação morfológica e os caracteres morfológicos diagnósticos usados para a classificação atual não se mostraram eficazes. Dentre os caracteres que não refletiram a classificação vigente dos taxa destacam-se: 46% das plantas de *S. crassiflorus* var. *maritimus* apresentaram número de capítulos inferior ao esperado (apenas 1, no lugar dos 2-5 esperados) e 86% apresentaram diâmetro foliar inferior a 1 cm (quando o esperado era > 1 cm).

Surpreendentemente *S. crassiflorus* var. *maritimus* apresentou a distribuição da variação de seus caracteres morfológicos parcialmente sobreposta à da espécie *S. ceratophylloides*. Entretanto, *S. crassiflorus* var. *maritimus* apresentou valores mais baixos para PC2 quando comparado a *S. ceratophylloides*, cujo componente de maior contribuição é a pilosidade (57,8%). A análise de *K-means* não suportou a divisão do conjunto de dados em três agrupamentos, mas sim em dois, agrupando *S. crassiflorus* var. *maritimus* e *S. ceratophylloides* em um grupo (A) e *S. crassiflorus* var. *crassiflorus* no outro (B) (conforme indicado na Fig. 3). Esses resultados sugerem que *S. crassiflorus* var. *maritimus* deva ser uma forma morfológica de *S. ceratophylloides*, resultado da grande plasticidade fenotípica apresentada por este taxon. Embora Cabrera (1957) tenha separado *S. crassiflorus* em duas variedades, ele também destacou a grande variabilidade morfológica encontrada nesta espécie.

No campo, verificamos que as populações de *S. ceratophylloides* ocorrem em terrenos arenosos e dunas secundárias, ao contrário das duas variedades de *S. crassiflorus*, que são mais comumente encontradas nas dunas primárias, próximas à faixa de praia. Essa diferença no habitat, com variações no sistema de drenagem e salinidade do solo, pode ser responsável pela grande variabilidade apresentada por indivíduos de *S. ceratophylloides*. Com isso, a classificação da variedade *maritimus* não se justifica e, na verdade, as populações aqui apresentadas são variantes morfológicas de *S. ceratophylloides*, identificadas devido à plasticidade presente também nesta espécie, cujos indivíduos apresentam polimorfismos morfológicos em função da adaptação às condições ambientais. A plasticidade morfológica de plantas que habitam ambientes costeiros e salinos já foi relatada por diversos autores (García-Mora *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 2008; Rewald *et al.*, 2012).

Apesar dos esforços empregados utilizando diferentes marcadores moleculares, plastidiais e nucleares, descritos previamente como de alto polimorfismo em outras espécies, inclusive em Asteraceae, não foi detectada variabilidade genética entre as espécies *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus*. Diversos trabalhos relatam a dificuldade de delimitação de espécies do gênero *Senecio* através de sequenciamento de DNA (Comes & Abbott 2001; Pelsner *et al.* 2004, 2010; Álvarez *et al.* 2008).

A dificuldade na detecção de variabilidade molecular, contrastando com uma consistente diferenciação fenotípica, pode indicar a existência de processos de especiação recente, servindo de explicação para o fato de marcadores neutros não refletirem a diferenciação entre as espécies (Noor & Feder 2006; Duminil *et al.* 2012). As diferenças fenotípicas observadas entre *S. crassiflorus* e *S. ceratophylloides* devem ser resultado da ação de forte seleção natural sobre genes de especiação.

Análises de similaridade de sequências relacionaram *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus* ao clado denominado *new world clade 2* de Pelsner *et al.* (2007). Como estes autores já haviam observado, diversos ramos apresentaram baixa confiabilidade no relacionamento entre as espécies deste clado. No entanto, as três metodologias aqui empregadas [NJ (Fig. 4), ML (Fig. 5) e Bayesiana (Fig. 6)] foram eficazes em apontar *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus* como espécies próximas de *S. niveoaurus*, *S. volckmannii* e *S. chilensis*. A primeira destas é de distribuição nativa em regiões de cordilheiras do norte da América do Sul (preferencialmente Colômbia) e as duas últimas são distribuídas no sul da América do Sul (Chile e Argentina) (The International Plant Names Index, 2012).

Outras técnicas moleculares capazes de detectar variabilidade em uma escala mais específica, como microssatélites e AFLP, devem ser empregadas com o objetivo de elucidar o relacionamento entre *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus* e ainda resolver quaisquer dúvidas sobre as variáveis morfológicas das espécies. Além disso, experimentos de cultivo em diferentes condições ambientais devem ser empregados para verificar a constância das distintas morfologias e sua variação em consequência do ambiente. Quanto às inferências filogenéticas, mais espécies, preferencialmente sulamericanas, devem ser incluídas nas análises com o objetivo de melhorar a resolução das árvores obtidas. Embora tenha levantado diversas questões que necessitam de mais experimentação, este trabalho tem por mérito constituir uma primeira abordagem molecular para as questões evolutivas e taxonômicas destas taxa.

## **Agradecimentos**

Este projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Especial em Taxonomia (CNPq/MCT/CAPES), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## **Referências bibliográficas**

- Álvares, I., Costa, A., & Feliner, G.N. 2008 Selecting single-copy nuclear genes for plant phylogenetics: a preliminary analysis for the Senecioneae (Asteraceae). **Journal of Molecular Evolution** **66**: 276-291.
- Bremer, K. 1994. **Asteraceae: cladistics and classification**. Portland, Timber Press.
- Cabrera, A.L. 1957. **El Género *Senecio* (Compositae) en Brasil, Paraguay y Uruguay**. Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, v.15.
- Cabrera, A.L. 1963. **Flora de la provincia de Buenos Aires**. Compuestas. Buenos Aires, Colecion Cientifica del INTA, v.4.
- Cabrera, A.L. & Klein, R.M. 1975. **Compostas 2, Tribo: Senecioneae. Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues.
- Comes, H.P. & Abbott, R.J. 2001. Molecular phylogeography, reticulation, and lineage sorting in Mediterranean *Senecio* sect. *Senecio* (Asteraceae). **Evolution** **55**: 1943-1962.
- Desfeux, C. & Lejeune, B. 1990. Systematics of Euromediterranean *Silene* (Caryophyllaceae): evidence from a phylogenetic analysis using ITS sequence. **Comptes Rendus de L'Academie des Sciences de Paris - Life Sciences** **319**: 351-358.

- Drummond, A.J. & Suchard, M.A. .2010. Bayesian random local clocks or one rate to rule them all. **BMC Biology** **8**: 114.
- Duminil, J., Kenfack, D., Viscosi, V., Grumiau, L. & Hardy, J.H. 2012. Testing species delimitation in sympatric species complexes: The case of an African tropical tree, *Carapa* spp. (Meliaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution** **62**: 275-285.
- Dunn, I.S. & Blattner, F.R. 1987. Sharons 36 to 40: Multi-enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers. **Nucleic Acids Research** **15**: 2677-2698.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** **39**: 783-791.
- García-Mora, M.R., Gallego-Fernández, J.B. & García-Novo, F. 1999. Plant functional types in coastal foredunes in relation to environmental stress and disturbance. **Journal of Vegetation Science** **10**: 27-34.
- Guindon, S. & Gascuel, O. 2003. PhyML – A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology** **52**: 696-704.
- Matzenbacher, N.I. (1998) **O complexo "Senecionoide" (Asteraceae-Senecioneae) no Rio Grande do Sul - Brasil**. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Nicholas, K.B. & Nicholas, H.B.J. .1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequences alignments. [www.psc.edu/biomed/genedoc](http://www.psc.edu/biomed/genedoc).
- Noor, M.A.F. & Feder, J.L. 2006. Speciation genetics: evolving approaches. **Nature Reviews Genetics** **7**: 851-861.
- Nosil, P. & Schluter, D. 2011. The genes underlying the process of speciation. **Trends in Ecology & Evolution** **26**(4): 160-167.

- Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Programa distribuído pelo autor. Evolutionary Biology Center, Uppsala University. [www.abc.se/~nylander](http://www.abc.se/~nylander).
- Pelser, P.B., Nordenstam, B., Kadereit, J.W. & Watson, L.E. 2007. An ITS phylogeny of tribe Senecioneae (Asteraceae) and a new delimitation of *Senecio* L. **Taxon** **56**(4): 1077-1104.
- Pelser, P.B., Van den Hof, K., Gravendeel, B. & Van der Meijden, R. 2004. The systematic value of morphological characters in *Senecio* sect. *Jacobaea* (Asteraceae) as compared to DNA sequences. **Systematic Botany** **29**: 790-805.
- Pelser, P.B., Kennedy, A.H., Tepe, E.J., Shidler, J.B., Nordenstam, B., Kadereit, J.W. & Watson, L.E. 2010. Patterns and causes of incongruence between plastid and nuclear Senecioneae (Asteraceae) phylogenies. **American Journal of Botany** **97**(5): 856-873.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution** **25**: 1253-1256.
- Rewald, B., Raveh, E., Gendler, T., Ephrath, J.E. & Rachmilevitch, S. 2012. Phenotypic plasticity and water flux rates of Citrus root orders under salinity. **Journal of Experimental Botany** doi:10.1093/jxb/err457.
- Richards, C.L., Walls, R.L.; Bailey, J.P., Parameswaran, R., George, T. & Pigliucci, M. 2008. Plasticity in salt tolerance traits allows for invasion of novel habitat by Japanese knotweed s. l. (*Fallopia japonica* and *F.xbohemica*, Polygonaceae). **American Journal of Botany** **95**(8):931-42.
- Roy, A., Frascaria, N., MacKay, J. & Bousquet, J. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. **Theoretical and Applied Genetics** **85**: 173-180.



