



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GABRIELA BARBOSA NAVARRO DE PAULA

**ESTUDOS EM *HYPOCHAERIS TROPICALIS* Cabrera
(ASTERACEAE) UTILIZANDO MARCADORES
MOLECULARES AFLP, SSR E ITS**

Londrina
2015



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agrônomo do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa

Agropecuária

GABRIELA BARBOSA NAVARRO DE PAULA

**ESTUDOS EM *HYPOCHAERIS TROPICALIS* Cabrera
(ASTERACEAE) UTILIZANDO MARCADORES
MOLECULARES AFLP, SSR E ITS**

Londrina
2015

GABRIELA BARBOSA NAVARRO DE PAULA

**ESTUDOS EM *HYPOCHAERIS TROPICALIS* Cabrera
(ASTERACEAE) UTILIZANDO MARCADORES
MOLECULARES AFLP, SSR E ITS**

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

Orientadora: Profa Dra. Claudete de Fátima Ruas

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P329e	Paula, Gabriela Barbosa Navarro de. Estudos em <i>Hypochaeris tropicalis</i> Cabrera (Asteraceae) utilizando marcadores moleculares AFLP, SSR e ITS / Gabriela Barbosa Navarro de Paula. – Londrina, 2015. 85f. : il. Orientador: Claudete de Fátima Ruas. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2015. Inclui bibliografia. 1. Genética de populações – Teses. 2. Marcadores biológicos – Teses. 3. Plantas – Filogenia – Teses. 4. Compostas – Teses. I. Ruas, Claudete de Fátima. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.
	CDU 575.17

GABRIELA BARBOSA NAVARRO DE PAULA

**ESTUDOS EM *Hypochoeris tropicalis* Cabrera (ASTERACEAE)
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES AFLP, SSR E ITS**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Claudete de Fátima Ruas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr^a Luana Alves Rodrigues
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas
Faculdade de Apucarana - FAP

Londrina, 27 de março de 2015.

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais, e a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para o meu crescimento, tanto profissional quanto pessoal durante esse período.

Agradecimentos

Agradeço a Deus primeiramente, por sempre estar ao meu lado me dando forças e serenidade para enfrentar cada obstáculo a fim de concluir este desafio.

Aos professores Claudete de Fátima Ruas e Paulo Maurício Ruas, pelos ensinamentos e por terem me recebido de braços abertos no laboratório.

Em especial a professora Claudete pela orientação, dedicação e paciência durante a confecção deste trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina – UEL e ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, por oferecer uma ótima estrutura e um ensino de qualidade.

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

Aos meus pais Rosilene e Aires e minha irmã Letícia, que nunca mediram esforços para realizar os meus sonhos e sempre me incentivaram a querer mais em relação aos meus estudos. Vocês são meus exemplos e minhas inspirações diárias, amo vocês!

Ao meu namorado Alexandre, pelo companherismo, amizade, amor e incentivo durante essa fase, que nos melhores e piores momentos sempre esteve ao meu lado. Te amo e nunca vou esquecer tudo o que você fez por mim!

A minha amiga Gisele Porto, pela amizade e pela paciência em morar comigo e aguentar os meus momentos de mau – humor.

Aos amigos de laboratório Bruna, Camila R., Camila C., Lucas, Sara, Kátia, Thiago, Nataiane, Otávio, Caique, Natalia e Patrícia, e aos “agregados” Elson, João, Vivi e Felipe, pela amizade e pelos momentos vividos dentro e fora do laboratório.

Em especial a Sara, pelos ensinamentos e por ter sido uma “mãezona”, me acolhendo desde o primeiro dia que cheguei a Londrina.

Ao Eduardo Augusto Ruas, pelos ensinamentos e auxílio nas análises estatísticas.

As novas amigas de Londrina, as velhas amigas de Paranaíba, assim como meus familiares, que sempre me apoiaram e me deram forças para seguir até o fim.

Muito Obrigada!

PAULA, Gabriela Barbosa Navarro de. **Estudos em *Hypochoeris tropicalis* Cabrera (ASTERACEAE) utilizando marcadores moleculares AFLP, SSR E ITS.** 2015. 85f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Hypochoeris tropicalis é uma espécie com distribuição restrita a poucas áreas, na região sudoeste do Rio Grande do Sul (Brasil), com umas poucas informações de ocorrência na Argentina e Uruguai. A fim de determinar a estrutura genética de populações desta espécie e a sua posição filogenética dentro do grupo sul-americano do gênero, foram utilizados marcadores moleculares AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), microssatélites-SSR (Simple Sequence Repeats) e sequências de ITS (Internal Transcribed Spacer). Para o estudo de populações seis combinações de primers seletivos de AFLP e nove pares de primers de SSR foram aplicados em seis populações de *H. tropicalis*. A técnica de AFLP possibilitou a identificação de 1.488 marcadores, com uma média de 67% de polimorfismo. Foi identificado um total de 56 alelos com uma média de 6,2 alelos por loco nas seis populações. Ambos, AFLP e SSRs, identificaram uma maior variação dentro (91,06 e 97,08) do que entre (8,94 e 2,92) as populações investigadas, sugerindo que a espécie possui um sistema reprodutivo por fecundação cruzada ou mista. Foi identificada uma baixa estruturação genética, possivelmente devido à diversificação rápida e recente do gênero *Hypochoeris* na América do Sul. Para definir a posição filogenética de *H. tropicalis* dentro do grupo sul-americano de *Hypochoeris*, foram utilizadas sequências de regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) e três primers seletivos de AFLP. Nesta investigação foram analisadas oito espécies nativas da América do Sul, além de *H. angustifolia*, possível ancestral do grupo e duas espécies europeias como outgroups (ITS). Os dados de AFLP identificaram 1.213 marcadores com 88% de polimorfismo enquanto que as sequências ITS geraram 643 caracteres onde, somente 13,7% foram informativos. Os marcadores AFLP e sequências ITS possibilitaram a inserção de *H. tropicalis* na filogenia de *Hypochoeris* na América do Sul.

Palavras-chave: *Hypochoeris*. Estrutura genética. Filogenia. Diversificação recente.

PAULA, Gabriela Barbosa Navarro de. **Studies in *Hypochoeris tropicalis* Cabrera (Asteraceae) using molecular markers AFLP, SSR AND ITS.** 2015. 85p. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Hypochoeris tropicalis is a species with restrict distribution in southeast of Rio Grande do Sul state in Brasil, with a few reports in Argentina and Uruguay. This study aim to determine the population genetic structure of the species, as well as to define the phylogenetic position of the species within the South American *Hypochoeris*. For this purpose we used AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism), microsatellites (SSR-Simple Sequence Repeats) and ITS (Internal Transcribed Spacer) sequences. Six AFLP primer combinations and nine SSR primer pairs were applied for population studies. The AFLP technique allowed the identification of 1,488 markers, with an average of 67% of polymorfism. PCR amplification of the nine SSR loci idenfied a total of 56 aleles and an average of 6,2 aleles per locus. Both, AFLP and SSRs, idenfied higher variation (91,06 e 97,08) within than amog (8,94 e 2,92) populations, suggesting that *H. tropicalis* is predominantly alogamous. The population genetic structure of the species was low, possibly because of the recent colonization and diversification of the genus in the South American continent. ITS sequences and AFLP markers were also used to define the phylogenetic position of *H. tropicalis*. For this purposes eight species native to South America, *H. angustifolia*, the presumed ancestor of the group, and two European species (outgroups) were investigated. Three AFLP primer combinations identified 1.213 markers with 88% of polymorphism while the ITS sequences rendered 643 characters but, only 13.7% were informative. The AFLP data and ITS sequences allowed the insertion of the phylogeny of *H. tropicalis* *Hypochoeris* in South America.

Keywords: *Hypochoeris*. Genetic structure. Recent diversification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécie *Hypochoeris tropicalis* cultivada em casa de vegetação, na Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina-Pr 18

Artigo 1

Figura 1 - Mapa representativo das seis áreas de coleta de *Hypochoeris tropicalis* (conforme Tabela 1) no estado do Rio Grande do Sul, Brasil 30

Figura 2 - A) Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, conforme distância genética de Nei (1978). Número nos ramos representam *bootstrap* baseado em 1000 replicações. B) Coordenada principal de seis populações de *H. tropicalis*, conforme distância genética de Nei (1978) com eixos X, Y e Z explicando, respectivamente 26,6%, 7,8% e 6,9% da variabilidade. C) Agrupamentos (k=2) formados pela análise de estrutura populacional em seis populações analisadas de *H. tropicalis* 37

Figura 3 – A) Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, conforme distância genética de Nei (1978). Número nos ramos representam *bootstrap* baseado em 1000 replicações. Agrupamentos (k=3) formados pela análise de estrutura populacional em seis populações analisadas de *H. tropicalis* 42

Artigo 2

Figura 1 - Árvore consenso das espécies sul-americanas de *Hypochoeris* obtida a partir de marcadores de AFLP, avaliados por meio de métodos Bayesiano, com 10.000 replicações de *bootstrap*. Cada amostra esta representada pelo número de coleta (Tabela 1). Os números acima dos nós identificam o grau de suporte das associações, sendo que valores de *bootstrap* abaixo de 50% foram ocultados 67

Figura 2 - Árvore consenso das espécies sul-americanas de *Hypochoeris* obtida a partir de marcadores de AFLP, avaliados por meio de métodos *Neighbor-Joining*, com 10.000 replicações de *bootstrap*. Cada amostra esta representada pelo número de coleta (Tabela 1). Os números acima dos

nós identificam o grau de suporte das associações, sendo que valores de bootstrap abaixo de 50% foram ocultados..... 68

Figura 3 - Árvore consenso das espécies sul-americanas de *Hypochaeris* obtida a partir de sequências ITS, avaliados por meio de métodos Bayesianos, com 10.000 replicações de bootstrap. Cada amostra esta representada pelo número de coleta (Tabela 1). Os números acima dos nós identificam o grau de suporte das associações, sendo que valores de bootstrap abaixo de 50% foram ocultados 70

Figura 4 - Árvore consenso das espécies sul-americanas de *Hypochaeris* obtida a partir de sequências ITS, avaliados por meio de métodos *Neighbor-Joining*, com 10.000 replicações de bootstrap. Cada amostra esta representada pelo número de coleta (Tabela 1). Os números acima dos nós identificam o grau de suporte das associações, sendo que valores de bootstrap abaixo de 50% foram ocultados..... 71

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1** - Populações de *H. tropicalis*, amostradas na região sudoeste do Rio Grande do Sul, com as siglas utilizadas para citações das populações, número de indivíduos coletados (N), áreas de coleta com os respectivos números das populações coletadas (N) seguido da abreviatura dos nomes dos coletores. 29
- Tabela 2** - Combinações de primers seletivos de AFLP, número de fragmentos amplificados e porcentagem de polimorfismo por *primer* obtido em *H. tropicalis*..... 34
- Tabela 3** - Parâmetros de diversidade genética estimados para seis populações de *H. tropicalis* utilizando marcadores AFLP..... 35
- Tabela 4** - Análise de variância para dados moleculares (AMOVA) em seis populações de *H. tropicalis* 35
- Tabela 5** - Distância geográfica em km (acima da diagonal) e valores de F_{st} par a par (abaixo da diagonal) das populações de *H. tropicalis* estudadas. Valores significativos $P=0,01$ foi dada por 1023 permutações..... 36
- Tabela 6** - Sequências de pares de primers desenvolvidos para *H. catharinensis* (Chaves 2012) e *H. chillensis* (Lucio 2011), com os respectivos motivos, tamanho de pares de bases (pb) e número de alelos gerados (Na)..... 38
- Tabela 7** - Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade em nove locos de microssatélites para seis populações de *H. tropicalis*. N: número de indivíduos por população; A: número de alelos por população; Ae: número médio de alelos efetivos; Ap: número total de alelos privados; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; Fis: coeficiente de endogamia..... 39
- Tabela 8** - Análise de variância para dados moleculares (AMOVA) em seis populações de *H. tropicalis* a partir de marcadores SSR 40
- Tabela 9** - Médias e intervalo de confiança a 95% (IC) das distribuições de proporção de indivíduos não-migrantes e migrantes para seis populações de *H. tropicalis*, com base no método de atribuição bayesiana de Wilson e Rannala(2003) 40

- Tabela 10** - Teste de Wilcoxon para desequilíbrio de mutação-deriva, para nove locos microssatélites em seis populações de *H. tropicalis* ($P \leq 0,05$)..... 41
- Tabela 11** - Distância geográfica em km (acima da diagonal) e valores de F_{st} par a par (abaixo da diagonal) das populações de *H. tropicalis* estudadas. Todos os valores de F_{st} foram significativos ($P \leq 0,01$; 1023 permutações) entre pares de populações 42

ARTIGO 2

- Tabela 1** - Espécies, localização, números de indivíduos e número de acesso do Genbank para as espécies de *Hypochoeris* investigadas neste estudo. 59

SUMÁRIO

1.2	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	O Gênero <i>Hypochaeris</i>	15
2.2	<i>Hypochaeris tropicalis</i> Cabrera	17
2.3	Marcadores Moleculares	18
2.4	Estrutura genética de Populações	20
2.5	Filogenia do Gênero <i>Hypochaeris</i>	22
3.	Objetivos	23
3.1	Gerais	23
3.2	Específicos	23
4.	CONCLUSÃO GERAL	76
5.	REFERÊNCIAS GERAIS	77
6.	Artigo 1: Estrutura genética de populações de <i>Hypochaeris tropicalis</i> (Asteraceae) acessada por meio de marcadores moleculares AFLP e SSR	24
	Resumo	25
	Abstract	26
	INTRODUÇÃO	27
	MATERIAIS E MÉTODOS	28
	RESULTADOS	33
	DISCUSSÃO	43
	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
7.	Artigo 2: Filogenia de <i>Hypochaeris tropicalis</i> (Asteraceae): estudo de caso.....	54

Resumo	55
Abstract	56
INTRODUÇÃO	57
MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1.2 INTRODUÇÃO

Hypochoeris (Asteraceae, Lactuceae) é um gênero com mais de 15 espécies ocorrendo na Eurásia e noroeste da África (DeFillips, 1976; Oberprieler, 2002) e cerca de 50 espécies encontradas na América do Sul (Bortiri, 1999). Os processos de especiação recentes e aparentemente rápidos que tem ocorrido em *Hypochoeris* na América do Sul (Tremetsberger et al., 2005, 2006), combinados com cariótipos bimodais contendo poucos cromossomos, cujos tamanhos são relativamente grandes, oferecem um sistema que permite inferir sobre a importância dos rearranjos cromossômicos durante o processo de especiação (Stebbins, 1971; Cerbah *et al.*, 1995, 1998; Weiss *et al.*, 2003). Devido ao número e a morfologia cromossômica, o gênero *Hypochoeris* foi dividido em dois centros de diversificação, sendo a região mediterrânea considerada como centro primário e a América do Sul considerada como centro secundário, de diversificação (DeFillips 1976; Oberprieler 2002; Bortiri 1999; Stebbins 1971).

Estudos mostram que o gênero *Hypochoeris* teve origem na América do Sul a partir da introdução de um único ancestral oriundo do noroeste da África, por mecanismos de dispersão a longa distância (Tremetsberger et al., 2005 e 2006), porém esta origem não está completamente definida. *Hypochoeris angustifolia* foi sugerida como co-irmã do grupo sul americano, devido ao seu número cromossômico básico e sua assimetria cariotípica, encontrando suporte em trabalhos que utilizaram marcadores moleculares AFLP (Tremetsberger et al., 2005 e 2006). Em virtude de suas características biológicas, sua distribuição disjunta e sua diversificação rápida e recente no continente sul-americano, o gênero *Hypochoeris* é considerado um excelente modelo para estudos evolutivos (Stebbins, 1971; Cerbah et al., 1995, 1998a; Ruas et al., 1995; 2005; 2008; Weiss-Schneeweiss et al., 2003; 2007; 2008).

Hypochoeris tropicalis é uma espécie endêmica, restrita a poucas áreas ao sul do Rio Grande do Sul, com alguns relatos de ocorrência na província de Misiones na Argentina (Azevedo e Matzenbacher, 2007) e no Paraguai (Bortiri, 1999; Cabrera, 1963a). A espécie é pouco conhecida, tendo como principal característica cipselas sem rostro juntamente com folhas bem recortadas (Bortiri, 1999; Cabrera, 1963a). Nenhum estudo citogenético para definir sua estrutura cariotípica, e nenhum trabalho envolvendo

técnicas moleculares, tanto para estudos de estrutura genética, quanto para relações filogenéticas, foi realizado até o momento com esta espécie.

Marcadores moleculares vêm sendo aplicados para estudos em diversas espécies de *Hypochaeris*. Dentre eles, os marcadores SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) têm fornecido informações valiosas para a compreensão sobre a estrutura genética de populações e a filogenia do gênero (Stuessy et al. 2003, 2004; Tremetsberger et al. 2004; 2006, Muellner et al. 2005). Neste trabalho utilizamos os marcadores AFLP e SSR com o objetivo de investigar a estrutura genética de seis populações de *H. tropicalis*, distribuídas na região sudoeste do Rio Grande do Sul. Além disso, foram usadas sequências de ITS (Internal Transcribed Spacer) e AFLP para definir a posição filogenética de *H. tropicalis* entre as espécies do grupo sul-americano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Hypochaeris*

A família Asteraceae possui cerca de 1535 gêneros e 23.000 espécies, agrupadas em três subfamílias e 17 tribos (Bremer 1994; Judd et al., 1999). As espécies de Asteraceae apresentam uma ampla diversidade, sendo encontradas em diferentes ecossistemas, principalmente em campos e ambientes savânicos. Uma característica das Asteraceae é a presença de flores assentadas sobre um receptáculo comum cercado por brácteas, formando inflorescências denominadas capítulos (Leite 2002; Barroso 1991). Identificado como membro de Asteraceae, o gênero *Hypochaeris* é classificado na subfamília Cichorioidea K. Tam., da tribo Lactuceae Cass., subtribo Hypochaeriniinae Less., sendo Lactuceae a única tribo da família que se caracteriza por apresentar plantas com látex, associada com a presença de lígulas pentadentadas no ápice, pápus plumosos e páleas nos receptáculos. A polinização das flores do gênero *Hypochaeris* ocorre na maioria das vezes através do vento (anemófila) e de insetos (entomófila) (Bremer 1994; Cabrera 1976; Lane 1996).