- Sang, T., Crawford, D.J. & Stuessy, T.F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). **American Journal of Botany** **84**: 1120-1136.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E. & Small, R.L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **American Journal of Botany** **92**: 142-166.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E. & Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetics studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. **American Journal of Botany** **94**: 275-288.
- Souza, V.C. & Lorenzi, H. 2008. **Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 704p., il.
- Swofford, D.L. 1998. PAUP\* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and others methods) Version 4. Sunderland, Sinauer Associates, 554 pp.
- The International Plant Names Index. 2012. Published on the Internet [www.ipni.org](http://www.ipni.org).
- Turner, B.L. 1977. Fossil history geography. In: *The Biology and Chemistry of Compositae* (Heywood, K.H.; Harbone, J.B. & Turner, B.L.; eds.). Vol. 2. Academic Press, London.
- Vaezi, J. & Brouillet, L. 2009. Phylogenetic relationships among diploid species of *Symphytotrichum* (Asteraceae: Astereae) based on two nuclear markers, ITS and GAPDH. **Molecular Phylogenetics and Evolution** **51**: 540-553.

## Tabelas

**Tabela 1:** Informações de coleta

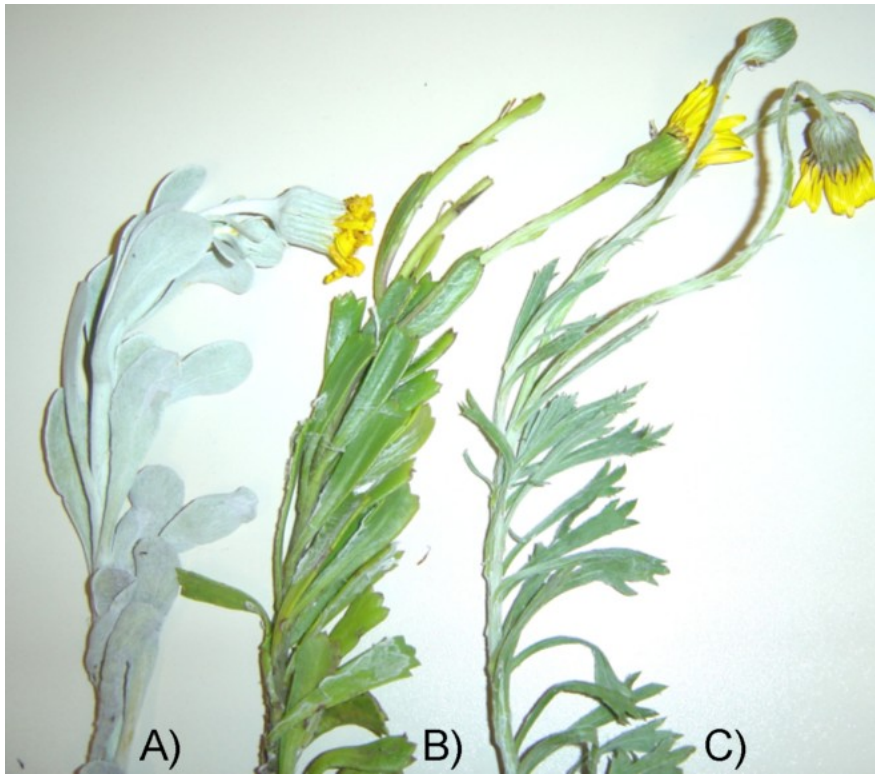
<i>Populações</i>	<i>Localidade</i>	<i>Coordenadas geográficas</i>	<i>Voucher</i>
<i>Senecio</i> <i>ceratophylloides</i>	<b>E1</b>	Santo Antônio da Patrulha-RS	29° 54' 52" S / 50° 25' 25" O
	<b>E2</b>	Praia Azul, Arroio do Sal-RS	29° 28' 10" S / 49° 50' 05" O
	<b>E3</b>	Capão Novo, Capão da Canoa-RS	29° 40' 58" S / 49° 59' 23" O
	<b>E4</b>	Atlântida Sul, Osório-RS	29° 52' 17" S / 50° 05' 01" O
	<b>E5</b>	Tramandaí-RS	30° 01' 06" S / 50° 09' 08" O
	<b>E6</b>	Cidreira-RS	30° 14' 29" S / 50° 14' 39" O
<i>Senecio crassiflorus</i> <i>var. maritimus</i>	<b>M1</b>	Torres-RS	29° 21' 54" S / 49° 44' 31" O
	<b>M2</b>	Praia Azul, Arroio do Sal-RS	29° 28' 25" S / 49° 49' 31" O
	<b>M3</b>	Capão Novo, Capão da Canoa-RS	29° 40' 39" S / 49° 50' 02" O
	<b>M4</b>	Atlântida Sul, Osório-RS	29° 52' 31" S / 50° 04' 20" O
	<b>M5</b>	Tramandaí-RS	30° 01' 19" S / 50° 08' 25" O
	<b>M6</b>	Balneário Pinhal-RS	30° 18' 15" S / 50° 15' 22" O
<i>Senecio crassiflorus</i> <i>var. crassiflorus</i>	<b>R1</b>	Torres-RS	29° 21' 54" S / 49° 44' 31" O
	<b>R2</b>	Praia Azul, Arroio do Sal-RS	29° 28' 25" S / 49° 49' 31" O
	<b>R3</b>	Capão Novo, Capão da Canoa-RS	29° 40' 39" S / 49° 50' 02" O
	<b>R4</b>	Atlântida Sul, Osório-RS	29° 52' 31" S / 50° 04' 20" O
	<b>R5</b>	Tramandaí-RS	30° 01' 19" S / 50° 08' 25" O
	<b>R6</b>	Balneário Pinhal-RS	30° 18' 15" S / 50° 15' 22" O

**Tabela 2:** Medidas morfológicas utilizadas na distinção dos táxons.

<b>Táxon</b>	<b>X1</b>	<b>X2</b>	<b>X3</b>	<b>X4</b>
<i>Senecio ceratophylloides</i>	1-2	12-15 cm	Tomentosas a laxamente tomentosas	≤ 1 cm
<i>Senecio crassiflorus</i> var. <i>maritimus</i>	2-5	15-16 cm	Glabras a laxamente tomentosas	≥ 1cm
<i>Senecio crassiflorus</i> var. <i>crassiflorus</i>	2-5	17-20 cm	Densamente tomentosas	≥ 1cm

X1: Número de capítulos por corimbo. X2: Comprimento do involúcro. X3: Pilosidade foliar (glabra=0; laxamente tomentosa=1; tomentosa=2; densamente tomentosa=3). X4: Diâmetro foliar.

## Figuras



**Figura 1.** Detalhes dos ramos férteis de plantas dos taxa analisados, em **A)** Ramo de *S. crassiflorus* var *crassiflorus*; **B)** Ramo de *S. crassiflorus* var. *maritimus* e **C)** Ramo de *S. ceratophylloides*.

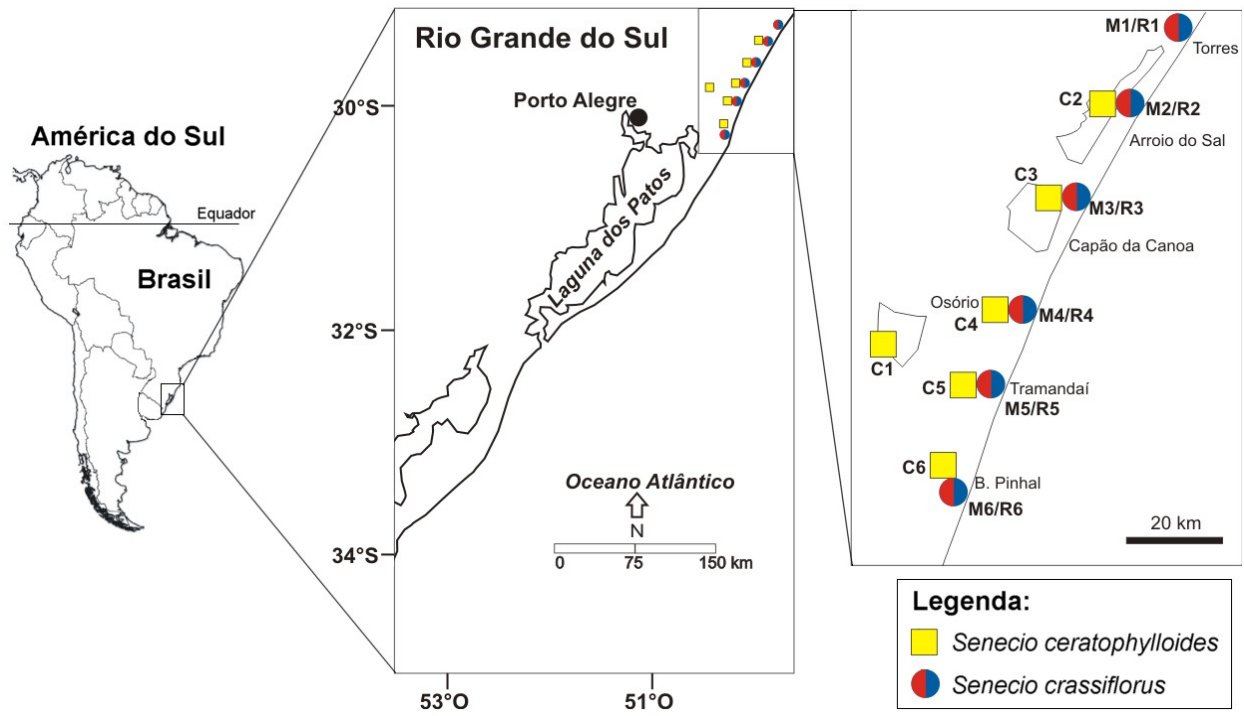
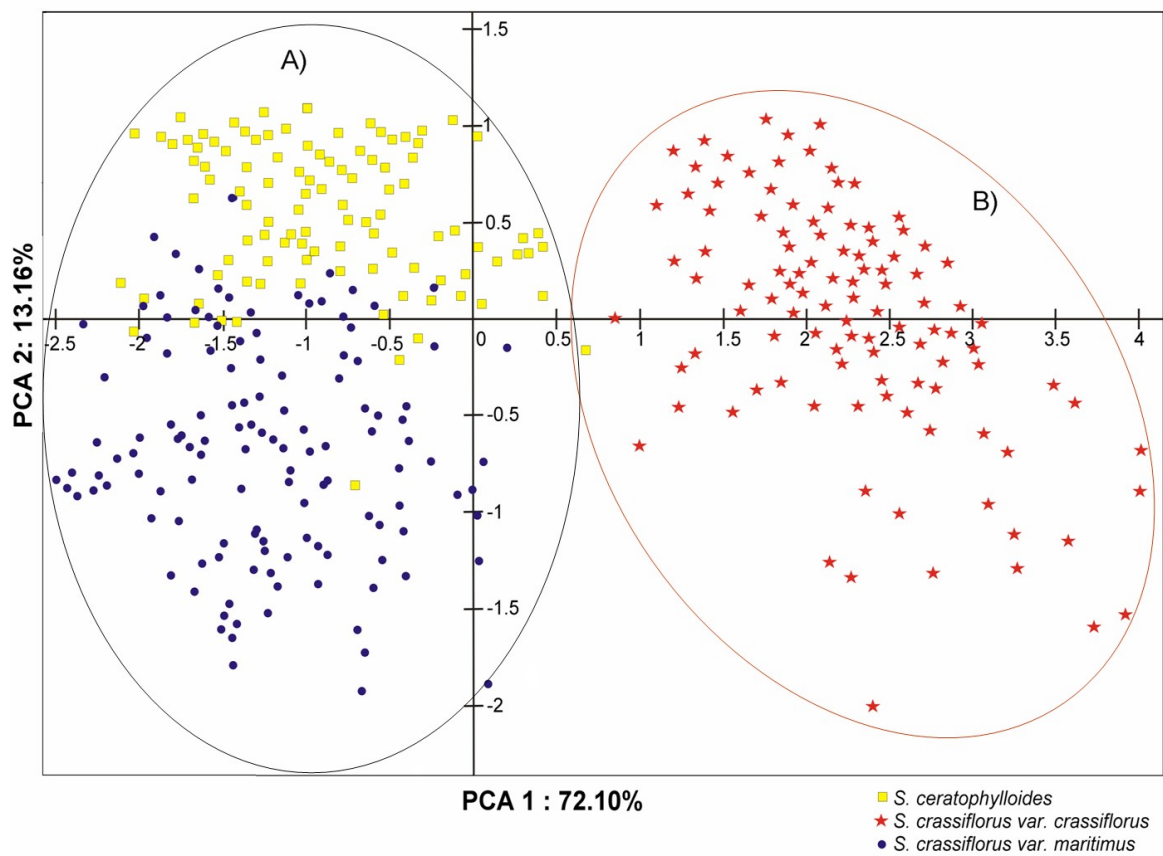
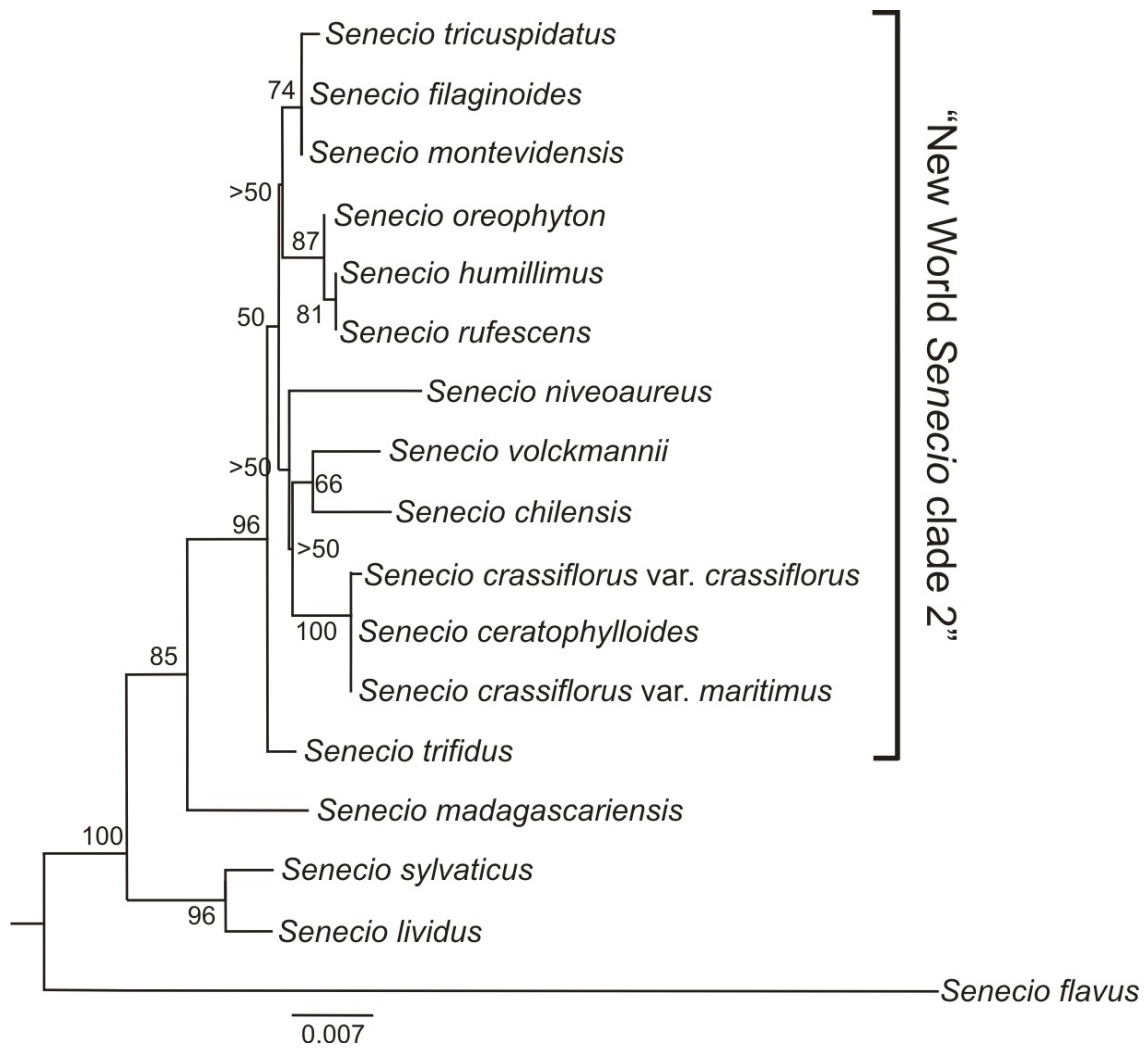