O gênero *Hypochaeris* é representado por aproximadamente 65 espécies, das quais 15 ocorrem na Europa, Ásia e noroeste da África, enquanto cerca de 50 espécies são encontradas na América do Sul (Defillips 1976). Considerando o número e a

morfologia cromossômica, as espécies de *Hypochoeris* foram divididas em dois grupos distintos: região Mediterrânea como centro primário de origem e a América do Sul como centro secundário de diversificação do gênero (Stebbins 1971). Informações adicionais sobre a distribuição de sítios de DNA ribossômico confirmaram a divisão do gênero em dois grupos distintos, como inicialmente proposto (Cerbah et al., 1998a e 1998b; Weiss et al., 2003, 2007; Ruas et al., 2005). Além disso, a ancestralidade das espécies européias foi confirmada por meio da análise de fósseis, que possibilitaram a identificação de inúmeros tipos de pólen, evidenciando a existência de vários eventos de especiação naquela região (Cerbah et al. 1998a E 1998b).

As espécies de *Hypochoeris* encontradas na região Mediterrânea são subdivididas em cinco seções (*Achyrophorus*, *Euhypochoeris* Benth, *Metabasais* D. C., *Seriola* L. e *Robertia* D. C.), tendo como base as características morfológicas e o número básico de cromossomos, sendo encontrados $x = 3, 4, 5$ e eventualmente 6 (Hoffmann 1891). Estes números básicos estão associados a cariótipos simétricos que se assemelham aos das espécies de *Leontodon*, gênero próximo de *Hypochoeris*. Ao contrário da região Mediterrânea, as espécies da América do Sul apresentam cariótipos altamente assimétricos e bimodais, associados a um único número básico de $x = 4$ (Stebbins 1971; Cerbah et al. 1995, 1998B; Ruas et al. 1995, 2005).

Contrastando com grande número de espécies, o gênero *Hypochoeris* apresenta uma evolução rápida e recente na América do Sul, provavelmente como consequência da grande diversidade de habitats disponíveis, quanto à ocupação do gênero neste continente (Samuel et al. 2003). Embora ainda persistam muitas questões sobre a origem de *Hypochoeris* no continente sul-americano, foram encontradas características cromossômicas (número básico e assimetria cariotípica) similares as das espécies sul-americanas em *H. angustifolia*, espécie endêmica do Marrocos, sugerindo que esta seria uma co-irmã do grupo de *Hypochoeris* da América do Sul (Tremetsberger et al., 2005). Estudos apontam que as espécies sul-americanas tiveram origem possivelmente após dispersão a longa distância, a partir de uma única introdução de um ancestral hipotético do noroeste da África, durante o Plioceno ou Pleistoceno. Estes estudos encontram suporte em dados obtidos a partir de marcadores moleculares de AFLP, onde se observa que *H. angustifolia* ocupa um lugar intermediário entre as espécies do Mediterrâneo e as da América do Sul (Tremetsberger et al., 2005 e 2006).

As espécies sul-americanas de *Hypochaeris* refletem um padrão característico de radiação adaptativa, pois logo que chegou a América do Sul o gênero colonizou boa parte do território, exceto áreas extremamente áridas, florestas tropicais e costas de deserto servindo, portanto, como um modelo para estudos evolutivos e biogeográficos (Cabrera e Willink 1980; Tremetsberger et al., 2005). A forma de adaptação combinada com características cariotípicas pode fornecer informações importantes sobre os modos de especiação e os padrões biogeográficos do grupo sul-americano (Stebbins 1971; Cerbah et al. 1995, 1998A, 1998B; Ruas et al., 1995, 2005; Weiss et al., 2003, 2008). No Brasil são descritas 12 espécies de *Hypochaeris* as quais ocorrem, predominantemente, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Azevedo & Matzenbacher, 2007), muitas de distribuição restrita como *H. tropicalis*.

2.2 *Hypochaeris tropicalis* Cabrera

Hypochaeris tropicalis descrita pela primeira vez por Cabrera (1963a), é uma espécie com distribuição restrita a poucas áreas ao sudoeste do Rio Grande do Sul no Brasil e Uruguai além de alguns relatos de ocorrência na província de Misiones na Argentina (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007) e no Paraguai (Bortiri, 1999; Cabrera, 1963a). Esta espécie é encontrada em beiras-de-estrada, terrenos baldios e em áreas de pastagem, e por ser de porte pequeno e ter lígulas não vistosas é uma planta pouco notada (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007). *Hypochaeris tropicalis*, entretanto, apresenta características específicas que as diferenciam das demais espécies do gênero, tais como folhas estreitas e muito recortadas (Figura 1) e ausência de rostro nas cipselas (Bortiri, 1999).

Há poucos relatos na literatura sobre as características morfológicas de *H. tropicalis*. Sabe-se que a espécie é uma erva perene, com 11 a 37 cm de altura, raiz pivotante profunda, haste floral delgada, ereta, maciça e hirsuta e ramificação normalmente apical. As folhas são caulinares, situadas nas bifurcações da haste floral, alternas, rosuladas e sésseis, longamente hirsutas na face dorsal da nervura central, com margens irregularmente lobadas ou partidas. A inflorescência é do tipo cimera, com flores liguladas amarelas, que ultrapassam as brácteas involucrais. As cipselas são cilíndricas, ligeiramente atenuadas no ápice e na base, com cinco sulcos longitudinais e numerosas reentrâncias transversais, apresentando coloração que varia de bege a castanho-claro, quando imaturo, e castanho-escuro quando madura. As cipselas são

desprovidas de rostro, uma característica exclusiva entre as espécies do Rio Grande do Sul e que auxilia na sua identificação. Os papus são plumosos, unisseriados e de coloração castanha a branca, e sua frutificação ocorre entre os meses de novembro e dezembro (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007).



Figura 1: Espécie *Hypochaeris tropicalis* cultivada em casa de vegetação, na Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina-Pr.

2.3 Marcadores Moleculares

O desenvolvimento das técnicas de Biologia Molecular possibilitou a aplicação de ferramentas, que permitem detectar com maior facilidade a variabilidade existente diretamente ao nível de DNA. Entre estas ferramentas, a reação em cadeia da polimerase (PCR), introduzida na década de 80 por Kary Mullis, tornou possível a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, causando uma revolução nas investigações genéticas. Aplicada a estudos filogenéticos e em genética de populações, a técnica de PCR produz uma grande quantidade de informações, permitindo uma maior compreensão dos processos de especiação, padrões de biogeografia, bem como sobre a estrutura genética de populações (Sebbenn 2001; Telles et al., 2003; Ferreira e Grattapaglia 1998).

Entre os marcadores moleculares que fazem uso da PCR, os AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) têm sido amplamente utilizados em estudos genéticos de plantas, pois associa o polimorfismo gerado por enzimas de restrição à capacidade de detecção da técnica de PCR. Apesar de algumas limitações, visto que são marcadores de natureza dominante, o que diminui a quantidade de informações geradas por loco, os marcadores AFLP apresentam vantagens, como a não necessidade de informação prévia da sequência de DNA e a utilização de primers mais longos, comparado com os primers de RAPD, o que aumenta significativamente a especificidade da amplificação, evitando

com isso a competição que ocorre durante a PCR, além de acessar todo o genoma e ter grande reprodutibilidade (Ferreira e Grattapaglia 1998).

A análise de AFLP consiste de quatro etapas distintas; a) clivagem do DNA genômico com enzimas de restrição; b) ligação de adaptadores específicos, que possuem terminais complementares as extremidades resultantes da clivagem pelas enzimas de restrição; c) reação pré-seletiva, que faz uso de um par de primers que correspondem à sequência dos adaptadores com uma base adicional, possibilitando uma redução significativa na quantidade de fragmentos e; d) reação seletiva, que permite a adição de 1-3 bases adicionais aos primers pré-seletivos, gerando os produtos de amplificação que são usados para a análise genética. Os fragmentos gerados na amplificação seletiva são então separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, ou por eletroforese capilar utilizando equipamentos e programas específicos.

A técnica de AFLP tem sido aplicada com sucesso em estudos do gênero *Hypochaeris*, tanto para a determinação das relações filogenéticas interespecíficas como para estudos sobre estrutura genética de populações. Os resultados obtidos têm mostrado a eficiência destes marcadores em fornecer informações, que auxiliem na compreensão sobre os processos de radiação adaptativa do gênero no continente sul-americano (Stuessy et al., 2003, 2004; Tremetsberger et al., 2003A, 2003B; Tremetsberger et al., 2004; 2006; Ortiz et al., 2007; Reck et al., 2011; Rodrigues, 2010).

Outra classe de marcadores moleculares que também faz uso da PCR compreende os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*). Os SSRs têm sido os marcadores mais utilizados para identificação de polimorfismo, principalmente devido a sua característica codominante (Ferreira e Grattapaglia 1998). São constituídos por sequências curtas (2 a 5 pares de base) repetidas em *tandem*, que ocorrem em forma de unidades repetitivas de mono, di, tri e tetra nucleotídeos (Tautz, 1989). Além disso, os SSRs são amplamente distribuídos em todo o genoma dos eucariotos, possuindo um loco gênico altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo (Dutech et al., 2007). Devido às sequências de repetições estarem localizadas preferencialmente em regiões não codificadoras, e por sofrerem mutações sem os efeitos da seleção, os SSR são considerados marcadores neutros (Ellegren, 2004). Entretanto, há evidências de SSRs em regiões codificantes (Oliveira et al., 2006).

As regiões de SSR são consideradas instáveis, pois estão sob influência de alterações mutacionais do tipo adição ou deleção, que ocorrem devido ao deslizamento da enzima DNA polimerase (*slippage*) durante a replicação, e também ao *crossing-over* desigual (Moreira, 2006; Tautz, 1992). Devido a essa instabilidade, três modelos mutacionais foram criados para explicar sua evolução dos microssatélites: a) *Stepwise Mutation Model* (SMM), que considera ocorrência de evolução por eventos simples “passo a passo”; b) *Infinite-Allele Model* (IAM), que considera que a evolução ocorre infinitamente de forma a gerar perfis moleculares distintos dos existentes e; c) *Two-Phase Model* (TPM), considerado um modelo intermediário entre SMM e IAM (Sainudiin, et al., 2004).

A maior limitação à aplicação dos SSRs é a necessidade do desenvolvimento prévio dos marcadores, por meio de procedimentos de custo elevado. A amplificação dessas regiões se dá via PCR, através de iniciadores específicos, geralmente de tamanho entre 20 a 25pb, os quais são obtidos a partir de banco genômicos enriquecidos em microssatélites (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Como alternativa para minimizar os custos da técnica de SSR, tem sido utilizada a amplificação heteróloga ou transferibilidade, que consiste no uso de iniciadores já desenvolvidos para espécies geneticamente relacionadas (Tautz, 1989). A transferibilidade de SSR em plantas é bem sucedida, principalmente dentro de um mesmo gênero, com frequência de sucesso de quase 60% em dicotiledôneas e perto de 40% em monocotiledôneas (Barbará et al., 2007).

Devido à diversidade alélica e o alto conteúdo informativo, essa técnica tem sido aplicada com sucesso em estudos de genética de populações no gênero *Hypochaeris*, permitindo comparações dentro e entre populações (Lucio, 2011; Chaves, 2012). As análises realizadas a partir de dados de SSR tem permitido fazer inferências sobre a história evolutiva de várias espécies de plantas, possibilitando avaliar atributos genéticos importantes para estudos evolutivos, de genética de populações, mapeamento genético e de identificação de genótipos (Hughes; Queller, 1993; Ferreira e Grattapaglia, 1998).

2.4 Estrutura genética de Populações

A estrutura genética de populações é dada pelo padrão de variação genética entre e dentro de populações naturais (Dias, 2006). Porém esse padrão pode ser influenciado pelo modo de reprodução, tamanho populacional, distribuição geográfica e fluxo gênico (Hamrick 1982). Para que as populações sejam consideradas estruturadas é necessário que apresentem um equilíbrio dinâmico entre fatores de diferenciação (deriva e seleção natural) e fatores de homogeneização (fluxo gênico), sendo que cada fator deve variar de acordo com o tamanho populacional e área de distribuição da espécie (Solé-Cava 2001).

Entre os fatores que influenciam na estrutura das populações estão incluídos a deriva genética e o fluxo gênico. A deriva se refere a uma flutuação aleatória na frequência alélica, levando eventualmente, a fixação/perda de alelos. Populações que apresentam efeito de deriva genética têm como principais consequências a perda de variação dentro de populações e possível divergência genética entre elas (Futuyma 1992). Segundo Ridley (2006), quanto menor o tamanho efetivo da população maior a intensidade do efeito de deriva genética, enquanto em populações suficientemente grandes, o efeito da deriva é desprezível. Por outro lado, o fluxo gênico apresenta efeitos contrários aos da deriva genética, tendo a função de movimentar os genes de uma população para outra (Slatkin 1985). Segundo Wright (1931) o fluxo gênico reduz a diferenciação genética entre as populações, sendo responsáveis pela introdução de novas variações genéticas na população receptora. As populações evoluem de forma conjunta se o fluxo gênico entre elas forem altas, porém se esta for baixa, as populações podem divergir e se tornarem reprodutivamente isoladas (Slatkin 1994).

Existem diversos modelos de fluxo gênico, dentre eles os mais comuns são: a) o modelo continente-ilha, onde o fluxo de alelos ocorre em uma única direção, partindo de uma população grande para uma menor e isolada; b) o modelo de ilhas, onde o movimento de alelos se dá ao acaso, em qualquer direção; c) o modelo *stepping-stone*, onde o fluxo ocorre apenas entre populações vizinhas e; d) o modelo de isolamento por distância, onde o fluxo de alelos ocorre somente entre vizinhos próximos (Futuyma 1992).

Por fim, a genética de populações tem como objetivo descobrir mecanismos evolutivos que atuam sobre as populações naturais, onde para alcançar esses objetivos, diferentes técnicas da biologia molecular em conjunto com programas computacionais vêm sendo utilizados para determinar com maior exatidão os processos evolutivos,

contribuindo assim para o melhor entendimento das diferenciações entre populações naturais (Avice 2004).

2.5 Filogenia do gênero *Hypochoeris*

A filogenética é uma área da genética que atua de forma complementar a classificação taxonômica tradicional. Onde através do uso de ferramentas tecnológicas, grande quantidade de dados moleculares é gerada, possibilitando uma maior compreensão sobre a diversidade biológica (Mortiz e Hillis, 1996). Uma dessas ferramentas inclui os marcadores moleculares, que tem se tornando cada vez mais frequentes em análises filogenéticas, contribuindo para esclarecer melhor a relação entre as espécies (Buso, 2005).

Estudos moleculares com espécies de *Hypochoeris*, representando o centro de origem e de diversificação do gênero, foram realizados por meio de sequências de regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) nuclear, genes de cloroplastos e AFLP. Os resultados mostraram uma baixa divergência entre as sequências de DNA do grupo sul-americano, sugerindo assim uma origem monofilética para o grupo (Samuel et al., 2003). Por meio de AFLP Tremetsberger (2005) identificou a espécie *Hypochoeris angustifolia*, endêmica do Marrocos, como sendo co-irmã das espécies do grupo sul-americano, visto que ficou evidente que *H. angustifolia* ocupa uma posição filogenética intermediária entre as espécies do Mediterrâneo e as da América do Sul. Dados de AFLP (Tremetsberger et al., 2006 e Reck et al., 2011) possibilitaram a identificação de seis clados moleculares, separando as espécies sul-americanas de *Hypochoeris* incluindo: 1) grupo Apargioides (*H. apargioides*, *H. clarinoides*, *H. gayana*, *H. spathulata* e *H. thrincioides*); 2) grupo Chondrilloides (*H. chondrilloides*, e *H. patagonica*); 3) grupo Microcephala (*H. alba*, *H. albiflora*, *H. argentina*, *H. chillensis*, *H. microcephala* e *H. parodii*); 4) grupo Pampasica (*H. megapotâmica*, *H. pampasica* e *H. pinnatifida*); 5) grupo Sessiliflora (*H. echegarayi*, *H. eremophila*, *H. meyeniana*, *H. sessiliflora* e *H. taraxacoides*); 6) grupo Tenuifolia (*H. acaulis*, *H. hookeri*, *H. incana*, *H. palustris* e *H. tenuifolia*); 7) grupo Lutea (*H. catharinensis* e *H. lutea*).

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais:

Fazer uso de marcadores moleculares para investigação genética de *Hypochoeris tropicalis*, identificando características biológicas (perfis moleculares e citogenéticos) e fatores ecológicos que possam estar relacionados com os mecanismos evolutivos ocorridos no estabelecimento e fixação da espécie, como forma de determinar a estrutura genética de populações da espécie bem como seu posicionamento filogenético dentro do grupo sul-americano.

3.2 Específicos:

- Aplicar a técnica de AFLP, para acessar a diversidade e a estruturação genética em diferentes populações de *H. tropicalis*;
- Avaliar a transferibilidade de marcadores microssatélites das espécies *Hypochoeris chillensis* e *Hypochoeris catharinensis* para aplicação nos estudos de populações de *H. tropicalis*.
- Aplicar a técnica de AFLP e utilizar sequência de ITS para investigar o posicionamento de *H. tropicalis* dentro do grupo do sul – americano.
- Identificar os fatores que contribuíram para a estruturação das populações e os processos filogenéticos e evolutivos do gênero na América do Sul.

6. Artigo 1

Estrutura genética de populações de *Hypochaeris tropicalis* (Asteraceae)
acessada por meio de marcadores moleculares AFLP e SSR

*Este artigo será submetido à revista **Genética**.