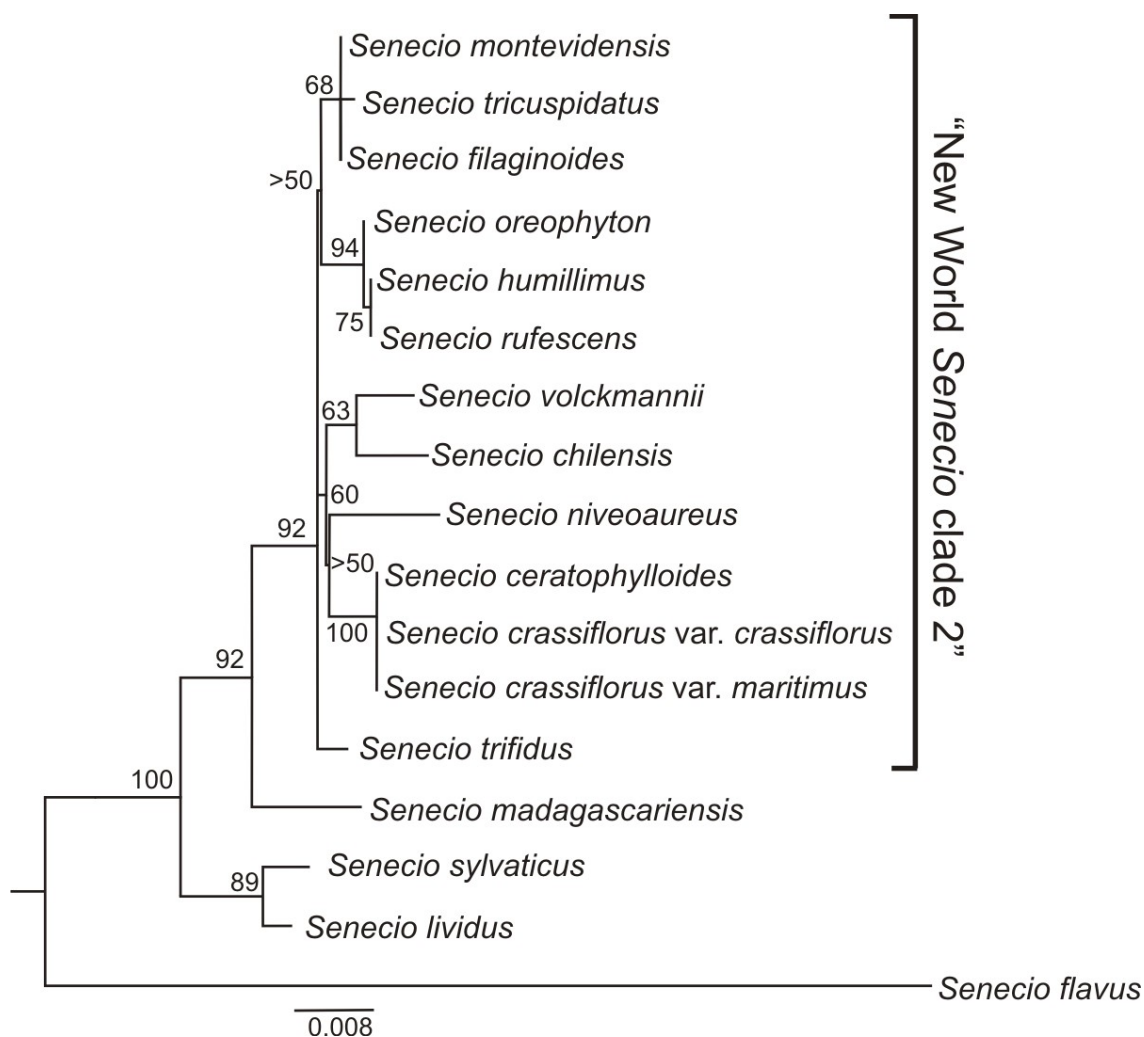
Figura 2. Distribuição dos pontos de coleta de *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus*.



**Figura 3.** Análise de componentes principais através de medidas morfológicas. A) agrupamento inferido pelo método de K-means unindo indivíduos de *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus* var. *maritimus*. B) Agrupamento das amostras de *S. crassiflorus* var. *crassiflorus*.

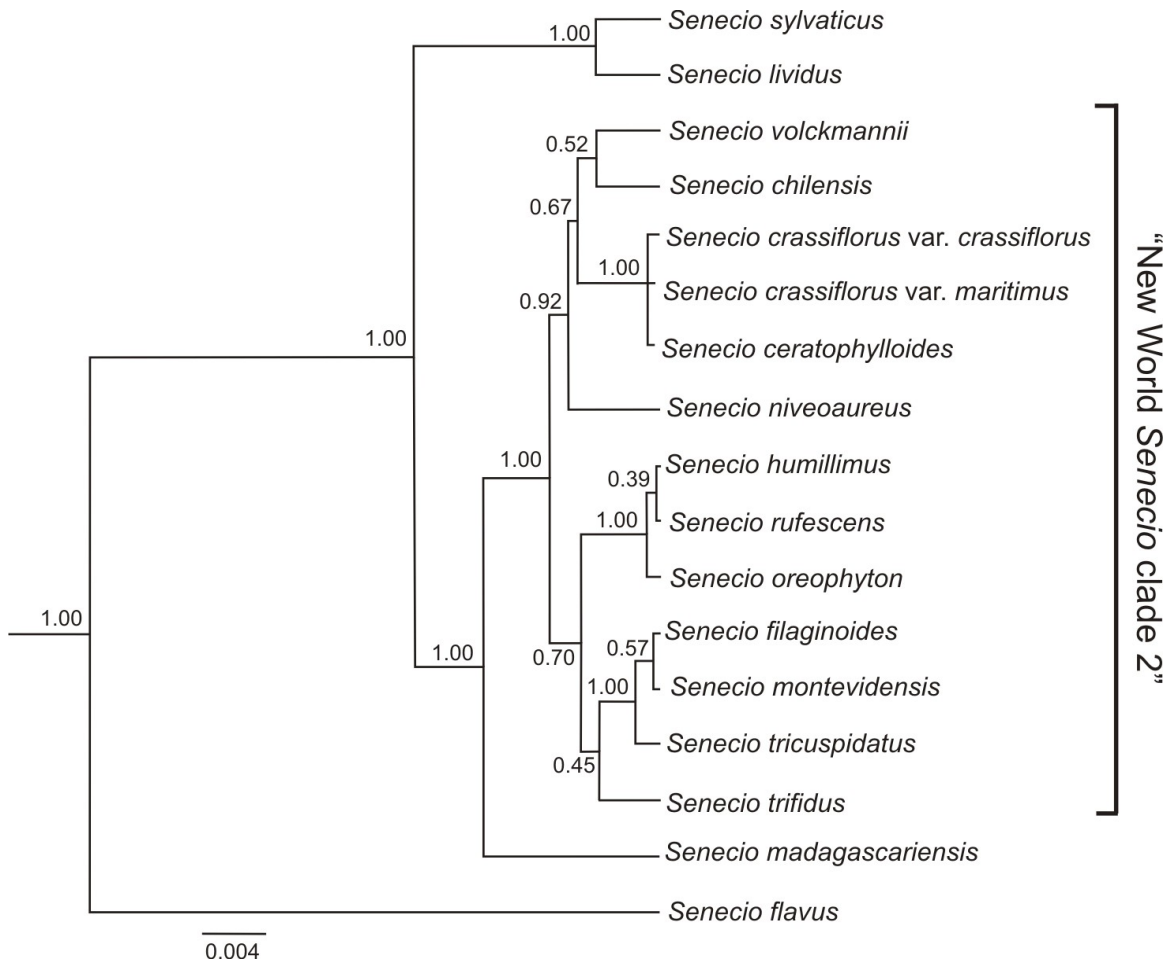


**Figura 4.** Árvore obtida através do método de Neighbor-Joining a partir de sequências de ITS. Os números localizados nos ramos representam os valores de bootstrap (1000 replicações). O valor apresentado na escala representa o número de substituições/sítio. "New World *Senecio* clade 2" indicado de acordo com Pelsner *et al.* (2007).



**Figura 5.** Árvore obtida através do método de máxima verossimilhança partir de sequências de ITS. Os números localizados nos ramos representam os valores de bootstrap (1000 replicações). O valor apresentado na escala representa o número de substituições/sítio. “New World *Senecio* clade 2” indicado de acordo com Pelsner *et al.* (2007).





**Figura 6.** Árvore obtida através do método de inferência bayesiana. Os números localizados nos ramos representam os valores de probabilidade posterior. O valor apresentado na escala representa o número de substituições/sítio. “New World *Senecio* clade 2” indicado de acordo com Pelsler *et al.* (2007).

**CAPÍTULO VI**  
**DISCUSSÃO GERAL**

## VI. 1 Primeiro estudo de caso

As populações de *Calibrachoa heterophylla* apresentaram grande estruturação populacional e forte correlação entre as distâncias genéticas e geográficas. Resultados similares foram observados por Lorenz-Lemke *et al.* (2006; 2010) para espécies de *Petunia* e por diversos autores para espécies de outras famílias botânicas (Westberg & Kadereit, 2009; Pinheiro *et al.*, 2010). Esta distribuição altamente estruturada, não é surpreendente já que a espécie não possui mecanismos especializados de dispersão (Stehmann, 1999).

A partir da construção de um dendrograma de análise bayesiana pudemos verificar que uma diversificação dando origem a quatro clados com correspondência geográfica ocorreu entre 1 e 0,5 milhões de anos A.P., ou seja, antes da formação da atual Planície Costeira (que ocorreu por volta de 420 mil anos A.P.). Neste período, a Planície Costeira foi profundamente dissecada por paleocanais que eram responsáveis por drenar a água continental até o mar (Abreu & Calliari, 2005). Esses paleocanais podem ter sido os principais obstáculos responsáveis pela diversificação da maioria dos clados verificados. No entanto, o período de maior diversificação de *C. heterophylla* ocorreu mais recentemente e parece estar relacionado com as grandes alterações do nível do mar, durante os últimos 400 mil anos. A análise do *Bayesian Skyline Plot* indicou um sinal de expansão populacional que parece estar relacionado com o evento transgressivo mais recente (5 mil anos A.P.).

A ausência de *C. heterophylla* em território uruguaio e em algumas localidades brasileiras já conhecidas a partir de registros de herbário pode ter sido causada por extinções locais de influência antrópica. Por outro lado, a ocorrência de populações continentais é uma descoberta intrigante, uma vez que a espécie era

descrita como tipicamente costeira. O ambiente de praias fluviais do Pampa é muito semelhante ao encontrado na Planície Costeira tanto que ambas as regiões, costeiras e continentais, são classificadas como formações de vegetação pioneira (Velooso *et al.*, 1991; Behling *et al.*, 2005). Mais estudos filogeográficos de espécies de plantas naturais da Planície Costeira são necessários para determinar se a história filogeográfica inferida para *C. heterophylla* se aplica a outras espécies ou é simplesmente um caso isolado. Se padrões filogeográficos similares forem encontrados, poderia ser sugerida a existência de um mecanismo comum responsável pela história evolutiva de plantas nessa região.

## **VI. 2 Segundo estudo de caso**

Os dados gerados nesse estudo, tanto com ITS como com SSR, mostraram que uma considerável parte da variabilidade genética encontrada nos três continentes estudados está representada nas populações do Pampa. Esses resultados sugerem que a relevante diversidade das populações invasoras no Pampa deve estar relacionada a múltiplos eventos de introdução. Diversos trabalhos têm mostrado, com dados históricos e moleculares, que muitas plantas invasoras possuem significativa diversidade genética em suas escalas invasivas (por exemplo, *Phalaris arundinacea*, Lavergne & Molofsky, 2007; *Ambrosia artemisiifolia*, Genton *et al.*, 2005; *Alliaria petiolata*, Durka *et al.*, 2005) provavelmente como resultado de introduções múltiplas. A formação de dois clusters nas análises de STRUCTURE e no dendrograma com dados de SSR, sugere que houve pelo menos dois eventos de introdução independentes.

Os dados de ITS permitiram relacionar as populações do Pampa com as demais populações do mundo. Verifica-se que não existe compartilhamento de sequências das populações sulamericanas com as de Madagascar e Suazilândia, mas sim com Havaí e África do Sul. Isso sugere que as populações do Pampa provavelmente são oriundas da África do Sul, como Le Roux *et al.* (2006) sugeriram para as populações da Austrália e do Havaí. Essas populações invasoras teriam chegado acidentalmente junto ao intenso tráfego naval entre a América do Sul e África do Sul. Diversos trabalhos têm atribuído a chegada de plantas invasoras ao fluxo de navios egressos do Sul da África (McCullough *et al.*, 2006; Lamutch *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2011). Nossos resultados de SSR indicaram a existência de pelo menos dois eventos independentes de colonização que devem ter uma origem próxima. Uma possibilidade é que as plantas que deram origem a esses grupos tenham origem em diferentes portos na África do Sul, por exemplo, Cape Town e Durban, principais portos com tráfego para América do Sul (Kaluza *et al.*, 2010).

O sucesso de uma planta invasora depende significativamente do quanto essa espécie pode se disseminar. As espécies de *Senecio* são conhecidas pela grande capacidade de dispersão de suas sementes. Análises realizadas nesse trabalho, bem como a própria constatação em campo, demonstram que as populações de *S. madagascariensis* estão em expansão geográfica e populacional, respectivamente, na região estudada. Nossos resultados também indicaram níveis moderados de endogamia que são comumente relatados para muitas espécies introduzidas (por exemplo, Bjorkland & Baker, 1996; Neuffer & Hurka, 1999; Young & Murray, 2000). A endogamia pode ser uma consequência indireta do cruzamento entre parentes próximos, devido ao efeito fundador e/ou à excessiva autofecundação (Le

Roux *et al.*, 2009). Evidências sugerem que *S. madagascariensis* é autocompatível em condições de campo (Le Roux *et al.*, 2009). Os níveis elevados de variação genética e endogamia encontrados podem fornecer alguma evidência para autofecundação no campo para esta espécie a exemplo do que foi sugerido por Ernst (1998) para a espécie *S. inaequidens*. Alternativamente, a mistura resultante de introduções múltiplas de populações de origem distintas poderia contribuir para a baixa heterozigosidade observada. Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram que *S. madagascariensis* está se tornando uma ameaça cada vez mais significativa para as espécies nativas e para a pecuária no bioma Pampa.

### **VI. 3 Terceiro estudo de caso**

*Senecio ceratophylloides* e *Senecio crassiflorus* apresentaram grande variação morfológica e ausência de variabilidade nos marcadores moleculares estudados. A análise de componentes principais através de medidas morfológicas das flores e folhas, inesperadamente, uniu uma das variedades de *S. crassiflorus* (*maritimus*) a *S. ceratophylloides*, enquanto a outra variedade (*crassiflorus*) ficou separada em um cluster independente. Esses resultados indicam que *S. crassiflorus* var. *maritimus* deve ser uma forma morfológica resultado da grande plasticidade fenotípica de *S. ceratophylloides*. Embora Cabrera (1957) tenha classificado *S. crassiflorus* com duas variedades, ele também destacou a grande variabilidade morfológica de *S. ceratophylloides*. No campo, verificamos que as populações de *S. ceratophylloides* foram encontradas em terrenos arenosos e dunas secundárias, ao contrário das duas variedades de *S. crassiflorus* que são mais comumente encontradas nas dunas primárias, próximas à faixa de praia. Essa diferença no habitat, com grandes

diferenças na drenagem, e salinidade do solo, pode ser responsável pela grande variabilidade morfológica de *S. ceratophylloides*. Então, sugerimos que a classificação da variedade *maritimus* não é justificada, pois verificamos que são apenas resultado da plasticidade morfológica de *S. ceratophylloides*. A plasticidade morfológica de plantas que habitam ambientes costeiros e salinos já foi relatada por diversos autores (García-Mora *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 2008; Rewald *et al.*, 2012). Apesar dos esforços, não foi possível detectar variabilidade genética entre *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus* através de todos os marcadores nucleares e plastidiais utilizados. Diversos trabalhos têm mostrado que essa dificuldade não é incomum em espécies de *Senecio* (Comes & Abbott 2001; Pelsner *et al.* 2004, 2010; Álvarez *et al.* 2008).

Análises de similaridade de seqüências (Blast) relacionaram *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus* ao clado denominado *new world clade 2* de Pelsner *et al.* (2007). Como Pelsner *et al.* (2007) já haviam observado, diversos ramos apresentaram baixa confiabilidade no relacionamento entre as espécies do clado referido. No entanto, as três metodologias aqui empregadas foram eficazes em apontar *S. ceratophylloides* e *S. crassiflorus* como espécies próximas de *S. niveoaurus*, *S. volckmannii* e *S. chilensis*. Estas análises indicaram ainda a grande similaridade entre as duas espécies, o que pode ser um indicativo da não validade de sua inclusão em *taxa* diferentes. Somando-se a isto o pequeno número de caracteres diagnósticos e sua grande plasticidade, sugere-se uma profunda revisão taxonômica para o grupo, incluindo também outros marcadores moleculares capazes de detectar variabilidade em uma escala mais fina, intraespecífica, como microssatélites e AFLP.