Resumo

Hypochaeris é considerado modelo para estudos evolutivos e biogeográficos. Neste trabalho utilizamos marcadores de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) e de microssatélites (SSR-Simple Sequence Repeats) a fim de acessar a estrutura genética em uma amostra de 183 indivíduos de seis populações de *Hypochaeris tropicalis*, uma espécie com distribuição restrita, que está sendo incluída pela primeira vez em estudos moleculares. A partir de seis combinações de primers seletivos de AFLP, foram obtidos 1.488 marcadores com uma média de 67% de polimorfismo. A percentagem de locos polimórficos (P) e os índices de diversidade gênica (Hs) variaram de 46,84% a 71,05% e 0,1077 a 0,1445 respectivamente. A análise de variância para dados moleculares (AMOVA) mostrou que maior parte da variação (89,54%) se encontra dentro das populações. A análise Bayesiana de agrupamentos identificou dois *clusters* principais, um deles agrupando quatro populações e o outro com duas populações. Para a análise de microssatélites foram utilizados primers específicos desenvolvidos para duas espécies (*H. catharinensis* e *H. chillensis*) próximas a *H. tropicalis*. Nove pares de primers mostraram ótimo padrão de transferência e foram usados para acessar a diversidade genética da espécie. Foi identificado um total de 56 alelos com uma média de 6,2 alelos por loco nas seis populações. A heterozigosidade média foi de 0,52, para heterozigosidade observada e 0,41 para heterozigosidade esperada, onde todas as populações exibiram excesso de heterozigotos. O teste F-Wright (Fis) com a correção de Bonferroni evidenciou a presença de endogamia em três das seis populações. A análise de deriva genética indicou uma redução no tamanho efetivo em cinco populações, porém a presença de fluxo gênico foi verificada entre as populações. A análise de variância foi congruente entre os dados de AFLP e SSR, mostrando baixa diferenciação genética entre populações de *H. tropicalis* sugerindo que a espécie apresenta sistema de reprodução predominantemente alógama. Como evidenciado pela estatística Bayesiana, a falta de estruturação das populações de *H. tropicalis* pode estar associada à diversificação recente e rápida do gênero *Hypochaeris* na América do Sul.

Palavras-chave: *Hypochaeris*, AFLP, SSR, Diversidade genética.

Abstract

Hypochoeris is considered a biological model to understand evolutionary and biogeographic processes in the vascular flora of South America. We use AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) and microsatellites (*SSR-Simple Sequence Repeats*) to access the genetic structure in a sample of 183 individuals belonging to six populations of *Hypochoeris tropicalis*, a species with restrict distribution that is under molecular studies for the first time. Six selectives AFLP primer combinations were used rendered 1.488 markers with 67% of polymorphism. The percentage of polymorphic loci and the genetic diversity indexes varied from 46.84% to 71.05% and from 0.1077 to 0.1445, respectively. AMOVA showed that most of the variation (89.54%) is found within rather than between (10.46%). Bayesian analysis identified two main clusters, the first comprising four populations and the second with two populations. For microsatellite analysis we used specific *primer* pairs developed for two sister species (*H. catharinensis* e *H. chillensis*) of *H. tropicalis*. Nine primers pairs showed high levels of amplification and they were applied to access the genetic diversity in the six populations of *H. tropicalis*. The SSR identified a total 56 alleles with an average of 6.2 alleles per locus. The average heterozygosity was 0.52 and 0.41 for observed heterozygosity and expected heterozygosity, respectively, with all populations exhibiting heterozygosity excess. Wright-F test (F_{is}) with the Bonferroni correction identified the presence of inbreeding in three of the six populations. Genetic drift analysis indicated a reduction in the effective size in five populations, but the presence of gene flow was observed among populations. Variance analysis for molecular data (AMOVA) was congruent between SSR and AFLP data, evidencing a low genetic differentiation among populations, thus suggesting that the reproductive system of *H. tropicalis* is preferably allogamous. In addition, as showed by Bayesian statistics, there was absence of population genetic structures in *H. tropicalis*, possible because the recent and rapid diversification of the genus in South America.

Key words: *Hypochoeris*, AFLP, SSR, Genetic diversity.

INTRODUÇÃO

O gênero *Hypochaeris* ocorre particularmente em regiões subtropicais e temperadas, podendo ser encontradas em diferentes ecossistemas, tais como: campos, ambientes savânicos e florestas abertas (Barroso 1991; Cabrera 1929, Matzenbacher 1985; Garcia et al. 2000). Possui mais de 15 espécies ocorrendo na Europa, Ásia e noroeste da África, e cerca de 50 espécies na América do Sul (Defillips 1976; Oberprieler 2002; Bortiri 1999). Com base no número e na morfologia cromossômica, o gênero foi dividido em dois centros de diversificação, sendo a região mediterrânea como centro primário e a América do Sul como centro secundário (Stebbins 1971).

O número de espécies de *Hypochaeris* na América do Sul pode ser explicado como resultado da grande diversidade de habitats disponíveis nesta região, favorecendo a atuação de fenômenos de radiação adaptativa rápida e recente, onde através de uma única espécie ancestral, episódios repetidos de especiação foram capazes de gerar numerosos tipos de descendentes com características distintas (Stuessy et al. 2003; Samuel et al. 2003). As características encontradas em *Hypochaeris* permitem que o gênero seja considerado um excelente modelo para estudos evolutivos e biogeográficos. Estudos cromossômicos, de organização cariotípica, assim como (Stebbins 1971; Cerbah et al. 1995, 1998a; Ruas et al. 1995, 2008; Weiss-Schneeweiss et al. 2003; 2007 2008;), filogenéticos (Cerbah et al. 1998b; Samuel et al. 2003; Stuessy et al. 2003; Tremetsberger et al. 2005, 2006; Reck et al. 2011) e de estruturas populacionais (Tremetsberger et al. 2003a, 2003b; Muellner et al. 2005; Mix et al. 2006; Terrab et al. 2009; Rodrigues 2010; Reck et al. 2010; Lucio 2011; Chaves 2012) tem sido realizado com sucesso no gênero.

Dentre as espécies de *Hypochaeris* da América do Sul, *H. tropicalis* é uma espécie pouco conhecida, com distribuição restrita a poucas áreas ao sudoeste do Rio Grande do Sul no Brasil e Uruguai, além de alguns relatos de ocorrência na província de Misiones na Argentina (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007) e no Paraguai (Bortiri, 1999; Cabrera, 1963a). Esta espécie é encontrada em beiras-de-estrada, terrenos baldios e em áreas de pastagem, que se caracterizam por apresentar relevo plano, com solos ricos em basalto e arenito, com vegetação predominante de campo sujo, sendo composto por arbustos, subarbustos e herbáceas, principalmente gramíneas,

que proporciona uma boa cobertura ao solo. Além disso, a pouca profundidade destes solos os torna impróprios para a agricultura, sendo explorados para atividades agropastoris (Girardi-Deiro, 2008). Por ser de porte pequeno e ter lígulas não vistosas, *H. tropicalis* é uma planta pouco notada (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007), entretanto, apresenta características específicas que as diferenciam das demais espécies do gênero, tais como folhas estreitas e muito recortadas e ausência de rostro nas cipselas (Bortiri, 1999).

A quantidade de variação genética em uma espécie e sua distribuição entre e dentro das populações é determinada por um grande número de fatores, tais como sistema de reprodução, fatores ecológicos, disponibilidade de habitat, migração entre populações e eventos históricos (Ortiz et al. 2008). Porém para que as populações sejam consideradas estruturadas é necessário que apresentem um equilíbrio dinâmico entre fatores de diferenciação (deriva e seleção natural) e fatores de homogeneização (fluxo gênico), sendo que cada fator deve variar de acordo com o tamanho populacional e área de distribuição da espécie (Solé-Cava 2001).

Diversas técnicas de marcadores moleculares vêm beneficiando tanto as análises de genética de populações, quanto os estudos taxonômicos, evolutivos e ecológicos (Agarwal et al. 2008; Castillo et al. 2008). Dentre essas técnicas destacam-se o AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) e os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), sendo que o primeiro apresenta vantagens decorrentes do número de marcadores gerados por ensaio, enquanto o segundo tem sido amplamente utilizado por apresentar um alto conteúdo de informações polimórficas, devido sua natureza codominante. Neste trabalho utilizamos métodos para obtenção de dados moleculares (AFLP e SSR) com o objetivo de investigar a estrutura genética de seis populações de *H. tropicalis*, distribuídas na região sudoeste do Rio Grande do Sul, contribuindo com informações relevantes que auxiliem nos estudos filogenéticos e evolutivos do gênero *Hypochaeris*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material amostrado

Foram coletadas amostras de seis populações de *H. tropicalis* distribuídas ao sudoeste do Rio Grande do Sul (Tabela 1) e colocados aquênios para germinação em casa de vegetação, a fim de se coletar meristemas radiculares e folhas, necessários aos estudos citogenéticos e moleculares, respectivamente. Alguns indivíduos de cada população foram preservados em exsiccatas para serem depositados no Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL). As áreas de coleta das populações de *H. tropicalis* se caracterizam por apresentar relevo plano, com solos ricos em basalto e arenito, com vegetação predominante de campo sujo, sendo composto por arbustos, subarbustos e herbáceas, principalmente gramíneas, que proporciona uma boa cobertura ao solo. Além disso, algumas populações foram amostradas e em áreas de pastagens, ricas em matéria orgânica. A pouca profundidade destes solos os torna impróprios para a agricultura, sendo explorados para atividades agropastoris (Girardi-Deiro 2008).

Tabela 1: Populações de *H. tropicalis*, amostradas na região sudoeste do Rio Grande do Sul, com as siglas utilizadas para citações das populações, número de indivíduos coletados (N), áreas de coleta com os respectivos números das populações coletadas (N) seguido da abreviatura dos nomes dos coletores.

Populações	N	Localização das coletas e coordenadas geográficas
AL	23	Rodovia RS 306 (Rio Grande do Sul), Próximo a Alegrete, 29°57'38.16"S 055°39'44.17"W; N80, CR, PR, AS, ER.
IT	34	BR 472, próximo à Itaqui, RS, 29°03'00.19"S 056°11'49.52"W; N82, CR, PR, AS, ER
ROA	25	BR 377, Rodovia Osvaldo Aranha Próximo à Uruguaiana, RS, 29°54'42"S 056°21'40"W; N84, CR, PR, AS, ER.
URU	42	BR 293, Próximo à Uruguaiana, RS, 30°03'43"S 56°25'59"W; N86, CR, PR, AS, ER.
ART	30	BR 377, RS; próximo à fronteira com Uruguai (cidade de Artigas), 30°10'32" S 56°27'50"W; N87, CR, PR, AS, ER - (FUEL 53.052).
RI	29	BR 293, RS, Próximo à Rivera, no Uruguai, 30°36'11"S 55°58'14"W; N91, CR, PR, AS, ER - (FUEL 53.052).

Abreviações dos coletores: CR, Claudete F. Ruas; PR, Paulo M. Ruas; AS, Angelo A. Schneider; ER, Eduardo A. Ruas; FUEL – Herbário da Universidade Estadual de Londrina.



**LEGENDA: ART – Artigas, URU – Uruguaiana, ROA – Rodovia Osvaldo Aranha
IT – Itaqui, AL – Alegrete, RI – Rivera**

Figura 1: Mapa representativo das seis áreas de coleta de *Hypochaeris tropicalis* (conforme Tabela 1) situadas no sudoeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Análise genética

Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de folhas jovens armazenadas em sílica gel, usando o método CTAB (cetyltrimethylammonium bromide, Sigma-Aldrich, Missouri-USA) como proposto por (Doyle e Doyle 1987) com pequenas modificações. Brevemente, a extração com clorofórmio- álcool isoamílico foi realizado duas vezes e ao sobrenadante foi adicionado 1000uL de CTAB para precipitação (CTAB 2%, 20mM-EDTA 0,5M, 100mM-Tris-Hcl 1M e H₂O destilada). Em seguida as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 min, e diluídas em TE (0,1mM) acrescido de NaCl (1M) e 1000ul de etanol 95% gelado. Após incubação por 1h a -20° as amostras foram centrifugadas, sendo o precipitado submetido a duas lavagens com álcool 70% e diluído em TE (0,1mM). A qualidade do DNA total obtido, foi verificado por eletroforese em gel de agarose (1%). A concentração de DNA foi estimada utilizando o quantificador NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific, Califórnia-USA).

Reações de AFLP

Para cada amostra cerca de 700ng do DNA genômico foi digerido com 1 U de *MseI* e 5 U de *EcoRI* (Thermo Scientific, Califórnia-USA), em volume total de 20 μ L a 37°C por 12 h. Os fragmentos gerados foram ligados a adaptadores específicos, conforme descrito por Vos et al. (1995). Os produtos da restrição e ligação foram diluídos em 1:4 em água ultra-pura, para posteriormente serem utilizados nas ampliações. A amplificação pré-seletiva foi realizado utilizando o kit GoTaq® *Green Master Mix* (Promega, Winchester-USA), primers pré-seletivos (5 μ M) *EcoRI* + A e *MseI* + C (4,75 μ L), 3,0 μ L da diluição restrição-ligação e água ultra pura, para completar o volume de 10 μ L. O programa da amplificação pré-seletiva foi realizada em 1 ciclo de 72°C por 2 min, 20 ciclos de 90°C por 1 s, 56°C por 30 s e 72°C por 2 min seguido de 1 ciclo final de 60°C por 30 min. Em seguida, 5 μ L da reação pré-seletiva foi colocada em gel de agarose 1%, para se verificar o padrão dos fragmentos, e os 5 μ L restantes foram diluídos em 40 μ L de água ultrapura. A amplificação seletiva foi realizada com seis combinações de primers marcados com fluoróforos (*EcoRI*-AGC (FAM)/*MseI*-TG; *EcoRI*-AGC (HEX)/*MseI*-CTAG; *EcoRI*-AGC (NED)/*MseI*-CAAG; *EcoRI*-ACT (FAM)/*MseI*-CTT; *EcoRI*-ACT (HEX)/*MseI*-CAAG; e *EcoRI*-ACT (NED)/*MseI*-CTAG. As reações seletivas foram compostas dos primers seletivos *MseI* (5 μ M) e *EcoRI* (1 μ M), 3,5 μ L de master mix para PCR GoTaq® *Green Master Mix*, (Promega, Winchester-USA), 2,5 μ L da reação de pré-amplificação diluída e 2,92 μ L de água ultrapura para completar o volume de 10 μ L. O programa para amplificação foi composto por 1 ciclo de 94°C por 2 min, 65°C por 30 s e 72°C por 2 min; 8 ciclos de 94°C por 1 s, 64°C por 30 s e 72°C por 2 min; 23 ciclos de 94°C por 1 s, 56°C por 30 s e 72°C por 2 min e 1 ciclo final de 60°C por 30 min. A resolução dos fragmentos foi realizada por eletroforese capilar usando o sistema disponível no analisador automático de DNA modelo 3500xL (Applied Biosystems, Califórnia-USA).

Análise estatística para dados de AFLP

O número de locos polimórficos, a diversidade gênica de Nei (H_S) (1978), a variabilidade genética entre e dentro das populações, o Índice de Fixação Alélica (F_{st}) e o F_{st} par a par foram calculadas utilizando o programa Arlequin versão 3.11 (Excoffier et al., 2005). O dendrograma foi obtido a partir de uma matriz de distância genética de Nei (1978), usando o método de agrupamentos UPGMA (Sokal; Michener, 1958),

disponível no programa TFPGA 1.3 (MILLER 1997). O programa FAMD versão 1.3 (Schlüter; Harris, 2006) foi utilizado para a análise da coordenada principal, número de fragmentos fixados e privados. O teste para identificar uma possível correlação entre distância genética e geográfica foi realizado com base nos valores F_{st} e a distância em Km entre pares de populações, por meio do teste de correlação de Pearson, disponível no software Bioestat 5.0 (Ayres et al. 2007). Para identificar a formação de grupos (k) das populações, foi utilizado o programa Structure versão 2.3.3 (Hubisz et al. 2009), onde a análise do número de clusters foi realizada seguindo o modelo misto com período de comprimento de 10000 e 100000 repetições. O número de clusters foi determinado de acordo com o método de Evano et al. (2005).

Amplificação de Regiões Microssatélites

Para o estudo das regiões de microssatélites foram utilizados nove pares de primers, desenvolvidos previamente para duas espécies próximas (*H. catharinensis* e *H. chillensis*), conforme descrito na Tabela 6. Para a genotipagem foi utilizada a marcação indireta por fluoróforos, por meio do sistema que tem como base a adição de três primers na reação de PCR, conforme descrito em Schuelke (2000). Neste método, uma cauda de sequência M13 (TGTAACGACGGCCAGT) é adicionada na extremidade 5' do *primer*. As reações de amplificação continham 4,5µL de GoTaq Green Master Mix (tampão 2x, pH 8,5, 1600µM dNTP e MgCl 3mM; Promega, Winchester-USA), 0,08µL de *primer forward* (5pM), 0,32µL de *primer reverse* (5pM), e 0,32µL de *primer M13* (5pM), marcado com um fluoróforo (Ned, Hex, 6-Fam) (5pM), 1µL de DNA (10,0ng) e 3,78µL de água livre de nucleases para ajustar o volume final para 10µL.

As reações de PCR foram feitas utilizando-se termociclador PTC200 (MJ Research, Massachusetts-USA), no programa *Touchdown*, onde a temperatura inicial de anelamento foi de 65°C para cada *primer*. Os ciclos de PCR consistiram de: 1 ciclo de 94°C por 4 minutos, seguido de 12 ciclos de 94°C por 30s, 65°C por 30s, em cada ciclo de PCR diminuía-se 1°C por ciclo de anelamento até a temperatura de 55°C, e extensão de 72°C por 30s; seguindo 29 ciclos adicionais de 94°C por 30s, 55°C por 30s e 72°C por 30s; um ciclo de 94°C por 30s, 54°C por 30s e 72°C por 30s; 7 ciclos de 94°C por 30s, 53°C 45s e 72°C por 45s; com uma extensão final de 60°C por 40 minutos. O produto final da amplificação foi submetido à eletroforese capilar no sequenciador automático 3500xL (Applied Biosystems, Califórnia-USA).

Análise estatística para dados de SSR

Para os dados de microssatélites foi utilizado o programa Gene Marker v. 2.6, que permite determinar o tamanho dos alelos, usando como padrão o marcador de peso molecular GeneScan™ 600-LIZ® Size Standard (Life Technologies, Califórnia-USA). Por meio de matrizes de dados os resultados foram organizados e submetidos aos seguintes programas computacionais: a) FSTAT (Goudet 2014) aplicado para a análise da variabilidade genética dentro das populações, o número de alelos por loco (A), o número de alelos efetivos (A_e), número de alelos privados (A_p), heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) e o coeficiente de endogamia (Fis), onde para cada população foi realizada a correção de Bonferroni, a fim de verificar se estas estavam em desequilíbrio de Hardy-Weinberg; b) COANCESTRY (Wang 2010), usado para confirmar o coeficiente de endogamia; c) Micro-Checker 2.2.3. (Van Oosterhout et al. 2004) aplicado para detectar possíveis alelos nulos, como bandas *Stutter* que ocorrem durante a PCR e afeta a leitura dos SSRs; d) BOTTLENECK (Cornuet; Luikart 1996, 1999; Piry 1999) utilizado para verificar se as populações passaram por gargalo genético recente, levando em conta os três modelos evolutivos para locos de SSRs; e) ARLEQUIN v. 3.11 (Excoffier; Laval; Schneider 2005) utilizado análise de variância molecular (AMOVA) para análise de variabilidade genética total entre e dentro de populações e o índice de fixação alélica (F_{st}); f) BAYESASS (Wilson; Rannala 2003) aplicado para estimar o fluxo gênico pelo método bayesiano; g) Bioestat 5.0 (Ayres et al. 2007) para verificar uma possível correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas (teste de Pearson), feito com base nos valores F_{st} entre pares de populações; h) Structure v.2.3.3 (Hubisz et al. 2009) usado para identificar a formação de grupos (K) de populações geneticamente similares, seguindo o modelo misto de *clusters* com período de comprimento de 10000 e 100000 repetições e o número de *clusters*, determinado de acordo com Evanno; Regnaut; Goudet (2005); i) O programa Genepop v.3.4 (RAYMOND; ROUSSET 1995) foi utilizado para calcular o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg (GUO; THOMPSON 1992); j) O programa TFPGA 1.3 (MILLER 1997) para a realização de um dendrograma obtido a partir de uma matriz de distância genética de Nei (1978), usando o método de agrupamentos UPGMA (Sokal; Michener, 1958).

RESULTADOS

Marcadores AFLP

Seis combinações de primers de AFLP foram aplicadas ao estudo de seis populações de *H. tropicalis* produziram um total de 1.488 marcadores com 67% de polimorfismo (Tabela 2). A porcentagem de locos polimórficos apresentou uma variação de 46,84% na população de Itaqui (IT) a 71,05% na população de Uruguaiana (URU) com uma média de 54,83% entre as populações (Tabela 3).

Tabela 2. Combinações de primers seletivos de AFLP, número de fragmentos amplificados e porcentagem de polimorfismo por *primer* obtido em *H. tropicalis*.

Combinações de Primers	Número de Marcadores	Porcentagem de polimorfismo
EcoRI – AGC + MseI – CTAG	193	55
EcoRI – AGC + MseI – TG	249	66
EcoRI – AGC + MseI – CAAG	280	74
EcoRI – ACT + MseI – CAAG	315	63
EcoRI – ACT + MseI – CTT	262	77
EcoRI – ACT + MseI – CTAG	189	71
Total	1.488	Média 67

Os índices de diversidade gênica observados em *H. tropicalis* entre as seis populações, variaram de 0,1077, na população Itaqui (IT) a 0,1445 na população de Uruguaiana (URU) (Tabela 3). Os números de fragmentos privados e fixados estimados para cada população mostraram variação entre 3,6, para população da Rodovia Osvaldo Aranha (ROA), e 16,8 para a população de Uruguaiana (URU), enquanto os fragmentos fixados variaram de 0,66, para população Uruguaiana (URU), a 7,3 para a população de Artigas (ART) (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros de diversidade genética estimados para seis populações de *H. tropicalis* utilizando marcadores AFLP.

Populações	N	P%	Hs	Frag _(priv)	Frag _(fix)
AL	23	59,34	0,1414	11,6	2,6
IT	34	46,84	0,1077	5,5	6,6
ROA	25	48,26	0,1291	3,6	0,83
URU	42	71,05	0,1445	16,8	0,66
ART	30	49,13	0,1181	7,3	7,3
RI	29	54,33	0,1285	9,1	5,3
Média	—	54,83	0,1282	8,98	3,88

N= número de indivíduos; P%= porcentagem de locos polimórficos; Hs = diversidade genética de Nei; Frag (priv) = fragmentos privados; Frag (fix) = fragmentos fixados;

A análise de variância para dados moleculares (AMOVA), aplicada aos marcadores de AFLP, mostrou que a maior parte (91,06%) da variância genética de *H. tropicalis* se encontra dentro das populações comparada com a variância entre populações de 8,94% (Tabela 4). E a análise do índice de fixação entre populações mostrou uma diferenciação interpopulacional baixa, com um valor de $F_{st} = 0,08945$ para *H. tropicalis*.

Tabela 4. Análise de variância molecular (AMOVA) aplicada a marcadores AFLP para seis populações de *H. tropicalis*.

Fontes de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre populações	5	1204.184	6.00651	8,94**
Dentro de populações	177	10700.523	61.14585	91,06
Total	182	11904.707	67.15236	
Índice de fixação	$F_{st} = 0,08945$			

G.L = graus de liberdade. ** $p < 0,01$ (teste de significância para 1023 permutações).

As estimativas da distância genética entre populações, calculadas pelo F_{st} par-a-par, mostraram que a menor distância genética (0,04611) foi verificada entre as populações de Uruguaiana (URU) e Alegrete (AL), separadas geograficamente por

70,7km. A maior distância genética (0,12390) foi observada entre as populações de Itaqui (IT) e Artigas (AL) distantes 103,5km uma da outra (Tabela 5). O teste de Pearson não mostrou correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas ($r = -0,1014$; $P = 0,7191$).

Tabela 5. Distância geográfica em km (acima da diagonal) e valores de Fst par a par (abaixo da diagonal) das populações de *H. tropicalis* estudadas. Valores significativos $P=0,01$ foi dada por 1023 permutações.

População	AL	IT	ROA	URU	ART	RI
AL	*****	103,5	57,9	70,7	84,2	86
IT	0,12390	*****	104,2	111,4	122,5	140,6
ROA	0,05379	0,09407	*****	11	24	35
URU	0,04611	0,11449	0,04767	****	11	27,7
ART	0,11376	0,06580	0,08275	0,11837	*****	13
RI	0,04894	0,11908	0,08789	0,08822	0,10743	*****

A partir da análise da coordenada principal observa-se que as seis populações de *H. tropicalis* têm pouca ou nenhuma estruturação genética, como pode ser visto nas populações de Itaqui (IT) e Artigas (ART) (Figura 2B). Essa distribuição explica 41,3% (eixo X- 26,6%, Y- 7,8% e Z- 6,9%) da variabilidade genética encontrada. Na estimativa do número de possíveis agrupamentos populacionais pela análise bayesiana, encontrou-se um $K = 2$ (Figura 2C), com a formação de um grupo entre as populações de Itaqui (IT) e Artigas (ART), e outro grupo formado entre as demais populações. O dendrograma gerado a partir da distância genética de Nei (1978) (Figura 2A) corroborou com os dados da coordenada principal e da análise bayesiana (Figuras 2B e 2C), dividindo as populações em dois grupos.

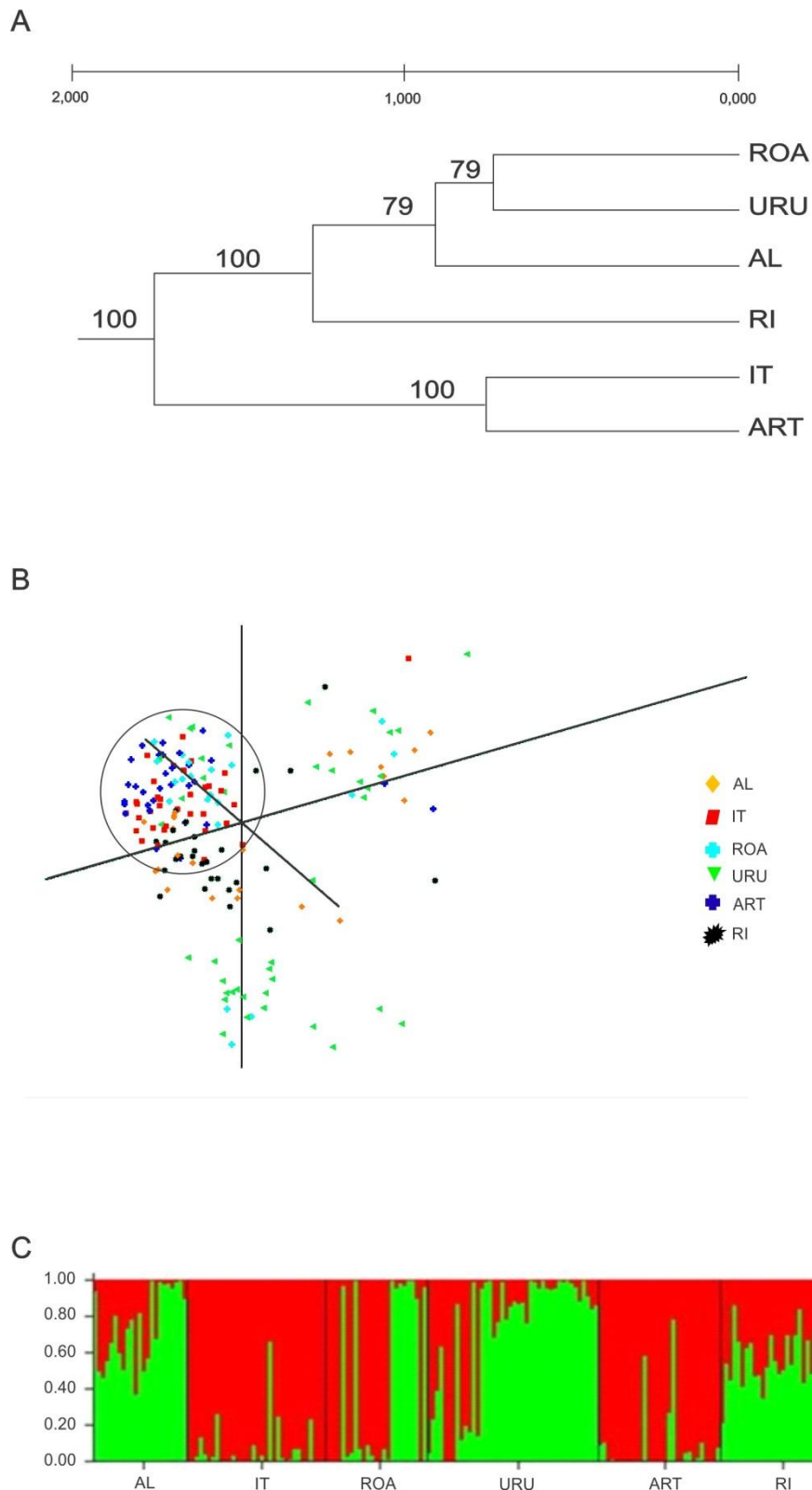


Figura 2: **A)** Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, conforme distância genética de Nei (1978). Número nos ramos representam *bootstrap* baseado em 1000 replicações. **B)** Coordenada principal de seis populações de *H. tropicalis*, conforme distância genética de Nei (1978) com eixos X, Y e Z explicando respectivamente, 26,6%, 7,8% 6,9%, da variabilidade. **C)** Agrupamentos ($k=2$) formados pela análise de estrutura populacional em seis populações analisadas de *H. tropicalis*.

Marcadores de microssatélites

Para o estudos de regiões microssatélites foram usados 33 pares de primers, desenvolvidos previamente para as espécies *H. chillensis* (Lucio et al. 2011) e *H. catharinensis* (Chaves et al. 2012). Treze destes primers não amplificaram em nenhuma das condições testadas, enquanto 20 (60,6%) produziram fragmentos, mas somente nove geraram produtos de amplificação com alto grau de reprodutibilidade, com tamanhos esperados e polimórficos (Tabela 6).

Tabela 6. Sequências de pares de primers desenvolvidos para *H. catharinensis* (Chaves 2012) e *H. chillensis* (Lucio 2011), com os respectivos motivos, tamanho de pares de bases (pb) e número de alelos gerados (Na).

Primer/ Genebank	Sequência pares de Primers 5'-3'	Motivo	Tamanho (pb)	Na
Hcat19	F:AACAAGCAAAACCCAGGATG	(TCTG) ₆ n	201	6
JX418273	R: CATCACCACCCCCTCTTCTA	(GT) ₅ (TG) ₄		
Hcat17	F: ACACATGAGAAGGGCGATTT	(TG) ₄ n(TG) ₃	203	4
JX418277	R:GGTTCCTATTGCGTTGAAA			
Hcat6	F:ACATGAAGGGACGAGTCAGG	(TTC) ₃ n(TTC)	206	5
KF157561	R:AATTCGGGAGGTTCCCTTTA			
Hcat7	F:GATCAACGTAGCCAGGTGGT	(CT) ₂ n(TC) ₅	200	6
KF157562	R:TCAAGGGTTCTCCAACAAC			
Hcat1	F:ATTGCAACCCTTTGCAACTT	(CA) ₄	205	3
KF157558	R:CCATATTTGTGGGATAAAGG			
Hcat5	F:TGTCAGCACAACCAGCTACC	(AG) ₂ A(AG) ₂	199	6
JF715917	R:AGGCTTCCGTCATAGGGTCT	G(AG) ₂		
Hchi108	F:CCTGACGATTGCACAAGAAA	(TC) ₄	249-270	14
JF715918	R:GCGCAGTGTTTCAGATTTTG			
Hchi105	F:TGTCCGGAAACCTACTCTGG	(CT) ₃ T(TC) ₇ ATGTT(TC) ₃	188-210	4
JF715917	R:TTGAATACCACGGCACACTC	C (CT) _{2...6} (CT) ₃		
Hchi211	F:CCCACAATACGCATAACACAA	(TG) _{4...82} (CCA) ₂ G(CCA) ₃	231	8
JF715920	R:TGTCGCAAATCGCTAGAAGA			
Total				56

Os nove locos de microssatélites identificaram um total de 56 alelos nas seis populações, compreendendo 183 indivíduos. O número total de alelos por locos variou de 3 (Hcat1 KF157558) a 14 (Hchi108 JF715918) com média de 6,2 por loco (Tabela 6), enquanto o número de alelos por população variou de 20, na população de Artigas (ART) a 35 na população de Uruguiana (URU) com uma média de 28,3 alelos por

população (Tabela 7). Não identificamos números significativos de alelos nulos nas populações de *H. tropicalis* estudadas.

O número de alelos efetivos (A_e) variou de 1,7 na população de Rivera (RI) a 1,9 nas populações de Alegrete e Uruguaiana (AL e URU), com um valor médio entre as populações de 1,82. Já o número de alelos privados (A_p) variou de 1, na população de Artigas (ART), a 7 na população de Uruguaiana (URU), com uma média de 3,83 entre as populações (Tabela 7).

A média de heterozigosidade observada foi de 0,52, enquanto a esperada foi de 0,41, variando de 0,47 nas populações de Itaqui e Rivera (IT e RI) a 0,65 na população de Artigas (ART) para heterozigosidade observada. Já a heterozigosidade esperada variou de 0,38 na população de Rivera (RI) a 0,43, nas populações da Rodovia Osvaldo Aranha (ROA) e de Uruguaiana (URU) (Tabela 7). A heterozigosidade observada foi maior que a esperada para todas as populações, sendo que as populações de Artigas, Rodovia Osvaldo Aranha e Uruguaiana (ART, ROA e URU) foram significativas para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW).

O coeficiente de endogamia (F_{is}) foi negativo para todas as populações e significativo para as populações de Artigas, Rodovia Osvaldo Aranha e Rivera (ART, ROA e RI), utilizando a correção de Bonferroni. Já para o índice de endogamia de Wang as populações de Itaqui (IT) e Artigas (ART) foram significativas.

Tabela 7. Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade em nove locos de microssatélites para seis populações de *H. tropicalis*. N: número de indivíduos por população; A: número de alelos por população; A_e : número médio de alelos efetivos; A_p : número total de alelos privados; H_o : heterozigosidade observada; H_e : heterozigosidade esperada; F_{is} : coeficiente de endogamia.

População	N	A	A_e	A_p	H_o	H_e	F_{is}	F-Wang
IT	34	29	1,78	6	0,47	0,41	-0,13	0,05*
ART	30	20	1,81	1	0,65 ^x	0,42	-0,54*	0,38*
ROA	25	29	1,83	4	0,58 ^x	0,43	-0,33*	-0,39
URU	42	35	1,9	7	0,48 ^x	0,43	-0,12	-0,76
RI	29	27	1,7	2	0,47	0,38	-0,20*	-0,38
AL	23	30	1,9	3	0,48	0,40	-0,16	-0,53
Média	-	28,3	1,82	3,83	0,52	0,41	-	-

Significância de F_{is} e F-Wang ($P < 0,05$) com correção de Bonferroni 0,00093

^x Significativo ao nível de 5% para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A análise de variância molecular (AMOVA) identificou maior variabilidade genética dentro (97,08%) do que entre (2,92%) as seis populações estudadas (Tabela 8). E o índice de fixação foi ($F_{st}=0,029$) com os marcadores microssatélites, identificando uma baixa diferenciação entre as populações de *H. tropicalis*.

Tabela 8. Análise de variância molecular (AMOVA) em seis populações de *H. tropicalis* utilizando nove locos microssatélites.

Fonte de variação	GL	SQ	Componentes de Variância	% de Variação
Entre populações	5	21,982	0,04689	2,92
Dentro Populações	360	561,581	1,55995	97,08
Total	365	583,563	1,60684	
Índice de Fixação (F_{st}) = 0,02918				

** $p \leq 0,01$ (significância dada pelo teste com 1023 permutações)

No estudo da análise bayesiana (Tabela 9) foi identificada a ocorrência de fluxo gênico em todas as populações, com exceção da população de Artigas (ART) que acusou um número não significativo de migrantes. A menor taxa de fluxo gênico foi verificada na população de Uruguiana (URU) com uma porcentagem de 0,091 migrantes oriundos da população de Artigas (ART). Por outro lado, as outras populações mostraram taxas semelhantes de fluxo gênico, sendo a população de Artigas (ART) a que contribui com maior porcentagem de migrantes para todas as outras populações (Tabela 9).

Tabela 9. Médias e intervalo de confiança a 95% (IC) das distribuições de proporção de indivíduos não-migrantes e migrantes para seis populações de *H. tropicalis*, com base no método de atribuição bayesiana de Wilson e Rannala (2003).