#### **VI. 4 Considerações finais gerais**

A utilização de marcadores moleculares tem demonstrado ser grande aliada nos estudos que envolvem questões taxonômicas e evolutivas. Os métodos de análise taxonômica mais utilizados atualmente são os morfológicos e moleculares, ambos apresentando vantagens e desvantagens próprias (Pedersen & Seberg, 1998). Os dados moleculares são criticados, porque é possível que representem somente a evolução do marcador e, não necessariamente, das espécies (Pedersen & Seberg, 1998). Entretanto uma grande vantagem dos marcadores moleculares é que a análise do DNA pode acessar indiretamente informações sobre a morfologia, além de que, em alguns casos, pode apresentar muito mais caracteres informativos que a análise da morfologia. Nesse trabalho, dados moleculares nos permitiram compreender diversos aspectos acerca da história evolutiva das espécies nos dois primeiros estudos. Entretanto, no terceiro artigo tivemos grande dificuldade de encontrar um marcador molecular que pudesse responder as questões levantadas. Nesse caso, os dados morfológicos aliados a testes estatísticos foram de grande utilidade para a compreensão das dúvidas taxonômicas entre duas espécies próximas de difícil determinação. As experiências adquiridas ao interpretar os resultados do presente trabalho nos fazem concluir que abordagens genéticas e morfológicas ambas têm grande importância, pois, se complementam e reforçam interpretações taxonômicas, já que dessa forma, geram-se mais caracteres para a análise, além destes não estarem diretamente relacionados.

Os diversos ambientes ao longo do bioma Pampa são cada vez mais alvo da ação humana, seja pela construção civil, atividades agrárias ou extrativismo dos recursos naturais. Essas ações tornam algumas das espécies que habitam essa região



altamente vulneráveis. Dentre elas, *Calibrachoa heterophylla* pode ser indicada como altamente ameaçada, pois sua distribuição é restrita à Planície Costeira e campos arenosos no Pampa, além de ser muito exigente quanto a mudanças ambientais principalmente relacionadas ao solo (Stehmann, 1999). Durante as coletas, muitas vezes não foi possível encontrar esta espécie em regiões onde, por características ambientais gerais, sua ocorrência era esperada (boa parte do lado oeste da Laguna dos Patos e a Praia de Fora no Parque Estadual de Itapuã, por exemplo). O Litoral Norte do Rio Grande do Sul se mostrou a região da Planície Costeira mais afetada pelas ações humanas, tendo sido encontrada nesse local apenas uma população, justamente na área de proteção ambiental do Parque Estadual de Itapeva. *Senecio crassiflorus* e *Senecio ceratophylloides*, embora sejam facilmente encontradas ao longo das faixas litorâneas arenosas ao longo do Pampa, não deixam de ser espécies vulneráveis por se estabelecerem em um ambiente intensamente alterado pelo homem nas últimas décadas. Enquanto as espécies mencionadas acima sofrem com as alterações ambientais, espécies oportunistas como *Senecio madagascariensis* se aproveitam da reduzida competitividade para se espalharem por ambientes alterados como vias urbanas, beiras de estradas e campos empobrecidos pelo plantio em monoculturas e pela pecuária intensiva.

Os dados populacionais e filogeográficos obtidos nesse trabalho podem futuramente contribuir para o estabelecimento de estratégias que priorizem a conservação de grupos com representantes da maior parte da história evolutiva das espécies, levando em consideração populações com maior variabilidade genética, que é a matéria-prima para a sobrevivência das espécies. Em contrapartida, esses dados também podem ter grande utilidade para a compreensão da origem e estrutura

populacional de espécies oportunistas e a partir de então é possível tomar medidas para que esse avanço possa ser contido.

## REFERÊNCIAS

- Abreu JGN & Calliari LJ (2005) Paleocanais na plataforma continental interna do Rio Grande do Sul: evidências de uma drenagem fluvial pretérita. *Rev Bras Geof* 23: 123-132.
- Álvares I, Costa A & Feliner GN (2008) Selecting single-copy nuclear genes for plant phylogenetics: a preliminary analysis for the Senecioneae (Asteraceae). *J Mol Evol* 66: 276-291.
- Alsos IG, Engelskjøn T, Gielly L, Taberlet P & Brochmann C (2005) Impact of ice ages on circumpolar molecular diversity insights from an ecological key species. *Mol Ecol* 14: 2739–2753.
- Ando T, Nomura M, Tsukahara J, Watanabe H, Kokubun H, Tsukamoto T, Hashimoto G, Marchesi E & Kitching IJ (2001) Reproductive isolation in a native population of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Ann Bot* 88: 403–413.
- Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka N, Yukawa T, Hashimoto G, Marchesi E, Suárez E & Basualdo I (2005) Phylogenetic analysis of *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae) using chloroplast DNA RFLP. *Ann Bot* 96: 289–297.
- APG - Angiosperm Phylogeny Group (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc* 161: 105-121.
- Avice JC (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, London, 447 pp.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS & Donoghue MJ (1995) The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Ann Mo Bot Gard* 82: 247-277.

- Barrett SCH, Colautti RI & Eckert CG (2008) Reproductive systems and evolution during biological invasion. *Mol Ecol* 17: 373-383.
- Beheregaray LB (2008) Twenty years of Phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol Ecol* 17: 3754–3774.
- Behling H (2002) South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 177: 19-27.
- Behling H, Pillar VD & Bauermann SG (2005) Late Quaternary grassland (Campos), gallery forest, fire and climate dynamics, studied by pollen, charcoal and multivariate analysis of the São Francisco de Assis core in western Rio Grande do Sul (southern Brazil). *Rev Palaeobot Palynol* 133: 235–248.
- Bilenca DN & Miñarro FO (2004) Identificación de Áreas Valiosas de Pastizal (AVPs) em las Pampas y Campos de Argentina, Uruguay y sur de Brasil. Fundación Vida Silvestre, Buenos Aires, 323 pp.
- Bjorkland MJ & Baker AJ (1996) The successful founder: genetics of introduced *Carduelis chloris* (greenfinch) populations in New Zealand. *Heredity* 77: 410-422.
- Brandon K, Fonseca GAB, Rylands AB & Silva JMC (2005) Brazilian Conservation: Challenges and opportunities. *Conserv Biol* 19: 595-600.
- Bremer K (1994) *Asteraceae: cladistics and classification*, Timber Press, Portland, 752 pp.
- Cabrera AL (1957) El Género *Senecio* (Compositae) en Brasil, Paraguay y Uruguay. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro* 15: 163-264.
- Cabrera AL (1974) Compuestas. In: Burkart A (ed.). *Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)* v.6. Colección Científica del INTA, Buenos Aires, pp 512-525.
- Cabrera AL (1978) *Flora de la Provincia de Jujuy*. Colección Científica del INTA. Buenos Aires, Argentina. Parte X – Compositae, 726 pp.

- Cabrera AL & Klein RM (1975) Compostas 2, Tribo: Senecioneae. Flora Ilustrada Catarinense. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 222 pp.
- Chun YJ, Nason JD & Moloney KA (2009) Comparison of quantitative and molecular genetic variation of native vs. invasive populations of purple loosestrife (*Lythrum salicaria* L., Lythraceae). *Mol Ecol* 18: 3020-3035.
- Comes HP & Abbott RJ (2001) Molecular phylogeography, reticulation, and lineage sorting in Mediterranean *Senecio* sect. *Senecio* (Asteraceae). *Evolution* 55: 1943-1962.
- Comes HP & Kadereit JW (1998) The effect of quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends plant sci* 3: 432-438.
- Cordazzo CV & Spanó S (2002) Produção e Germinação de Sementes de *Senecio crassiflorus* (Poir.) DC (Asteraceae), coletadas ao longo de um gradiente nas dunas costeiras o sul do Brasil. *Atlântica* 24: 11-15.
- Correa ICS (1986) Evidence of sea-level fluctuation on the Rio Grande do Sul continental shelf, Brazil. *Quaternary of South America and Antarctic Peninsula* 40: 237-249.
- Crawford KM & Whitney KD (2010) Population genetic diversity influences colonization success. *Mol Ecol* 19: 1253-1263.
- Cruz CEF, Karam FC, Dalto AC, Pavarini SP, Bandarra PM & Driemeier D (2010) Fireweed (*Senecio madagascariensis*) poisoning in cattle. *Pesq Vet Bras* 30: 10-12.
- D'Arcy WG (1991) The Solanaceae since 1976, with a review of its biogeography. *In* Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution (Hawkes, JG, Lester, RN, Nee, M & Estrada N, eds.), Royal Botanic Garden Kew and Linnean Society of London, London, pp 75-135.