População	Não-migrantes	Migrantes
IT	0,762	0,180 (ART)
ART	0,988	-
ROA	0,683	0,174 (ART); 0,113 (URU);
URU	0,886	0,091 (ART);
RI	0,676	0,157 (ART); 0,143 (URU);
AL	0,679	0,056 (ART); 0,240 (URU);

A análise para investigar se as populações sofreram recente redução do tamanho populacional, foi realizada para os três tipos de modelos mutacionais: IAM (Infinite Allele Model), TPM (Two Phase Model) e SSM (Stepwise Mutation Model) (Tabela 10). Onde todas as populações, com exceção de Uruguiana (URU), apresentaram efeito de deriva genética significativo, para pelo menos um modelo mutacional. No modelo IAM, os efeitos de deriva genética foram significativos para todas as populações, com a população de Rivera (RI) mostrando-se também significativo para o modelo TPM enquanto a população de Artigas (ART) teve efeito significativo de deriva para os três modelos.

Tabela 10. Teste do sinal de Wilcoxon para o excesso/deficiência de heterozigosidade para nove locos microssatélites em seis populações de *H. tropicalis* ($P \leq 0,05$).

População	N	IAM ^a		TPM ^b		SMM ^c	
		Hd/He	P	Hd/He	P	Hd/He	P
IT	34	3/6	0,29*	5/4	0,34	7/2	0,03
ART	30	0/8	0,002*	1/7	0,03*	1/7	0,04*
ROA	25	3/6	0,22*	3/6	0,27	3/6	0,30
URU	42	4/5	0,57	6/3	0,16	5/4	0,008
RI	29	5/4	0,53*	5/4	0,48*	5/4	0,43
AL	23	4/5	0,50*	5/4	0,44	6/3	0,18

a: Infinite allele model; b Two-phase model; c Stepwise mutation model; A razão de H_d/H_e deve ser próxima de 1:1 para populações que não sofreram gargalo genético. *Significância $p \leq 0,05$.

Os valores de F_{st} par a par variaram de 0,0018 entre as populações de Artigas (ART) e Rodovia Osvaldo Aranha (ROA) a 0,0791 entre as populações de Artigas (ART) e Itaqui (IT) (Tabela 11). Os valores de distância genética foram baixos, sendo não significativos pelo teste de correlação de Pearson ($r = 0,1263$; $p = 0,6537$), não mostrando assim correlação entre distância genética e geográfica.

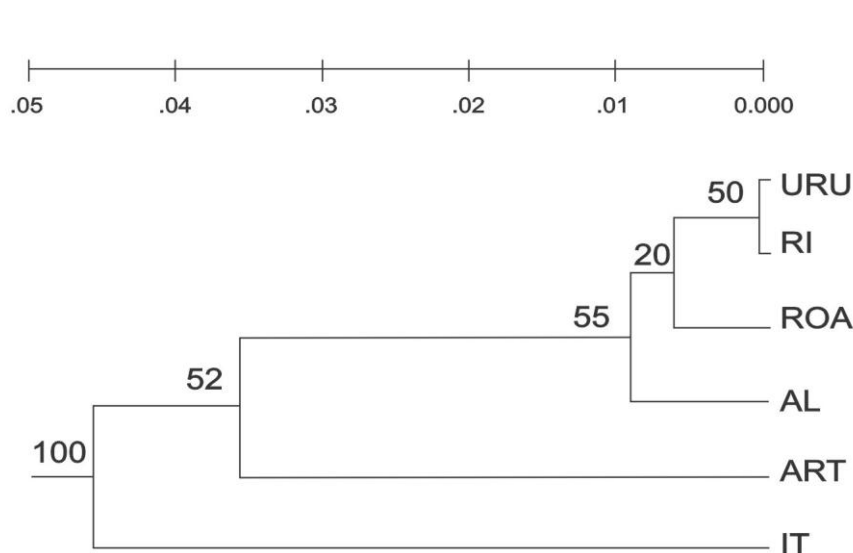
A análise de agrupamento populacional mostrou um $K = 3$ (Figura 3B), corroborando com os dados gerados no dendrograma a partir da distância genética de Nei (1978) (Figura 3A), onde a maioria das populações que se agrupou no mesmo

cluster, é mais semelhante geneticamente. As populações de Itaquí (IT) e Artigas (ART) foram separadas das no dendrograma.

Tabela 11. Distância geográfica em km (acima da diagonal) e valores de F_{st} par a par (abaixo da diagonal) das populações de *H. tropicalis* estudadas. Todos os valores de F_{st} foram significativos ($P \leq 0,01$; 1023 permutações) entre pares de populações.

População	IT	ART	ROA	URU	RI	AL
IT	-	103,5	57,9	70,7	84,2	86
ART	0,0791	-	104,2	111,4	122,5	140,6
ROA	0,0513	0,0018	-	11	24	35
URU	0,0530	0,0202	0,0113	-	11	27,7
RI	0,0524	0,0157	0,0081	0,0065	-	13
AL	0,0595	0,0382	0,0159	0,0123	0,0023	-

A



B

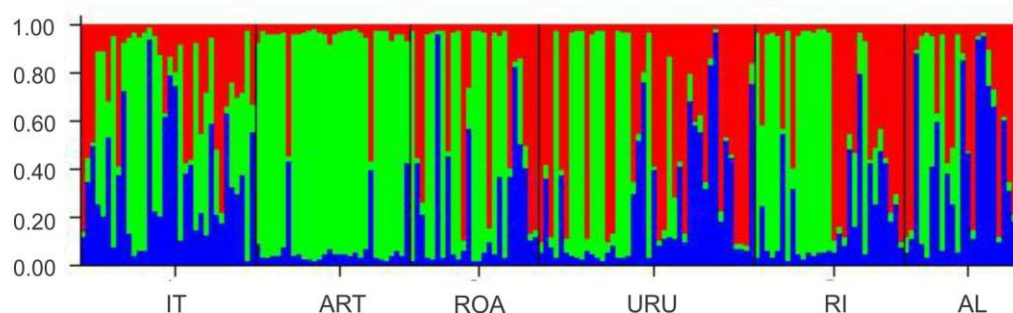


Figura 3: A) Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, conforme distância genética de Nei (1978). Número nos ramos representam *bootstrap* baseado em 1000 replicações. B) Agrupamentos ($k = 3$) formados pela análise de estrutura populacional em seis populações analisadas de *H. tropicalis*.

DISCUSSÃO

A partir da análise dos dados com marcadores AFLP, a porcentagem de locos polimórficos encontrado em *H. tropicalis* foi considerada elevada em comparação àqueles encontrados em outras espécies sul-americanas do gênero, como *H. incana* (Hook. & Arn.) Macloskie (locos polimórficos variando de 8,2% a 23,6%) que, segundo Tremetsberger et al. (2009), teve a estrutura genética de suas populações afetada por períodos glaciais durante o Pleistoceno. Em *H. acaulis* (Remy) Britton a porcentagem de locos variou de 1 a 24% (Tremetsberger et al. 2003a). Por outro lado, em estudos realizados com *H. catharinensis* (Reck 2010) espécie restrita também ao Rio Grande do Sul, a porcentagem de locos polimórficos variou 43,72% a 71,04%, sendo próximos aos encontrados em *H. tropicalis*. Os índices de diversidade gênica encontrados em *H. tropicalis* foram diferentes das demais espécies do gênero, como por exemplo, em *H. salzmänniana* DC. a diversidade variou de 0,0426 a 0,1675 (Ortiz et al. 2007), já *H. catharinensis* essa diversidade variou de 0,1937 a 0,2124 (Reck 2010), enquanto em *H. lutea* esses índices variaram de 0,2588 a 0,3442 (Rodrigues 2010). Valores bem inferiores de diversidade gênica (0,001 a 0,15) foram encontrados em *H. angustifolia*, espécie marroquina co-irmã do grupo sul-americano de *Hypochaeris* (Terrab et al. 2009). Os índices de diversidade gênica (H_s) de Nei (1973) estão relacionados com a diversidade contida dentro de cada população e, como nos locos polimórficos, esse parâmetro também pode ser influenciado pelo tamanho efetivo das populações visto que, quanto menor a população, maiores os efeitos de deriva gênica sobre a diversidade (Cornuet e Luikart 1996; Piry et al. 1999).

O número de fragmentos privados encontrados em *H. tropicalis*, foi mais frequente nas populações que apresentaram maior porcentagem de locos polimórficos e altos índices de diversidade gênica. Segundo trabalhos de Ortiz et al. (2008) e Tremetsberger et al. (2009) com marcadores AFLP e sequências cloroplastidiais, estes dados estão relacionados com a origem de algumas populações, sendo este elevado em populações mais antiga, pelo fato de se acumularem ao longo do tempo. Com base nisso, podemos sugerir como local de origem das demais populações a população de Uruguaiana (URU), visto que esta apresenta uma alta incidência de fragmentos privados, sugerindo ser a mais antiga dentre as outras. Já a população da Rodovia Osvaldo Aranha (ROA) tem origem mais recente, devido ao seu baixo número de fragmentos privados.

A análise de variância para dados moleculares (AMOVA) com marcadores AFLP, mostrou que a maior variância genética se encontra dentro das populações, e essa alta variabilidade associado aos altos níveis de locos polimórficos têm sido encontrados em plantas com fecundação cruzada ou mista (Hamrick e Godt 1989), como verificado na espécie sul-americana e alógama *H. tenuifolia* (Hook et. Arn.) Griseb. (Tremetsberger et al. 2003b), que apresentou maior variação dentro (69,11%) do que entre populações (30,89%). Ao contrário, em *H. acaulis* a maior variação genética foi observada entre (67,9%) do que dentro de populações (32,1%), uma característica comum em plantas autógamas (Tremetsberger et al. 2003a). Não existem ainda dados sobre o sistema de cruzamentos de *H. tropicalis*, entretanto, os resultados obtidos pela análise de variância molecular sugerem que nesta espécie predomina alogamia.

O índice de fixação encontrado entre as populações foi considerado baixo para *H. tropicalis*, assim como as distâncias genéticas calculadas pelo F_{st} par-a-par. Segundo Hartl e Clark (2007) valores de F_{st} inferiores a 15% representam níveis baixos de diversidade genética entre populações, e em *H. tropicalis* essa baixa diferenciação pode estar relacionada com a recente diversificação do gênero, onde as populações da espécie não tiveram tempo suficiente para se diferenciar (Tremetsberger et al. 2006). E isso pode ser observado na análise da coordenada principal, onde foi verificada pouca ou nenhuma estruturação genética entre as populações de *H. tropicalis*, sugerindo que a baixa estruturação das populações deve-se ao fato das espécies sul-americanas de *Hypochaeris* não estarem completamente isoladas, conforme demonstrado nos estudos de Azevêdo- Gonçalves e Matzenbacher (2007), que relatam a ocorrência de híbridos interespecíficos naturais em *Hypochaeris*. Na análise Bayesiana, encontrou-se um $K = 2$, com a formação de um grupo entre as populações de Itaquí (IT) e Artigas (ART), onde boa parte de seus indivíduos foram agrupados no mesmo *cluster*, o que demonstra que essas populações são mais semelhantes geneticamente. Na coordenada principal estas populações foram as únicas com indícios de estruturação. O outro grupo foi formado entre as demais populações, onde se observa uma grande mistura entre os indivíduos na análise bayesiana e também na coordenada principal. O dendrograma gerado pelo método UPGMA a partir da distância genética de Nei (1978) corroborou com os dados da coordenada principal e da análise bayesiana, agrupando as populações que possuem indivíduos que dividem o mesmo *cluster*, e confirmando a semelhança genética entre elas, apesar da distância geográfica entre as mesmas.

Na análise dos nove locos de SSR foi encontrado um total de 56 alelos por locos, com uma média de 6,2 para as seis populações de *H. tropicalis*. Segundo Sharma et al. (2011) não existe padrão de número de alelos entre as espécies, sendo estas variações consideradas normais. Lucio et al. (2011) em gel de poliacrilamida, encontrou uma média de 2,30 alelos por locos em oito populações de *H. chillensis* (Kunth) Britton, sendo estes valores inferiores aos encontrados em *H. tropicalis*. Em estudos com a espécie europeia *H. radicata* foi verificado uma média de 30 alelos por locos em 17 populações (Mix et al. 2006) e em *H. catharinensis* uma média de 24 alelos por locos em 13 populações (Chaves 2012).

Não foram encontrados números significativos de alelos nulos nas populações de *H. tropicalis*, devido possivelmente à proximidade genética entre as espécies sul-americanas de *Hypochaeris* e a história recente do gênero, que mantiveram conservadas as regiões flanqueadoras dos microssatélites. Além disso, aos critérios adotados na escolha dos primers considerados para análise (alta repetibilidade e polimorfismo) podem ter contribuído para incrementar a qualidade das amplificações, auxiliando na eliminação de desvios causados pelos alelos nulos.

A heterozigosidade observada foi maior que a esperada para as seis populações de *H. tropicalis*, com o coeficiente de endogamia (Fis) negativo para todas as populações. Porém utilizando a correção de Bonferroni o Fis foi significativo para as populações de Artigas (ART), Rodovia Osvaldo Aranha (ROA) e Rivera (RI), já o índice de endogamia de Wang foi novamente significativo para a população de Artigas (ART) e para a população de Itaqui (IT). Estes resultados podem estar associados à diminuição do tamanho populacional e/ou com sobreposições de gerações nessas populações.

A análise de variância molecular (AMOVA) com marcadores SSRs, mostrou uma maior variabilidade genética dentro do que entre as populações, embora não existam estudos específicos sobre o sistema de cruzamentos de *H. tropicalis*, estes dados sugerem que esta espécie é predominantemente alógama, corroborando com os dados aqui descritos utilizando marcadores AFLP. A baixa diferenciação encontrada entre as populações com os marcadores AFLP, também foi confirmada com os marcadores SSRs, estando em concordância com a história da diversificação recente do gênero na América do Sul. Além disso, a distribuição restrita da espécie, bem como a proximidade entre as populações favorece a ocorrência de fluxo gênico, levando a

redução ou manutenção de uma estruturação homogênea entre as populações. Então para investigar a diferenciação genética entre populações, se faz necessário avaliar a ocorrência ou não de fluxo gênico, visto que este fator tem relação direta com a variabilidade entre e dentro de populações. O fluxo gênico tende a homogeneizar as frequências alélicas, enquanto a sua ausência ou ocorrência em níveis baixos leva a uma maior diferenciação genética entre as populações (Moysés 2005). Com base na análise bayesiana, foi identificado fluxo gênico em todas as populações, porém na população de Artigas (ART) o número de migrantes não foi significativo.

As populações de *H. tropicalis* estão localizadas em regiões exploradas por atividades agropastoris expostas a ação de pisoteio por animais, que pode ter como consequência, a diminuição do seu tamanho populacional. A análise por meio de modelos mutacionais, foi significativa com o modelo mutacional IAM para todas as populações, com exceção de Uruguiana (URU). Esses resultados sugerem a ocorrência de uma redução leve no tamanho populacional, pois segundo Luikart e Cornuet (1998), os modelos IAM e SMM representam dois modelos extremos de mutação, sendo os modelos TPM e SMM os que melhores representam as condições de uma população com marcadores microssatélites, podendo o excesso de heterozigosidade em populações que não sofreram deriva genética, ser detectado erroneamente pelo modelo IAM. As únicas populações significativas para o modelo TPM foram às populações de Rivera (RI) e Artigas (ART), sendo esta significativa também para o modelo SMM. Essas populações podem ter como consequência a diminuição de seu tamanho efetivo, o aumento da sua heterozigosidade, bem como a perda e fixação de alguns alelos (Luikart e Cornuet 1998).

A análise Bayesiana para marcadores SSRs mostrou $K = 3$ agrupamentos, corroborando com os dados de distância genética de (Nei, 1978), onde quatro populações (URU, RI, ROA e AL) formam um único *cluster* separado das populações de Itaqui (IT) e Artigas (ART). Essas duas populações também foram separadas das demais pela análise de AFLP, onde se observa algum indício de estruturação genética, na análise da coordenada principal. Entretanto, a análise Bayesiana aplicada aos dados de AFLP mostrou a formação de $K = 2$ com as populações Itaqui (IT) e Artigas (ART) associadas em um único *cluster*.

Devido à natureza dominante (AFLP) e codominante (SSRs) dos dois marcadores utilizados, foram identificadas diferenças nos níveis de detecção de

estruturação genética, embora a diferenciação entre as populações tenha se mostrado baixa com ambos os marcadores. Conforme detectada com os marcadores de SSR, a presença de fluxo gênico tende a reduzir a diferenciação entre populações. Segundo Slatkin (1994) as populações evoluem de forma conjunta e, se a ocorrência de fluxo gênico for alta, a tendência é que as populações se tornem cada vez mais similares. Além disso, o gênero *Hypochaeris* tem como característica sementes plumosas que podem ser dispersas pelo vento, o que facilita o fluxo gênico e auxilia na manutenção dos baixos níveis de diferenciação entre as populações (Soons et al. 2004; Cavalli e Winge 2003). A baixa diferenciação encontrada entre as populações de *H. tropicalis* também tem possivelmente, relação com a diversificação recente do gênero na América do Sul, visto que não houve ainda tempo suficiente para promover uma diferenciação significativa ao nível de DNA. Esta constatação pode ser facilmente comprovada quando se observa os altos índices de hibridação interespecífica entre as espécies sul-americanas que ocorrem em simpatria (Azevêdo – Gonçalves e Matzenbacher 2007). Além disso, estudos de filogenia molecular mostram que existe inconsistência (baixo suporte nas associações) na delimitação das espécies, comprovando que essas são relativamente jovens (Samuel et al. 2003; Stuessy 2003; Tremetsberger et al. 2005, 2006; Reck et al. 2011). Segundo Hamrick et al. (1992) a área de distribuição geográfica de uma espécie é um bom indicador da sua variação genética, *H. tropicalis* é uma espécie restrita no Brasil ao Rio Grande do Sul, o que a leva ter níveis baixos de variação (Gitzendanner e Soltis 2000; Cavalli e Winge 2003). As características da região também podem ter contribuído para o fluxo da espécie, visto que são áreas de relevo plano com predomínio de vegetação rasteiras, como gramíneas e arbustos, facilitando o fluxo entre áreas. Além do mais, essas regiões apresentam solos rasos, pedregosos com uma baixa retenção hídrica, sendo explorado economicamente por atividades agropastoris, onde o gado pode tanto contribuir no fluxo de *H. tropicalis* com suas sementes plumosas, já que estes não se alimentam da planta devido ao látex contido nesta, como também o oposto, reduzir a população por pisoteio e morte das plantas.

CONCLUSÃO

A partir dos estudos com os marcadores AFLP e SSR podemos concluir que *H. tropicalis* tem baixa diferenciação genética entre as populações, não definindo um padrão claro de estruturação, e que o modo de distribuição da variabilidade genética esta

associado ao processo de diversificação recente do gênero na América do Sul. Os resultados da análise de variância de ambos, AFLP e SSRs, revelaram tendências semelhantes, mostrando que *H. tropicalis* tem um padrão característico de espécies com predominância por alogamia. Além disso, os dados sugerem que a população de Uruguaiana (URU) é a população mais antiga em relação às demais, conforme constatado pelo seu alto índice de diversidade gênica, bem como pelo maior número de fragmentos privados. Já a população de Artigas (ART) apresentou o maior número de fragmentos fixados e uma estruturação genética mais definida pela análise da coordenada principal, conforme observado na análise de deriva genética que mostra, assim como para população de Rivera (RI), a uma forte diminuição do seu tamanho efetivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwall M, Shrivastava N, Padh H (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617-631.
- Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL, Santos AS (2007). *Bioestat: 2.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológica e médicas*. Sociedade Civil Mamirauá, Belém.
- Azevêdo-Gonçalves CF, Matzenbacher NI (2007). O gênero *Hypochaeris* (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia série Botânica* 62: 55-87.
- Barroso GM (1991). Sistemática de angiosperma no Brasil subclasse: Asteridae, v. f. *Viçosa* 3: 326.
- Bortiri (1999). Flora Fanerogâmica Argentina. Asteraceae, Lactuceae: *Hypochaeris*. *Conicet* 63: 1-25.
- Cabrera AL (1929). *Compuestas Platenses*. *Revista del centro estudiantes de agronomía y veterinária*, Buenos Aires 139: 17-52.
- Cabrera AL (1963) Estudios sobre o gênero *Hypochaeris*. *Boletín de la sociedad argentina de botânica* 10: 166- 195.
- Cavalli SS, Winge H (2003). Variabilidade genética em populações naturais. In: *Genética e Evolução Vegetal*. Freitas LB, Bered F (Org.). Porto Alegre: UFRGS, 165-175.
- Cerbah M, Coulaud J, Brown SC, Siljak-Yakovlev S (1998a). rDNA organization and evolutionary relationship in the genus *Hypochaeris* (Asteraceae). *J Hered* 89: 312-318.
- Cerbah M, Coulaud J, Godelle B, Siljak-Yakovlev S (1995). Genome size, fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochaeris* species. *Genome* 38: 689–695.
- Cerbah M, Souza-Chies T, Jibier MF, Lejeune B, Siljak-Yakovlev S (1998b). Molecular phylogeny of the genus *Hypochaeris* using internal transcribed spacers of nuclear

- rDNA: inference for chromosomal evolution. *Molecular Biology Evolution* 15: 345–354.
- Chaves CL (2012). Estrutura genética de populações de *Hypochoeris catharinensis* cabrera (Asteraceae) utilizando marcadores de microssatélites. Dissertação de Mestrado em Agronomia. Universidade Estadual de Londrina. Londrina – Pr.
- Cornuet JM, Luikart G (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Ecology Resources* 9: 1322–1332.
- Defillips RA (1976). *Hypochoeris* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, Chater AO, Defillips RA, Richardson IBK (eds). *Flora Europaea*. Cambridge University Press, Cambridge, 4: 308-310.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Evano 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, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47–50.
- Garcia EM, Boldrini II, Jacques AVA (2000). Dinâmica de formas vitais de uma vegetação campestre sob diferentes práticas e exclusão. *Iheringia Série Botânica, Porto Alegre* 2: 215-241.
- Girardi-Deiro AM, Gomes KE (2008). Sistema de Criação para a Terminação de Bovinos de Corte na Região Sudoeste do Rio Grande do Sul. EMBRAPA PECUÁRIASUL. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/BovinoCorte/BovinoCorteRegiaoSudoesteRioGrandeSul/aspectosecologicos.htm>. Acesso: 02/10/2014.
- Gitzendanner MA, Soltis PS (2000). Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87: 783-792.
- Goudet J (2014). FST AT: a program to estimate and test diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution.
- Hamrick JL (1982). Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany* 69(10): 1685-1693.
- Hamrick JL (1992). Plant population genetics and evolution. *American Journal of Botany* 10: 1685-1693.
- Hamrick JL, Godt MJW (1989). Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, (ed) *Plant Population Genetics, breeding and Genetic Resources*. Sinauer Associates, Sunderland 43-63.
- Hartl DL, Clark AG (2007). *Principles of population genetics*. Sunderland: Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts 4: 652.

Hubisz JM, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322-1332.

Lucio KCF (2011) Estudos genéticos em populações da espécie *Hypochaeris chillensis* (Asteraceae) utilizando marcadores microssatélites. 101p. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina. Londrina – PR.

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

Matzenbacher NI (1985). Levantamento florístico preliminar das Compostas da fazenda São Maximiano – Guaíba – RS – Brasil. *Comunicações do museu de Ciências da PUCRS, Ser Bot* 37: 115-127.

Matzenbacher NI (1998). O complexo “Senecionóide” (Asteraceae—Senecioneae) no Rio Grande do Sul—Brasil. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Miller M (1997). TFGA (Tools for population genetic analyses). Version 1.3: a windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data.

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

Moysés CB (2005). Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes) São Paulo. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas. Universidade de São Paulo. São Paulo-SP.

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

Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 12: 3321-3323.

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

Oberprieler C, Vogt R (2002). *Hypochaeris arachnoidea* Poir., a hitherto neglected species in NW Africa. *Willdenowia* 32: 231–236.

Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006). Origin evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetic and Molecular Biology* 29(2): 294-307.

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

Ortiz MA, Tremetsberger K, Terrab A, Stuessy TF, García-Castanõ JL, Urtubey E, Baeza CM, Ruas CF, Gibbs PE, Talavera S (2008). Phylogeography of the invasive weed *Hypochaeris radicata* (Asteraceae): from Moroccan origin to worldwide introduced populations. *Molecular Ecology* 17: 3664–3667.

Piry S, Luikart G, Cornuet J (1999). A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J. Hered.* 90: 502-503.

Raymond M, Rousset F (1995). Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered* 86: 248–249.

Reck M. (2010). Estudos moleculares em *Hypochaeris catharinensis* Cabrera (Asteraceae) utilizando marcadores AFLP. 77p. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina- Londrina-PR.

Reck M, Benício L, Ruas EA, Rodrigues LA, Ruas PM, Ortiz MA, Talavera S, Urtubey E, Stuessy T, Weiss-Schneeweiss H, et al. (2011). Karyotype and AFLP data reveal the phylogenetic position of the Brazilian endemic *Hypochaeris catharinensis* (Asteraceae) *Plant Systematic Evolution* 296: 231–243.

Rodrigues LA (2010). Estrutura Genética de Populações de *Hypochaeris lutea* (Asteraceae). Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina- Londrina-PR.

Ruas CF, Ruas PM, Metzenbacher NI, Ross G, Bernini C, Vanzela ALL (1995). cytogenetic studies of some *Hypochaeris* species (compositae) from Brasil. *American Journal of Botany* 82: 369–375.

Ruas CF, Weiss-Schneeweiss H, Stuessy TF, Samuel MR, Pedrosa-Harand A, Tremetsberger K, Ruas PM, Schlüter PM, Ortiz HMA, König C, Matzenbacher NI (2008). Characterization, genomic organization and chromosome distribution of Ty1-copia retrotransposons in species of *Hypochaeris* (Asteraceae). *Gene* 412(1-2): 39-49.

Samuel R, Stuessy TF, Tremetsberger K, Baeza CM, Siljak-Yakovlev S (2003). Phylogenetic relationships among species of *Hypochaeris* (Asteraceae, lactuceae) based on its, plastid trnI intron, trnI-f spacer and matK sequences. *American Journal of Botany* 90: 496–507.

Schlotterer C, Tautz D (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research, Eynsham* 20: 211-215.

Schuelke M (2000). An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233–234.

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

Sharma J, George S, Pandey M, Norcini J, Perez H (2011). Genetic differentiation in natural populations of a Keystone Bunchgrass (*Aristida stricta*) across its native range. *Genetica* 139(2): 261-71.

- Slatkin M (1994). Gene flow and population structure. En: Ecological Genetics (ed Real LA). Princeton University Press 3-18.
- Solé-cava AM (2001). Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. Biologia molecular e evolução. Ribeirão Preto: Holos 202.
- Soons MB, Heil GW, Nathan R, Katul GG (2004). Determinants of long-distance seed dispersal by wind in grasslands. Ecology 85: 3056–3068.
- Stebbins GL (1971). Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, London, UK.
- Sokal RR, Michener CD (1958). A statistical method for evaluation systematic relationships. University Kansas Science Bulletin 38: 1409-1438.
- Stuessy TF, Tremetsberger K, Müllner AN, Jankowicz J, Guo Y-P, Baeza CM, Samuel RM (2003). The melding of systematics and biogeography through investigations at the populational level: examples from the genus *Hypochaeris* (Asteraceae). Basic and Applied Ecology 4: 287-296.
- Tautz D (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Research 17: 6463-6471.
- Terrab A, Ortiz MA, Talavera M, Ariza MJ, Moriana MC, García-Cataño JL, Tremetsberger K, Stuessy TF, Baeza M, Urtubey E, Ruas CF, Casimiro-Soringuer R, Balao F, Gibbs PE, Talavera S (2009). AFLP and breeding system studies indicate vicariance origin for scattered populations and enigmatic low fecundity in the Moroccan endemic *Hypochaeris angustifolia* (Asteraceae), sister taxon to all of the South American *Hypochaeris* species. Molecular Phylogenetics and Evolution 53:13-22.
- Tremetsberger K, Stuessy TF, Guo YP, Baeza CM, Weiss H, Samuel RM (2003b). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. Taxon 52: 237–245.
- Tremetsberger K, Stuessy TF, Kadlec G, Urtubey E, Baeza CM, Beck SG, Valdebenito HA, Ruas CF, Matzenbacher NI (2006). Aflp phylogeny of south american species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). Systematic botany. 31: 610–626.
- Tremetsberger K, Stuessy TF, Samuel RM, Baeza CM, Fay MF (2003A). Genetics of colonization in *Hypochaeris tenuifolia* (Asteraceae, Lactuceae) on Volcán Lonquimay, Chile. Molecular Ecology 12: 2649–2659.
- Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy TF, Ortiz MA, Weiss-Schneeweiss H, Kadlec G (2004). Relationship of *Hypochaeris salzmanniana* (Asteraceae, Lactuceae), an endangered species of the Iberian Peninsula, to *H. radicata* and *H. glabra* and biogeographical implications. Botanical Journal of the Linnean Society 146: 79–95.
- Tremetsberger K, Weiss-Schneeweiss H, Stuessy T, Samuel R, Kadlec G, Ortiz MA, Talavera S (2005). nuclear ribosomal dna and karyotypes indicate a nw african origin of south american *Hypochaeris* (Asteraceae, cichorieae). Molecular phylogenetics and evolution 36: 102-116.
- Tremetsberger K, Urtubey E, Terrab A, Baeza CM, Ortiz MA, Talavera M, König C, Tensch EM, Kohl G, Talavera S, Stuessy TF (2009). Pleistocene refugia and polytopic

replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and Subantarctic plant *Hypochaeris incana* (Asteraceae, Cichorieae). *Molecular Ecology* 18: 3668–3682.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 407-4414.

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.

Wang J (2010). Coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11(1): 141–145.

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

Weiss-Schneeweiss H, Stuessy TF, Tremetsberger K, Urtubey E, Valdebenito HA, Beck SG, Baeza CM (2007). Chromosome numbers and karyotypes of South American species and populations of *Hypochaeris* (Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 49-60.

Weiss-Schneeweiss H, Tremetsberger K, Schneeweiss GM, Parker JS, Stuessy TF (2008). Karyotype diversifications and evolution in diploid and polyploid South American *Hypochaeris* (Asteraceae) inferred from rDNA localization and genetic fingerprint data. *Annals of Botany* 101: 909-918.

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

7. Artigo 2

Filogenia de *Hypochaeris tropicalis* (Asteraceae): estudo de caso.

*Este artigo será submetido à revista **Plant Systematics and Evolution**.

Resumo

O gênero *Hypochoeris* possui dois centros de distribuição, com 15 espécies na região Mediterrânea, e cerca de 50 espécies na América do Sul. *Hypochoeris tropicalis* é uma espécie com distribuição restrita a poucas áreas, na região sudoeste do Rio Grande do Sul (Brasil), Argentina e Uruguai. Neste estudo uma abordagem molecular é utilizada para investigar a posição filogenética *H. tropicalis* dentro do grupo de espécies sul-americanas de *Hypochoeris*. Marcadores nucleares de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e sequências de regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) foram usados para investigar 59 e 43 indivíduos, respectivamente, representando oito espécies de *Hypochoeris* nativas da América do Sul e três espécies da região do Mediterrâneo, incluindo *H. angustifolia*, suposto ancestral das espécies sul-americanas. Três combinações de primers de AFLP produziram um total de 1.213 marcadores com 88% de polimorfismo. As sequências ITS geraram 643 caracteres, dos quais, somente 13,7% foram informativos. Análise dos dados filogenéticos obtidos para ambos, AFLPs ITS, foram congruentes, mostrando que *H. tropicalis* é uma espécie geneticamente distinta, com todos os indivíduos associados em um único cluster, próximo de espécies dos grupos Pampasica e Lutea. Esta é a primeira investigação que faz uso de dados moleculares para estudar *H. tropicalis*. Os resultados adicionam informações para a delimitação da espécie e contribuem para o entendimento da história evolutiva do gênero *Hypochoeris* na América do Sul.

Palavras chave: AFLP, grupos filogenéticos, *Hypochoeris*, ITS.

Abstract

The genus *Hypochaeris* display a disjunct distribution with 15 species in Mediterranean region and around 50 species in South America. *Hypochaeris tropicalis* is a species with restrict distribution in southeast of Rio Grande do Sul state in Brasil, Argentina and Uruguay. A molecular based approach was applied for the first time to define the phylogenetic position of *H. tropicalis* within the South American group of *Hypochaeris*. We applied nuclear AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)-based markers and ITS (Internal Transcribed Spacer) sequences to investigate 59 and 43 individuals, respectively, representing eight species, native to South American and three species from Mediterranean, including *H. angustifolia*, the presumed ancestor of the South American species. Three AFLP primer combinations produced a total of 1.213 markers with 88% of polymorphism. The ITS sequences rendered 643 characters, of which only 137% were informative. Analysis of the phylogenetic results obtained with both AFLPs and ITS were congruent, showing that *H. tropicalis* is a genetically distinct species, with all individuals associated in an isolated cluster, close to species of the Pampasica and Lutea Groups. This is the first report that includes *H. tropicalis* in molecular-based studies, adding valuable information to species delimitation and to understand the evolutionary history of the genus *Hypochaeris* in South America.

Key words: AFLP markers, ITS, *Hypochaeris*, phylogenetic groups.

INTRODUÇÃO

O gênero *Hypochaeris* possui uma distribuição disjunta com 15 espécies conhecidas na região Mediterrânea e mais de 50 na América do Sul (DeFillips 1976; Bortiri 1999). Devido às características morfológicas e cariotípicas distintas, o gênero foi dividido em dois centros de distribuição: a região do Mediterrâneo, considerado centro de origem, e a América do Sul que, devido ao grande número de espécies é tido como o centro de diversificação do gênero (Stebbins 1971; Ruas et al. 1995; Cerbah et al. 1998a). Estudos recentes sugerem que a origem das espécies sul-americanas de *Hypochaeris* ocorreu a partir de eventos de dispersão a longa distância, de uma única espécie ancestral entre 0,25-3,50 milhões de anos atrás, durante o Plioceno ou Pleistoceno (Tremetsberger et al. 2005). Informações obtidas por meio de sequências de DNA sugerem que *H. angustifolia*, planta endêmica do Marrocos, é a espécie co-irmã do grupo sul-americana do gênero (Stuessy et al. 2003; Tremetsberger et al. 2005).

As espécies de *Hypochaeris* da América do Sul apresentam cariótipos bimodais e assimétricos, com dois pares de cromossomos grandes e dois pequenos. Experimentos com hibridação molecular *in situ* (FISH) identificaram variações na distribuição dos sítios de rDNA 5S e 45S nas espécies sul-americanas, possibilitando a divisão do gênero em grupos citogenéticos (Cerbah et al. 1998; Weiss-Schneeweiss et al. 2003, 2007; Ruas et al. 2005; Reck et al. 2011). Estes grupos citogenéticos vêm sendo combinados na maioria das vezes com os grupos filogenéticos estabelecidos por meio de análise de sequências de DNA nuclear e de regiões cloroplastidiais (Cerbah et al. 1998b; Samuel et al. 2003), bem como com marcadores de AFLP, técnica que tem sido aplicada com sucesso em estudos de espécies de *Hypochaeris* da América do Sul (Stuessy et al. 2003, 2004; Tremetsberger et al. 2005, 2006; Ortiz et al. 2007, 2008; Terrab et al. 2009; Reck et al. 2011).

No Brasil o gênero *Hypochaeris* é representado por oito a dez espécies, a maioria endêmica da região sul. Entre as espécies brasileiras já identificadas, *H. tropicalis* Cabrera é uma planta de distribuição restrita, estando confinada a poucas áreas na região sudoeste do Rio Grande do Sul. A espécie é pouco conhecida, com apenas poucos relatos de dados morfológicos (Azevedo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007) e sua área de ocorrência inclui beiras de estradas, terrenos baldios e campo sujo. As plantas de *H. tropicalis* se caracterizam principalmente pela ausência de rostro nas cipselas e a presença de folhas profundamente partidas (Bortiri, 1999; Cabrera, 1963a). Essas

características facilitam sua identificação no campo, visto que as plantas não são facilmente notadas (Azevedo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007). Estudos citogenéticos, para definir a estrutura cariotípica da espécie, ou dados obtidos por técnicas moleculares, que possam auxiliar na definição de relações filogenéticas, não foram realizados até o momento com esta espécie. Deste modo o presente trabalho foi realizado com o objetivo de investigar a relação filogenética da espécie *H. tropicalis* dentro do grupo sul-americano de *Hypochaeris* e adicionar informações que contribuam para o entendimento dos processos de radiação adaptativa e evolução do gênero neste continente.