- Durka W, Bossdorf O, Prati D & Auge H (2005) Molecular evidence for multiple introductions of garlic mustard (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae) to North America. *Mol Ecol* 14: 1697-1706.
- Ernst WHO (1998) Invasion, dispersal and ecology of the South African neophyte *Senecio inaequidens* in The Netherlands: from wool alien to railway and road alien. *Acta Bot Neerl* 47: 131-151.
- Fregonezi JN, Freitas LB, Bonatto S, Semir J & Stehmann JR (2012) Infrageneric classification of *Calibrachoa* (Solanaceae) based on morphological and molecular evidence. *Taxon* 61: 120-130.
- Field D & Wills C (1996) Long polymorphic microsatellites in simple organisms. *PNAS* 263: 209-215.
- Fortes, AB (1959) Geografia do Rio Grande do Sul. Globo, Porto Alegre, 393 pp.
- Frankham R, Lees K, Montgomery ME, England PR, Lowe E & Briscoe DA (1999) Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Anim Conserv* 2: 255-260.
- García-Mora MR, Gallego-Fernández JB & García-Novo F (1999) Plant functional types in coastal foredunes in relation to environmental stress and disturbance. *J Veg Sci* 10: 27-34.
- Genton BJ, Shykoff JA & Giraud T (2005) High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Mol Ecol* 14: 4275-4285.
- Grela, IA (2004) Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: propuesta para la delimitación de dendrofloras. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas. Universidad de la República, Montevideo, 103 pp.

- Hamilton MB, Braverman JM & Soria-Hernanz DF (2003) Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in new world species of the Lecythidaceae. *Molec Biol Evol* 20: 1710-1721.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- Hind DJN (1993) A checklist of the Brazilian Senecioneae (Compositae). *Kew Bull* 48: 279–296.
- Hughes CE, Eastwood RJ & Bailey CD (2006) From famine to feast? Selecting nuclear DNA sequence loci for plant species-level phylogeny reconstruction. *Phil Trans R Soc B* 361: 211–225.
- Hunziker AT (2001) *Genera Solanacearum. The genera of Solanaceae illustrated, arranged according to a new system.* ARG Gantner & Verlag KG, Königstein, 272 pp.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (1997) *Recursos naturais e meio ambiente: uma visão do Brasil*, Rio de Janeiro, 208 pp.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004) *Mapa de Biomas.* [ftp://geofp.ibge.gov.br/mapas/tematicos/mapas\\_murais/biomas.pdf](ftp://geofp.ibge.gov.br/mapas/tematicos/mapas_murais/biomas.pdf).
- Jarne P & Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE* 11:424-429.
- Kaluza P, Kölzsch A, Gastner MT & Blasius B (2010) The complex network of global cargo ship movements. *J R Soc Interface* 7: 1093-1103.
- Keane RM & Crawley MJ (2002) Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends Ecol Evol* 17: 164-170.
- Keller RP, Drake JM, Drew MB & Lodge DM (2011) Linking environmental conditions and ship movements to estimate invasive species transport across the global shipping network. *Divers Distrib* 17: 93-102.

- Kulcheski FR, Muschner VC, Lorenz-Lemke AP, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Molecular phylogenetic analysis of *Petunia* Juss. (Solanaceae). *Genetica* 126: 1–12.
- Lachmuth S, Durka W & Schurr FM (2010) The making of a rapid plant invader: genetic diversity and differentiation in the native and invaded range of *Senecio inaequidens*. *Mol Ecol* 19: 3952-3967.
- Lavergne S & Molofsky J (2007) Increased genetic diversity and evolutionary potential drive the success of an invasive grass. *PNAS* 104: 3883-3888.
- Le Roux JJ, Wiczorek AM, Ramadan MM & Tran CT (2006) Resolving the native provenance of invasive fireweed (*Senecio madagascariensis* Poir.) in the Hawaiian Islands as inferred from phylogenetic analysis. *Divers Distrib* 12: 694-702.
- Le Roux JJ, Wiczorek AM, Tran CT & Vorsino A (2009) Disentangling the dynamics of invasive fireweed (*Senecio madagascariensis* Poir. species complex) in the Hawaiian Islands. *Biol Inv* 12: 2251-2264.
- Lee CE (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends Ecol Evol* 17: 386-391.
- Leijts R, van Apeldoorn RC & Bijlsma R (1999) Low genetic differentiation in north-west European populations of the locally endangered root vole, *Microtus oeconomus*. *Biol Cons* 87: 39-48.
- Li D & Zhang X (2002) Physical localization of the 18S-5.8S-26S rDNA and sequence analysis of ITS regions in *Thinopyrum ponticum* (Poaceae: Triticaceae): implications for concerted evolution. *Ann Bot* 90: 445-452.
- Lima LG & Buchmann FSC (2005) Novo afloramento fossilífero (Pleistoceno/Holoceno) no sul da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. In: X



ABEQUA Associação Brasileira de Estudos do Quaternário, Guarapari. Boletim de resumos, v. 1.

Lorenz-Lemke AP, Muschner VC, Bonatto SL, Cervi AC, Salzano FM & Freitas LB (2005) Phylogeographic inferences concerning evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) based on ITS (nrDNA) variation. *Ann Bot* 95: 799-806.

Lorenz-Lemke AP, Mäder G, Muschner VC, Stehmann JR, Bonatto SL, Salzano FM & Freitas LB (2006) Diversity and natural hybridization in a highly endemic species of *Petunia* (Solanaceae): a molecular and ecological analysis. *Mol Ecol* 15: 4487–4497.

Lorenz-Lemke AP, Togni PD, Mäder G, Kriedt RA, Stehmann JR, Salzano FM, Bonatto SL & Freitas LB (2010) Plant species diversification in eastern South American highland subtropical region: a phylogeographic perspective with native *Petunia* (Solanaceae). *Mol Ecol* 19: 5240-5251.

Lorenzi H (2000) Plantas daninhas do Brasil: Terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3ª ed. Plantarum, Nova Odessa, 620 pp.

Mace GM & Purvis A (2008) Evolutionary biology and practical conservation: bridging a widening gap. *Mol Ecol* 17: 9–19.

Mäder G, Zamberlan PM, Fagundes NJR, Magnus T, Salzano FM, Bonatto SL & Freitas LB (2010) The use and limits of ITS data in the analysis of intraspecific variation in *Passiflora* L. (Passifloraceae). *Genet Mol Biol* 33: 99-108.

Martin L, Suguiroz K & Flexor JM (1988) Hauts Niveaux Marins Pleistocenes du Littoral Brésilien. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 68: 231-239.

Martino D (2004) Conservación de praderas en el cono sur: valoración de las áreas protegidas existentes. *Ecosistemas* 13: 114-123.

- Matzenbacher NI (1998) O complexo "Senecionoide" (Asteraceae-Senecioneae) no Rio Grande do Sul - Brasil. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Matzenbacher NI (2009) Uma nova espécie do gênero *Senecio* L. (Asteraceae - Senecioneae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia. Série Botânica 64: 109-113.
- Matzenbacher NI & Schneider AA (2008) Nota sobre a presença de uma espécie adventiciada *Senecio* (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Rev Bras Bioc 6: 111-115.
- McCullough DG, Work TT, Cavey JF, Liebhold AM & Marshall D (2006) Interceptions of nonindigenous plant pests at US ports of entry and border crossings over a 17-year period. Biol Inv 8: 611-630.
- Mishiba KI, Ando T, Mii M, Watanabe H, Kokubun H, Hashimoto G & Marchesi E (2000) Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). Ann Bot 85: 665-673.
- Mooney HA & Cleland EE (2001) The evolutionary impact of invasive species. PNAS 98: 5446-5451.
- Neuffer B & Hurka H (1999) Colonization history and introduction dynamics of *Capsella bursa-pastoris* (Brassicaceae) in North America: isozymes and quantitative traits. Mol Ecol 8: 1667-1681.
- Nieto-Feliner G & Rosselló JA (2007) Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. Mol Phylogenet Evol 44: 911-919.
- Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, Santiago-Valentin E, Garcia VF & Collier SM (2008) A molecular phylogeny of the Solanaceae. Taxon 57: 1159-1181.