MATERIAIS E METÓDOS

Espécies e Amostragem

Amostras de folhas jovens foram obtidas em campo de 70 plantas, incluindo 18 indivíduos representantes de sete populações de *H. tropicalis*, além de outros 52 indivíduos representantes de sete espécies brasileiras de *Hypochaeris*, consistindo das espécies *H. albiflora* (Kuntze) C.F., *H. catharinensis* Cabrera, *H. chillensis* (Kunth) Hieron, *H. lutea* (Vell.) Britton, *H. megapotamica* Cabrera e *H. microcephala* (Schi. Bip) Cabrera. Estas espécies estão incluídas em três dos sete grupos filogenéticos descrito por Tremetsberger et al., (2006) e Reck et al. (2011). Outra espécie sul-americana, *H. variegata* (Lam) Baker e *H. angustifolia* (Litard. & Maire), espécie endêmica do Marrocos considerada como possível ancestral do grupo sul-americano, e duas espécies mediterrâneas (*H. glabra* L., *H. radicata* L.) foram incluídas neste estudo como grupo externo. Detalhes de localidades, número de indivíduos e de acessos são apresentados na Tabela 1.

Extração de DNA

O DNA total foi extraído de folhas preservadas em sílica gel usando o método CTAB (cetyltrimethylammonium bromide, Sigma-Aldrich, Missouri-USA) como proposto por (Doyle e Doyle 1987) com pequenas modificações. Brevemente, a extração foi realizado duas vezes com uma mistura de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e ao sobrenadante foi adicionado 1000 uL de tampão CTAB (CTAB 2%, 20mM-EDTA 0,5M, 100mM-Tris-Hcl 1M e H₂O destilada) para precipitação. Em seguida as

amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 min, e diluídas em tampão TE (0,1mM) acrescido de NaCl (1M) e 1000ul de etanol 95% gelado. Após incubação por 1h a -20° as amostras foram centrifugadas, sendo o precipitado submetido a duas lavagens com álcool 70% e diluído em TE (0,1mM). A qualidade do DNA foi verificado em gel de agarose a 1% e a concentração de DNA foi estimada utilizando o fluorímetro NanoDrop 2000/2000c (Thermo Scientific, Califórnia-USA).

Tabela 1: Espécies, localização, números de indivíduos e número de acesso do Genbank para as espécies de *Hypochoeris* investigadas neste estudo.

Espécies	N AFLP / ITS		Localização	Número de Acesso*
Grupo Microcephala				
<i>H. albiflora</i> (Kuntze) C.F.	3	2	Argentina, Misiones: San Javier Llegando a San Javier, junto a la ruta (EU, CR, PR, 1107)	
<i>H. chillensis</i> (Kunth) Hieron	15	4	Brasil, Rio Grande do Sul: Cambará do Sul (CR, PR, 1512). Argentina, Buenos Aires, La Plata (EU, 941, 942); Magdalena (EU, 940); San Isidro (EU, 943);	
<i>H. microcephala</i> (Schi. Bip) Cabrera	12	10	Argentina, Misiones: General Manuel Belgrano RN 14 e saindo de B. de Irigoyen até Dos Hermanos (EU, CR, PR, 1095, 1096); Eldorado RP 17 (EU, CR, PR, 1099); Oberá, RN 14 e cruce RP5 (EU, CR, PR, 1104) San Javier (EU, CR, PR, 1110); San José ((EU, CR, PR, 1117) e Candelaria RN1 (EU, CR, PR, 1118)	AJ627267
Grupo Lutea				
<i>H. catharinensis</i> Cabrera	4	3	Brasil, Rio Grande do Sul: São José dos Ausentes e Cambará do Sul (MAO, NM, 1906 e 2806)	
<i>H. lutea</i> (Vell.) Britton	2	3	Brasil, Rio Grande do Sul: Fazenda Capão Muniz entre São Francisco de Paula e Cambará do Sul (NM, 1306); Cambará do Sul (NM, 2706)	
Grupo Pampasica				
<i>H. megapotamica</i> Cabrera	5	1	Brasil, Rio Grande do Sul: Município de Rosário (AS, CR, PR, ER, 76 e 97); São Sepé (AS, CR, PR, ER, 65 e 61)	Z93823/Z93839
Outras espécies				
<i>H. tropicalis</i> Cabrera	12	14	Brasil, Rio Grande do Sul: Rodovia RS 306, próximo à Alegrete (AS, CR, PR, ER, 80); BR 472, próximo à Itaqui (AS, CR, PR, ER, 82 e 88); BR 293, próximo à Uruguaiana (AS, CR, PR, ER, 86); BR 377, próximo à Artigas no Uruguai (AS, CR, PR, ER, 87); BR 293, próximo à Rivera no Uruguai (AS, CR, PR, ER, 91); BR 377, Rodovia Osvaldo Aranha, próximo à Uruguaiana (AS, CR, PR, ER, 84);	
<i>H. variegata</i> (Lam.) Baker	2	-	Argentina, Prov. Buenos Aires: Olavarrí'a and Tandil (EU, 212 e 172)	
Outgroup				
<i>H. radicata</i> L.	-	2	Espanha, Huelva: Parque Nacional de Doñana	AF528461 AF528460
<i>H. glabra</i> L.	-	1	Espanha, Huelva: Parque Nacional de Doñana	AJ627264
<i>H. angustifolia</i> (Litard. & Maire) Maire	4	3	Morocco, Middle Atlas: Bekrite e Larais (ST, 267, 193, 703/03 e 73/03). Morocco, Taza: Jbel Tazzeka entre Bab-Azhar and Bab-Bou-Idir.	AJ627261 AJ627260 AJ627259

CR, C.F. Ruas; PM, P.M. Ruas; AS, A. A. Schneider; EU, E. Urtubey; TS, T. Stuessy; MC, M. Cerbah; RS, R. Samuel; KT, K. Tremetsberger; ST, S. Talavera; MAO, M. A. Ortiz. *: Registro no gene bank de seqüências usadas nas análises de ITS.

Reação de AFLP

Para a técnica seguiu-se o protocolo descrito por Vos et al. (1995), com algumas modificações. Para cada amostra cerca de 700ng do DNA genômico foram digeridos e ligados simultaneamente, contendo enzimas *EcoRI* 5U e *MseI* 1U, enzima T4 DNA ligase 2U; tampão T4 DNA ligase 1X; adaptadores, *EcoRI* 0,5 μM e *MseI* 5,0 μM ; NaCl 0,05 M; BSA 50 ng/ μL e DTT 0,25 mM para um volume final de 30 μL . O programa de digestão e ligação dos adaptadores consistiu de incubação por 4h a 37°C para restrição, seguidas de 1h a 22°C, para ligação dos adaptadores, seguido de uma incubação por 10 min a 70°C, para inativação das enzimas de restrição. O produto de digestão foi diluído em água pura na proporção de 1:8, para serem utilizados nas próximas etapas. A amplificação pré-seletiva foi realizada utilizando o kit GoTaq® *Green Master Mix* (Promega, Winchester-USA), primers pré-seletivos *EcoRI* + A e *MseI* + C 4,75 Mm, 3,0 μL da diluição da reação de restrição-ligação e água ultra pura para completar o volume de 10 μL . O programa da amplificação pré-seletiva foi realizada em 1 ciclo de 72°C por 2 min, 20 ciclos de 90°C por 1 s, 56°C por 30 s e 72°C por 2 min seguido de 1 ciclo final de 60°C por 30 min. Na sequência, um volume de 5 μL da reação pré-seletiva carregado em gel de agarose 1%, para se verificar o padrão de amplificação dos fragmentos, sendo o volume restante de 5 μL diluído em 40 μL de água ultrapura. Para a amplificação seletiva foi utilizado três combinações de primers marcados (*EcoRI*-AGC (FAM)/*MseI*-CTG, *EcoRI*-ACT (HEX)/*MseI*-CTT, *EcoRI*-ACT (NED)/*MseI*-CTAG), com cada reação contendo 0,54 μL de cada um dos primers seletivos *MseI* (5 μM) e *EcoRI* (1 μM), 3,5 μL de master mix para PCR (GoTaq® *Green Master Mix*, Promega, Winchester-USA), 2,5 μL da reação de pré-amplificação diluída e 2,92 μL de água ultrapura, para completar o volume de 10 μL . O programa de amplificação seletiva consistiu de 1 ciclo de 94°C por 2 min, 65°C por 30 s e 72°C por 2 min; 8 ciclos de 94°C por 1 s, 64°C por 30 s e 72°C por 2 min; 23 ciclos de 94°C por 1 s, 56°C por 30 s e 72°C por 2 min e 1 ciclo final de 60°C por 30 min. A resolução dos fragmentos foi obtida por eletroforese capilar usando o sistema disponível no analisador automático de DNA modelo 3500xL (Applied Biosystems, Califórnia-USA).

Reação de amplificação das regiões ITS (Internal transcribed spacer)

As sequências ITS (ITS-I-5,8S-ITS-II) foram amplificadas em 14 indivíduos de *H. tropicalis* de sete populações usando os primers descritos em Sun et al. (1994). Além

disso, foram utilizadas sequências das regiões ITS contidas no Genbank para as espécies *H. microcephala*, *H. megapotamica*, *H. angustifolia*, *H. radicata* e *H. glabra* (Tabela 1). A reação de amplificação foi realizada utilizando-se 25 ng de DNA; 7,5 µL de mix para PCR (GoTaq® *Green Master Mix* (Promega, Winchester-USA); 0,6 µL de cada *primer* (10 µM); 0,6 µL de DMSO (dimetilsulfoxide) e água ultra-pura para completar o volume da reação para 15µL. Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando como controle um marcador (*ladder*) de peso molecular conhecido (1kb, Ludwig Biotechnology, Rio Grande do Sul-BR), para confirmar se o fragmento amplificado apresentava o tamanho esperado. Em seguida as amostras foram purificadas com *illustra™ ExoProStar™ 1-Step*, conforme recomendação do fabricante (GE Healthcare, New Jersey-USA), e submetidas a etapa de sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram realizadas em um volume de 10 µL contendo 2,33 µL de tampão (5x), 0,5 µL (5 µM) de forward primer, 0,67 µL de bigdye (BigDye® terminator cycle sequencing ready reaction kit; Perkin-Elmer Applied Biosystems, Califórnia-USA), 1 µL do produto de amplificação purificado e água ultra pura até 10 µL. Esta reação foi repetida e realizada separadamente para o *primer* reverso. As condições usadas para a reação de sequenciamento foram às mesmas utilizadas para a amplificação dos fragmentos ITS. Os produtos da reação foram precipitados em 2,5 µL de EDTA (125 mM) e 30 µL de etanol a 100%, incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e precipitadas por centrifugação a 3000 ×g por 30 min (4°C), sendo em seguida lavadas em 30 µL de etanol (70%) e secas a 95°C por 30 segundos. Para sequenciamento as amostras foram ressuspendidas em 10 µL de formamida Hi-Di, desnaturadas a 95°C por 3 minutos, imediatamente incubadas em gelo por alguns minutos e submetidas à eletroforese capilar no sistema automatizado 3500 xL (Applied Biosystems, Califórnia-USA).

Análise dos dados AFLP

Produtos de amplificação, com tamanhos variando de 100 a 500 pares de bases foram organizados em uma matriz binária de dados, considerando presença (1) e ausência (0) de fragmentos, por meio do software GeneMaPPer® v.4.1 (*Applied Biosystems*, Califórnia-USA). Para construção das árvores filogenéticas foi utilizado distância genética de Nei e Li (1979), com o método de agrupamento *Neighbor-Joining* (NJ) (SAITOU; NEI, 1987), implementado no software PAUP versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2003). O suporte nodal foi obtido com base na metodologia de *bootstrap*

(FELSENSTEIN, 1985) com 10.000 replicatas, usando PAUP versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2003). Os resultados de distância genética obtidos pelo método de NJ foram comparados com aqueles gerados por métodos Bayesianos e implementados no software BEAST versão 1.8.1 (DRUMMOND et al., 2012). Nas inferências bayesianas as árvores são rodadas por 10×10^7 gerações, com uma árvore sendo salva a cada 10.000 gerações. Para visualização das árvores geradas pelo método NJ e Bayesianos foi utilizado o software TreeGraph 2 (STÖVER; MÜLLER, 2010).

Análise das sequências ITS

Os programas Phred v. 071220.c (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998) e Phrap v.1.090518 (GREEN, 1999) foram utilizados para fazer a chamada de bases, bem como para definir a qualidade das mesmas e fazer a montagem de *contigs* por meio do método *shotgun*. Os dois programas são implementados no pacote Chromaseq v.1.12 (MADDISON; MADDISON, 2011a). O método MUSCLE v.3.8.31 (EDGAR, 2004), implementado no pacote Align v.1.11 (MADDISON; WHEELER; MADDISON, 2007), foi usado no alinhamento das sequências. Estes dois pacotes fazem parte do sistema de computação filogenética Mesquite v.3.01 (MADDISON; MADDISON, 2011b). Os gaps foram codificados utilizando o método SIC (*simple indel coding*) (SIMMONS; OCHOTERENA, 2000) onde foram tratados como caracteres binários, por meio do programa SeqState v1.4.1 (MULLER, 2005).

Para determinar a frequência de substituição de nucleotídeos nas análises de Inferência Bayesiana e *Neighbor-Joining*, foi realizado um teste que possibilita estimar o modelo evolutivo das sequências por meio do programa MrModeltest2, usando o parâmetro hLRT (*hierarchical Likelihood Ratio Tests*) (NYLANDER, 2004).

Para Inferência Bayesiana foi utilizado o programa BEAST v.1.8.1 (DRUMMOND et al. 2012), considerando 20×10^7 gerações pela cadeia de Markov e Monte Carlo. A fim de garantir uma fase de *burn-in* adequada, foi utilizado o software Tracer v1.6 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2004). O método *Neighbor-Joining* foi realizado, tendo como distância o modelo evolutivo SYM+G, com o suporte nodal obtido pelo método de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985), com 10.000 replicatas conforme implementado no programa PAUP, versão 4.0b10 (SWOFFORD, 2003). As árvores obtidas foram visualizadas utilizando o programa TreeGraph 2 (STÖVER; MÜLLER, 2010).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Marcadores de AFLP

As ampliações seletivas de AFLP resultaram em 1.213 marcadores das quais 1.103 (88%) foram polimórficas. O número de marcadores por par de primers foi de 279 (78,5% polimórficos), 411 (89% polimorfismo) e 523 (99% polimorfismo) fragmentos, para cada uma das combinações *EcoRI*-AGC/*MseI*-CTG, *EcoRI*-ACT/*MseI*-CTT, e *EcoRI*-ACT/*MseI*-CTT, respectivamente. Um nível considerável de variação genética (77%) foi encontrado entre os indivíduos de *H. tropicalis*, enquanto a diferenciação da espécie em relação aos grupos filogenéticos foi de 23%. *Hypochoeris tropicalis* não foi atribuída ainda a nenhum grupo filogenético visto ser esse o primeiro relato de dados moleculares para esta espécie. O novo conjunto de dados obtidos neste estudo corrobora com os grupos filogenéticos propostos previamente, com base em dados moleculares para as espécies de *Hypochoeris* na América do Sul (Stuessy et al. 2003, 2004; Tremetsberger et al., 2006; Reck et al., 2011). Além disso, o incremento no número de marcadores acrescentou novo grau de confiabilidade das análises e, portanto, dos resultados encontrados.

As árvores geradas pelas análises Bayesianas e NJ (Figuras 1 e 2) mostraram topologia semelhante, com as espécies da América do Sul separadas de *H. angustifolia* com 100% de bootstrap, confirmando assim, a origem monofilética deste grupo (Samuel et al., 2003; Tremetsberger et al., 2006; Reck et al., 2011).

Supõe-se que devido a grande diversidade de habitats disponíveis na América do Sul, um ancestral hipotético tão logo chegou ao continente, se estabeleceu rapidamente e se expandiu por meio de processos de radiação adaptativa, colonizando boa parte do território. Aos eventos de radiação seguiram-se episódios repetidos de especiação, capazes de gerar numerosos tipos de descendentes com características distintas. Porém, essa diferenciação não está completamente definida ao nível de DNA, dificultando a delimitação das espécies dentro do grupo sul-americano (Stebbins et al, 1971; Cerbah et al, 1995, 1998a e 19998b; Ruas et al, 1995 e 2005; Stuessy et al, 2003; Samuel et al, 2003). Mais recentemente marcadores AFLP possibilitaram agrupar as espécies sulamericanas de *Hypochoeris* em clados moleculares (Tremetsberger et al., 2006; Reck et al., 2011). Na presente investigação os dados de AFLP mostram que, as espécies estudadas se associam em três, dos sete clados moleculares já identificados para o grupo,

com altos valores de bootstrap. O primeiro clado (Figura 1), identificado tanto na análise Bayesiana quanto por NJ, associou *H. microcephala*, *H. albiflora* e *H. chillensis*, confirmando-as como espécies co-irmãs dentro do Grupo Microcephala. Observou-se uma maior proximidade filogenética entre *H. microcephala* e *H. albiflora* (70% BS). *Hypochaeris albiflora* foi recentemente separada de *H. microcephala* e elevada a status de espécie (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007). Ainda neste grupo fica evidenciada a formação de subgrupos que associam indivíduos de *H. microcephala* e *H. chillensis* de origens diferentes (Figuras 1 e 2). As três espécies do Grupo Microcephala compartilham características morfológicas (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2005) e cromossômicas, sendo também classificadas no mesmo grupo cariotípico com base na distribuição idêntica de sítios de rDNA (Weiss-Schneeweiss et al., 2003, 2008; Ruas et al., 2005; Reck et al. 2011). Além disso, as três espécies podem ser encontradas na mesma área, como é o caso de *H. albiflora* (amostras 1107) e *H. microcephala* (amostras 1110), onde se observa com frequência a presença de prováveis híbridos naturais, com plantas apresentando características intermediárias entre as duas espécies (i.e, flores branco-amareladas, CR, observação pessoal).