- Olmstead RG & Palmer JD (1992) A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationships and character evolution. *Ann Miss Bot Garden* 79: 346-360.
- Olmstead RG, Sweere JA, Spangler RE, Bohs L & Palmer JD (1999) Phylogeny and provisional classification of the Solanaceae based on chloroplast DNA. pp. 111-137 in *Solanaceae IV: Advances in Biology and Utilization* edited by Nee M, Symon DE, Lester RN & Jessop JP. Royal Botanical Garden, Kew, UK.
- Olson SL & Hearty PJ (2009) A sustained +21 m sea-level highstand during MIS 11 (400 Ka): direct fossil and sedimentary evidence from Bermuda. *Quat Sci Rev* 28: 271-285.
- Paim PSG, Chemale F & Lopes RC (2000) A Bacia do Camaquã. In: Holz M e Rios LF (orgs.) *Geologia do Rio Grande do Sul*. UFRGS, Porto Alegre.
- Pedersen G & Seberg O (1998) Molecules vs morphology. In A. Karp et al. (ed.) *Molecular tools for screening biodiversity*. Chapman and Hall, London. p 359-365.
- Pelser PB, Kennedy AH, Tepe EJ, Shidler JB, Nordenstam B, Kadereit JW & Watson LE (2010) Patterns and causes of incongruence between plastid and nuclear Senecioneae (Asteraceae) phylogenies. *Am J Bot* 97(5): 856-873.
- Pelser PB, Nordenstam B, Kadereit JW & Watson LE (2007) An ITS phylogeny of Tribe Senecioneae (Asteraceae) and a new delimitation of *Senecio* L. *Taxon* 56: 1077-1104.
- Pelser PB, Van den Hof K, Gravendeel B & Van der Meijden R (2004) The systematic value of morphological characters in *Senecio* sect. *Jacobaea* (Asteraceae) as compared to DNA sequences. *Syst Bot* 29: 790-805.

- Pillar VP (2006) Estado atual e desafios para a conservação dos campos. Workshop Estado atual e desafios para a conservação dos campos. UFRGS, <http://www.ecologia.ufrgs.br/ecologia/campos/finalcampos.htm>. Porto Alegre.
- Pillar VP, Muller SC, Castilhos ZMS & Jacques AVA (2009) Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 403 pp.
- Pinheiro F, Barros F, Palma-Silva C, Fay MF, Lexer C & Cozzolino S (2010) Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Mol Ecol* 19: 3981-3994.
- Rambo B (1951) O elemento andino no pinhal riograndense. *Sellowia* 3: 7-39.
- Rambo B (1954) História da flora do litoral riograndense. *Sellowia* 6: 113-172.
- Reed DH & Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Cons Biol* 17:230-237.
- Rewald B, Raveh E, Gendler T, Ephrath JE & Rachmilevitch S (2012) Phenotypic plasticity and water flux rates of *Citrus* root orders under salinity. *J Exp Bot* doi:10.1093/jxb/err457.
- Richards CL, Walls RL, Bailey JP Parameswaran R, George T & Pigliucci M (2008) Plasticity in salt tolerance traits allows for invasion of novel habitat by Japanese knotweed s. l. (*Fallopia japonica* and *F.xbohemica*, Polygonaceae). *Am J Bot* 95(8):931-42.
- Richardson DM, Pysek P, Rejmanek M, Barbour MG, Panetta FG & West CJ (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Divers Distrib* 6: 93-107.

- Rosenthal DM, Ramakrishnan AP & Cruzan MB (2008) Evidence for multiple sources of invasion and intraspecific hybridization in *Brachypodium sylvaticum* (Hudson) Beauv. in North America. *Mol Ecol* 17: 4657-4669.
- Rull V (2011) Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends Ecol Evol* 26: 508-513.
- Safford HD (1999) Brazilian Paramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. *J Biogeogr* 26: 693–712.
- Sia EA, Butler CA, Dominska M, Greenwell P, Fox TD & Petes TD (2000) Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 97: 250-255.
- Sakai AK, Weller SG, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, McCauley DE, O'Neil P, Parker IM, Thompson JN & Weller SG (2001) The population biology of invasive species. *Annu Rev Ecol Syst*, 32: 305-332.
- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Huenneke LF, Jackson RB, Kinzig A, Leemans R, Lodge DM, Mooney HA, Oosterheld M, Poff NL, Sykes MT, Walker BH, Walker M & Wall DH (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770-1774.
- Sax DF, Stachowicz JJ, Brown JH, Bruno JF, Dawson MN, Gaines SD, Grosberg RK, Hastings A, Holt RD, Mayfield MM, O'Connor MI & Rice WR. (2007) Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends Ecol Evol* 22: 465-471.
- Schlotterer C & Tautz D (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucl Acid Res* 20: 211-215.
- Sendtner O (1846) Solanaceae. In *Flora Brasiliensis* (CFP von Martius, ed.). F Fleischer, Lipsiae. Vol 10.

- Sindel BM, Radford IJ, Holtkamp RH & Michael PW (1998) *Senecio madagascariensis* Poir. The biology of Australian weeds. *Plant Prot Q* 13: 2-15.
- Souza VC & Lorenzi H (2008) *Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. 2. ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, São Paulo, 704 pp.
- Stehmann JR & Semir J (2005) New species of *Calibrachoa* and *Petunia* (Solanaceae) from subtropical south America. In: *Festschrift for William G. Darcy: The Legacy of a Taxonomist*. RC Keating, VC Hollowell & TB Croat (eds.). Missouri Botanical Garden Press, *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 104 pp.
- Stehmann JR (1999) Estudos taxonômicos da tribo Nicotianeae G. Don (Solanaceae): revisão de *Petunia* Jussieu, das espécies brasileiras de *Calibrachoa* La Llave & Lexarza e o estabelecimento do novo gênero *Petuniopsis* Stehmann & Semir. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. Tese de doutorado.
- Stehmann JR & Semir J (1997) A new species and new combinations in *Calibrachoa* (Solanaceae). *Novon* 7: 417-419.
- Strauss SY, Lau JA & Carroll SP (2006) Evolutionary responses of natives to introduced species: what do introductions tell us about natural communities? *Ecol Lett* 9: 354-371.
- Suertegaray DMA & Silva LAP (2009) Tchê Pampa: histórias da natureza gaúcha. In: Pillar, V.D., Muller, S.C., Castilhos, Z.M.S., Jacques, A.V.A (Eds.), *Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade*. MMA, Brasília, 403 pp.
- Tomazelli LJ & Villwock JA (2005) Mapeamento geológico de planícies costeiras: o exemplo da costa do Rio Grande do Sul. *Gravel* 3: 109-115.

- Tomazelli LJ, Dillenburg SR & Villwock JA (2000) Late quaternary geological history of Rio Grande do Sul coastal plain, southern Brazil. *Rev Bras Geoc* 30: 474-476.
- Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Tanaka R, Hashimoto G, Marchesi E & Kao T (1998) Differentiation in the status of self-incompatibility among all natural taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Acta Phytotax Geobot* 49: 115-133.
- Tsukamoto T, Ando T, Watanabe H, Kokubun H, Hashimoto G, Sakazaki U, Suárez E, Marchesi E, Oyama K & Kao T (2002) Differentiation in the status of self-incompatibility among *Calibrachoa* species (Solanaceae). *J Plant Res* 115: 185-193.
- Vázquez DP & Gittleman JL (1998) Biodiversity conservation: Does phylogeny matter? *Curr Biol* 8: R379-R381.
- Veloso HP, Rangel-Filho ALR & Lima JCA (1991) Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal. IBGE, Rio de Janeiro, Brazil.
- Villwock JA & Tomazelli LJ (1995) Geologia costeira do Rio Grande do Sul. *Notas Técnicas* 8: 1-45.
- Watanabe H, Ando T, Nishino E, Kokubun H, Tsukamoto T, Hashimoto G & Marchesi E (1999) three groups of species in *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae) inferred from the intact seed morphology. *Am J Bot* 86: 302-305.
- Weschenfelder J, Correa ICS, Aliotta S & Baitelli R (2010) Paleochannels related to late Quaternary sea-level changes in southern Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography* 58: 35-44.
- Westberg E & Kadereit JW (2009) The influence of sea currents, past disruption of gene flow and species biology on the phylogeographical structure of coastal flowering plants. *J Biog* 36: 1398–1410.

- Wijnands DO, Boss JJ, Wijsman HJW, Schneider F, Brickell CD & Zimmer K (1986).  
Proposal to conserve 7436 *Petunia* with *P. nyctaginiflora* as *typ. cons.* Taxon 35:  
748-749.
- Wijsman HJW (1990) On the interrelationship of certain species of *Petunia* VI. New  
names for the species of *Calibrachoa* formerly included into *Petunia*  
(Solanaceae). Acta Bot Neerl 39: 101-102.
- Wijsman HJW & Jong JH (1985) On the interrelationships of certain species of *Petunia*.  
5. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial  
consequences in the *Petunia* group. Acta Bot Neerl 34: 337-349.
- Worth JRP, Marthick JR, Jordan GJ & Vaillancourt RE (2011) Low but structured  
chloroplast diversity in *Atherosperma moschatum* (Atherospermataceae) suggests  
bottlenecks in response to the Pleistocene glacials. Ann Bot 108: 1247-1256.
- Young AG & Murray BG (2000) Genetic bottlenecks and dysgenic gene flow into re-  
established populations of the grassland daisy, *Rutidosia leptorrhynoides*. Aust J  
Bot 43: 409-416.
- Zhang LB, Comes HP & Kadereit JW (2001) Phylogeny and quaternary history of the  
European montane/alpine endemic *Soldanella* (Primulaceae) based on ITS and  
AFLP variation. Am J Bot 88:2331-2345.