Tem sido também mostrado que, co-ocorrência de *H. chillensis* com outras espécies favorece eventos de hibridação, como observado, por exemplo, em híbridos originados a partir de cruzamentos naturais entre *H. chillensis* x *H. albiflora* e *H. chillensis* x *H. microcephala* e *H. chillensis* x *H. megapotamica* (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2005). Em geral os híbridos são identificados pela presença de frutos atrofiados e características morfológicas intermediárias às dos parentais (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007). Tremetsberger et al. (2006) mostraram, com base em estudos de AFLP, que espécimens com características intermediárias (i.e. presença de flores de cores amarelas e brancas em ramos diferentes da mesma planta) ocupavam posição também intermediária entre os possíveis progenitores (*H. chillensis* x *H. albiflora*) na filogenia do grupo. É interessante ressaltar que *H. chillensis* apresenta como principal característica sua a ampla distribuição na América do Sul, sendo a única representante sul-americana de *Hypochaeris* com distribuição cosmopolita (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007). Apesar das dificuldades de diferenciação morfológica, os filogramas obtidos por abordagem Bayesiana e pelo método de NJ evidenciam que as três espécies são geneticamente distintas e isoladas reprodutivamente, visto que não existem relatos de híbridos férteis entre estas espécies.

Outro clado identificado usando os métodos Bayesianos agrupa as espécies *H. catharinensis* e *H. lutea*, que compõem o Grupo Lutea (Reck et al., 2011), com alto grau de suporte (70% BS). As duas espécies compartilham das mesmas características cromossômicas com os sítios de rDNA 35S ocupando a mesma posição sub telomérica, no braço curto do cromossomo três, o que as coloca no mesmo grupo (Reck et al., 2011). Embora os dados de AFLP confirmem a grande afinidade filogenética entre *H. cathariensis* e *H. lutea*, a similaridade genética entre ambas não tem correlação com características morfológicas e ecológicas. Morfologicamente, *H. cathariensis* and *H. lutea* se distinguem claramente pela presença de caules simples x ramificados, folhas basais x caulinares, corolas menores ou iguais x maiores que os involúcros e lígulas menores x maiores que o tubo da corola, além de curtos x longos aquênios (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007). Além disso, *H. catharinensis* apresenta folhas rosuladas enquanto em *H. lutea*, as folhas são longas e estreitas, que favorecem a incidência de luz e obtenção dos recursos fotosintéticos (Matzenbacher 1998). Ecológicamente, *H. catharinensis* se caracteriza por habitar solos rasos, que favorecem o desenvolvimento de raízes horizontais, de campos abertos e florestas de araucárias onde prevalecem as gramíneas. Por outro lado, *H. lutea* é adaptada a ambientes úmidos e apresenta uma plasticidade, que a torna apta a ocupar uma grande variedade de regiões fisiográficas, sendo encontrada em associação com gramíneas, esfagno, *Baccharis* ssp, além de outras espécies adaptadas a solos profundos e pantanosos (Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher 2007; Matzenbacher 1998).

Os indivíduos de *H. megapotamica* (Grupo Pampasica) aparecem associados com 100% de bootstrap em um único clado, posicionado próximo ao Grupo Lutea na árvore filogenética (64% BS). Assim como *H. catharinensis* e *H. lutea*, *H. megapotamica* exibe um único sítio de rDNA, identificado no terceiro par de cromossomos, porém em posição pericentromérica (Weiss-Schneeweiss et al., 2003, 2008; Ruas et al., 1995, 2005). No Brasil, esta espécie está distribuída nos estados do Rio Grande do Sul, onde pode ser encontrada em simpatria com *H. tropicalis*, e em Santa Catarina, além de relatos de ocorrência na Argentina e no Uruguai (Bortiri, 1999, Cabrera, 1937, 1974, Cabrera et al., 2000).

A inclusão da espécie *H. tropicalis* em um estudo de filogenia molecular juntamente com outras espécies sul-americanas, baseou-se na análise de 12 indivíduos obtidos a partir de cinco populações distintas (para os dados de AFLP), coletadas na

região sudoeste, no Rio Grande do Sul (Brasil). A análise filogenética, obtida tanto por meio de métodos Bayesianos como por NJ mostra que todos os indivíduos de *H. tropicalis* analisados se associam em um único cluster (Figuras 1 e 2), identificando a espécie como uma única entidade filogenética, dando suporte ao nível de diferenciação (23%) observado entre *H. tropicalis* e os outros grupos. Dentro do cluster, entretanto, se observa que indivíduos amostrados de diferentes áreas apareceram misturados ou separados em pequenos grupos que recebem suportes variáveis de bootstrap. A análise Bayesiana identifica o cluster formado por *H. tropicalis* associado externamente aos outros grupos filogenéticos com fraco suporte (BS abaixo de 50%), com indivíduos de mesma origem tendendo a se manter associados. Já na reconstrução filogenética obtida por meio do método de NJ, o cluster de *H. tropicalis* se associa aos grupos Pampasica e Lutea (54% BS), enquanto os indivíduos dentro do cluster mostram o mesmo padrão de associação observado na análise Bayesiana, mas com os nós mostrando valores inferiores de bootstrap.

Análise citogenética de *H. tropicalis* por meio de métodos convencionais de coloração (Feulgen e banda NOR) identificou as mesmas características cromossômicas das espécies sulamericanas de *Hypochoeris*, com cariótipo bimodal com $2n (x=4) = 8$, com um único sítio de rDNA 35S, localizado em posição pericentromérica no braço curto do cromossomo 3 (dados não mostrados). Deste modo, a maior proximidade genética entre *H. tropicalis* e as espécies dos grupos Pampasica e Lutea encontra suporte tanto nos dados moleculares como também nos dados sobre estrutura cariotípica, tendo em vista que todas compartilham características cromossômicas, como a presença de um único sítio de rDNA 35S no cromossomo 3, embora a posição deste sítio possa variar de pericentromérica (Grupo Pampasica) a subtelomérica (Grupo Lutea) (Ruas et al., 1995, 2005; Weiss-Schneweiss, 2003, 2007, 2008).

As análises (Bayesiana e NJ) mostraram que a espécie *H. variegata*, sem grupo filogenético atribuído até o momento, se apresenta isolada das demais espécies, porém se associa aos demais grupos filogenéticos com 70% (método Bayesiano) e 98% (NJ) de suporte (Figura 1 e 2). Esses dados mostram que, definir a posição filogenética de *H. variegata* entre as espécies sul-americanas do gênero é um problema que ainda carece de solução. As análises Bayesianas e NJ também separam as espécies de *Hypochoeris* da América do Sul de *H. angustifolia* com 100% de bootstrap, corroborando com outros

dados já relatados para o gênero (Tremetsberger et al. 2006; Reck et al. 2011; Samuel et al. 2003).

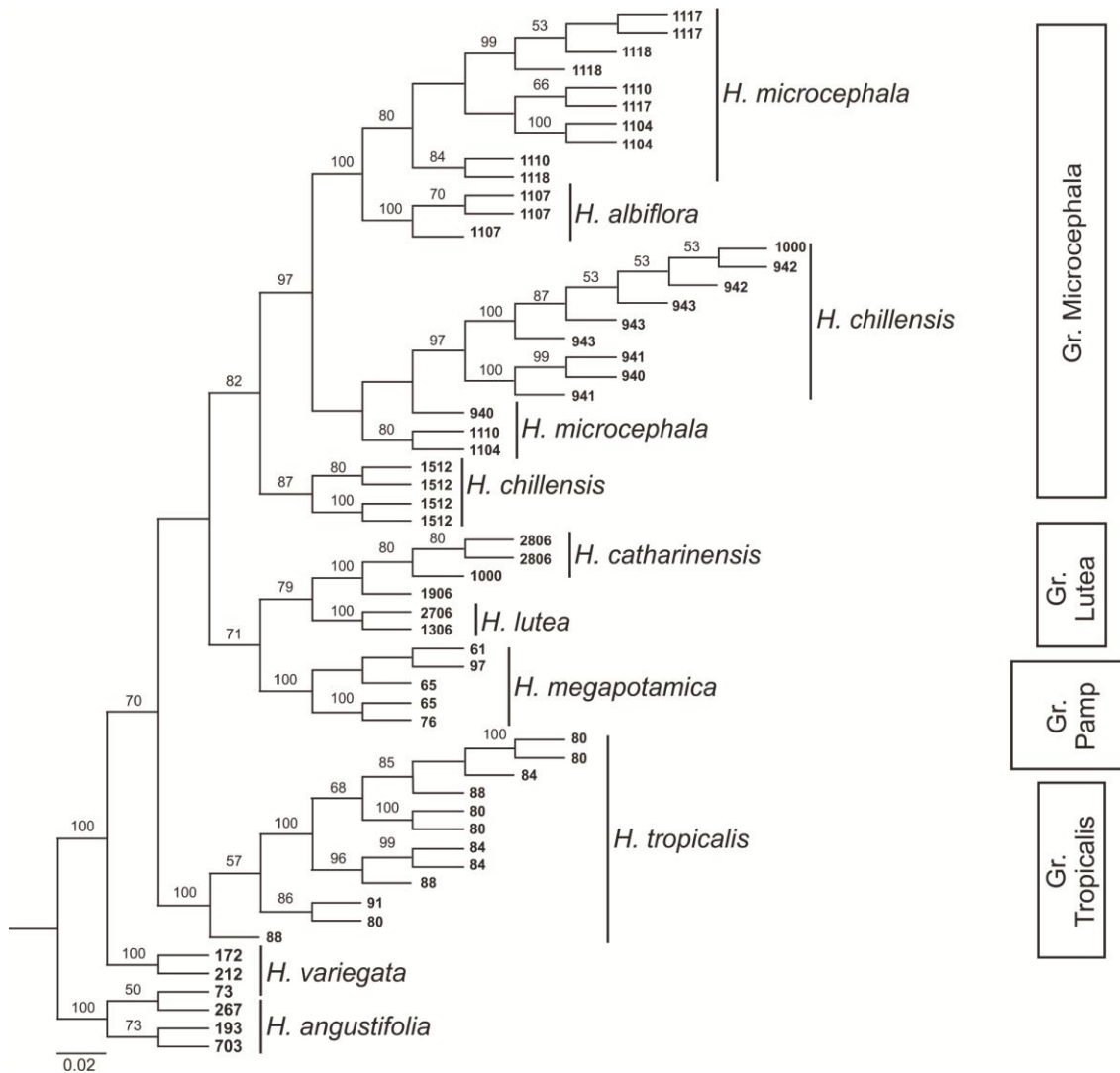


Figura 1: Árvore consenso das espécies sul-americanas de *Hypochaeris* obtida a partir de marcadores de AFLP, avaliados por meio de métodos Bayesianos, com 10.000 replicações de bootstrap. Cada amostra está representada pelo número de coleta (Tabela 1). Os números acima dos nós identificam o grau de suporte das associações, sendo que valores de bootstrap abaixo de 50% foram ocultados.

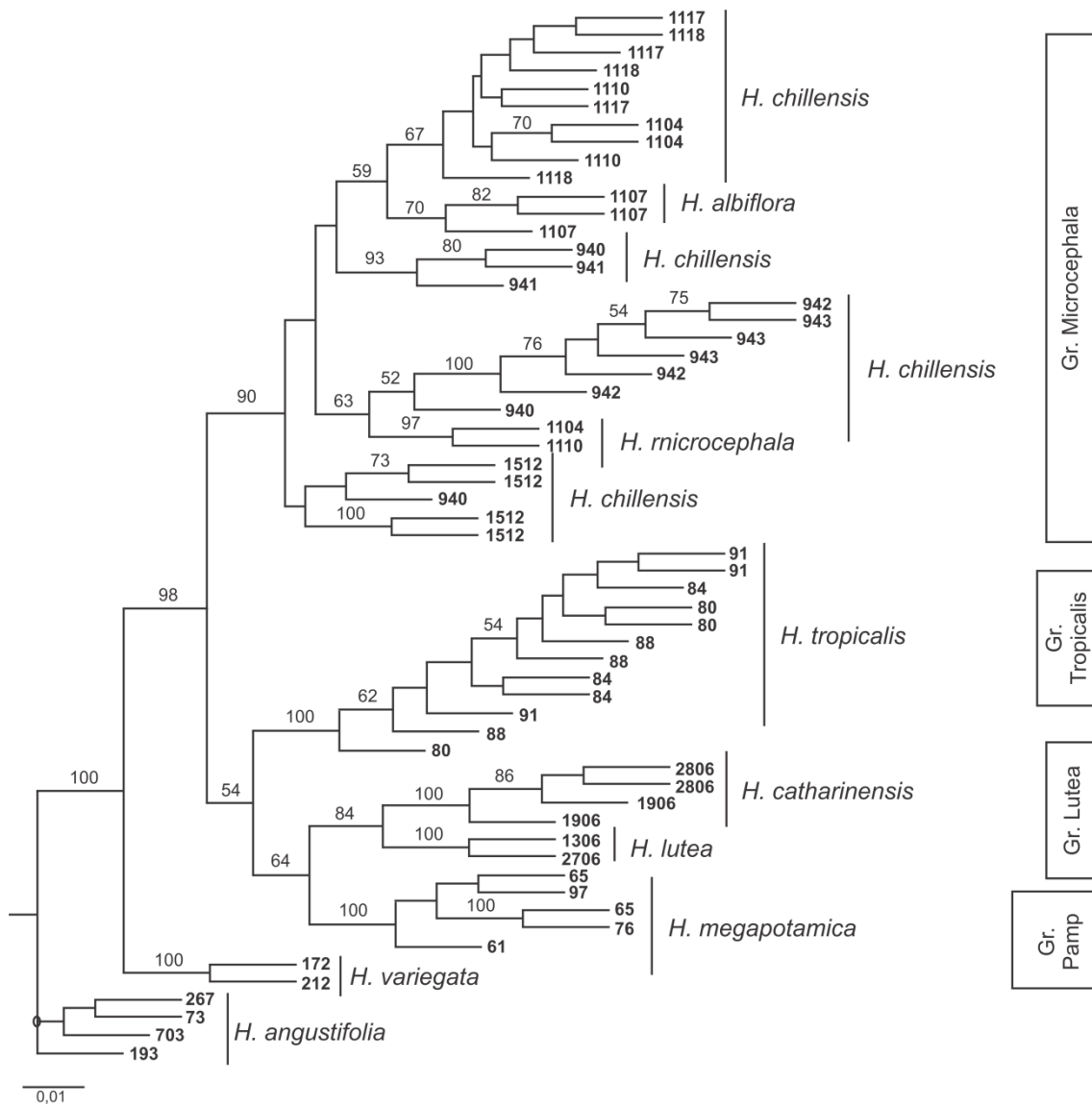


Figura 2: Árvore consenso das espécies sul-americanas de *Hypochaeris* obtida a partir de marcadores de AFLP, avaliados por meio de métodos *Neighbor-Joining*, com 10.000 replicações de bootstrap. Cada amostra esta representada pelo número de coleta (Tabela 1). Os números acima dos nós identificam o grau de suporte das associações, sendo que valores de bootstrap abaixo de 50% foram ocultados.

Inferências filogenéticas com base em sequências ITS

Neste trabalho foram também utilizadas sequências das regiões de ITS do rDNA nuclear (nrDNA) para inferir sobre a posição filogenética de *H. tropicalis*. O sequenciamento direto de regiões ITS do nrDNA foi realizado para 37 indivíduos, representando oito espécies de *Hypochaeris* da América do Sul. Para comparação foram também utilizadas oito sequências de ITS nuclear depositadas em banco de dados

(genebank), representando três espécies da região do Mediterrâneo, incluindo *H. angustifolia*, co-irmã das espécies sul-americanas e *H. glabra* e *H. radicata*, consideradas como grupo externo. Foram analisados 643 caracteres, compreendendo as regiões ITS1-5,8S-ITS2 dos quais, 88 (13,7%) foram filogeneticamente informativos. Cerbah et al. (1998) identificaram 129 caracteres informativos em regiões ITS1 e ITS2 de 14 espécies de *Hypochoeris*, incluindo dez espécies do grupo mediterrâneo e quatro da América do Sul. Por outro lado, Samuel et al. (2003), analisando regiões ITS1 e ITS2 para acessar as relações filogenéticas em 31 espécies, incluindo todas as seções taxonômicas do gênero *Hypochoeris*, além de outros gêneros relacionados como grupos externos. Em nossa análise identificamos um número de 274 caracteres (variando de 262-266) para as sequências de ITS1 e 236 (variando de 116-235) para ITS2, corroborando com os dados obtidos por outros autores (Tremetsberger et al, 2005; Samuel et al, 2003; Cerbah et al, 1998).

Assim como os dados de AFLP, as filogenias obtidas tanto por inferências Bayesianas e pela análise de NJ para as sequências ITS (Figuras 3 e 4) evidenciaram as espécies sul-americanas formando um clado monofilético separado das espécies mediterrâneas com 100% de bootstrap, corroborando com relatos da literatura (Cerbah et al., 1998; Samuel et al., 2003). Os cladogramas formados para as espécies da América do Sul apresentam topologias semelhantes, tanto para AFLP como para ITS, na delimitação das espécies do grupo Lutea mas, foram incongruentes para as associações vistas no grupo Microcephala, onde os nós internos que agrupam as espécies e/ou indivíduos, apresentam suportes mais baixos para os dados de ITS (Figura 4).

Nas duas árvores filogenéticas de ITS são definidos mais claramente dois cladogramas entre as espécies sul-americanas. Os indivíduos de *H. tropicalis* se agrupam em único clado que se associa em posição basal, próximo a espécies do grupo Microcephala (por inferência Bayesiana, 100% BS), ou próximo ao grupo Lutea (NJ, 72% BS) confirmando *H. tropicalis* como espécie verdadeira. Outro clado agrupa as espécies *H. catharinensis* e *H. lutea* que compõem o grupo Lutea com 100% e 52% de bootstrap, para inferência Bayesiana e NJ, respectivamente, corroborando com os relatos de Reck et al. (2011). Os indivíduos de *H. albiflora*, *H. chillensis* e *H. microcephala* (grupo Microcephala) e o único representante de *H. megapotamica* (grupo Pampasica) aparecem misturados e formam associações que recebem fraco suporte de bootstrap nas

duas análises, sendo esse padrão considerado comum em grupos com diversificação rápida e recente (Samuel et al. 2003).

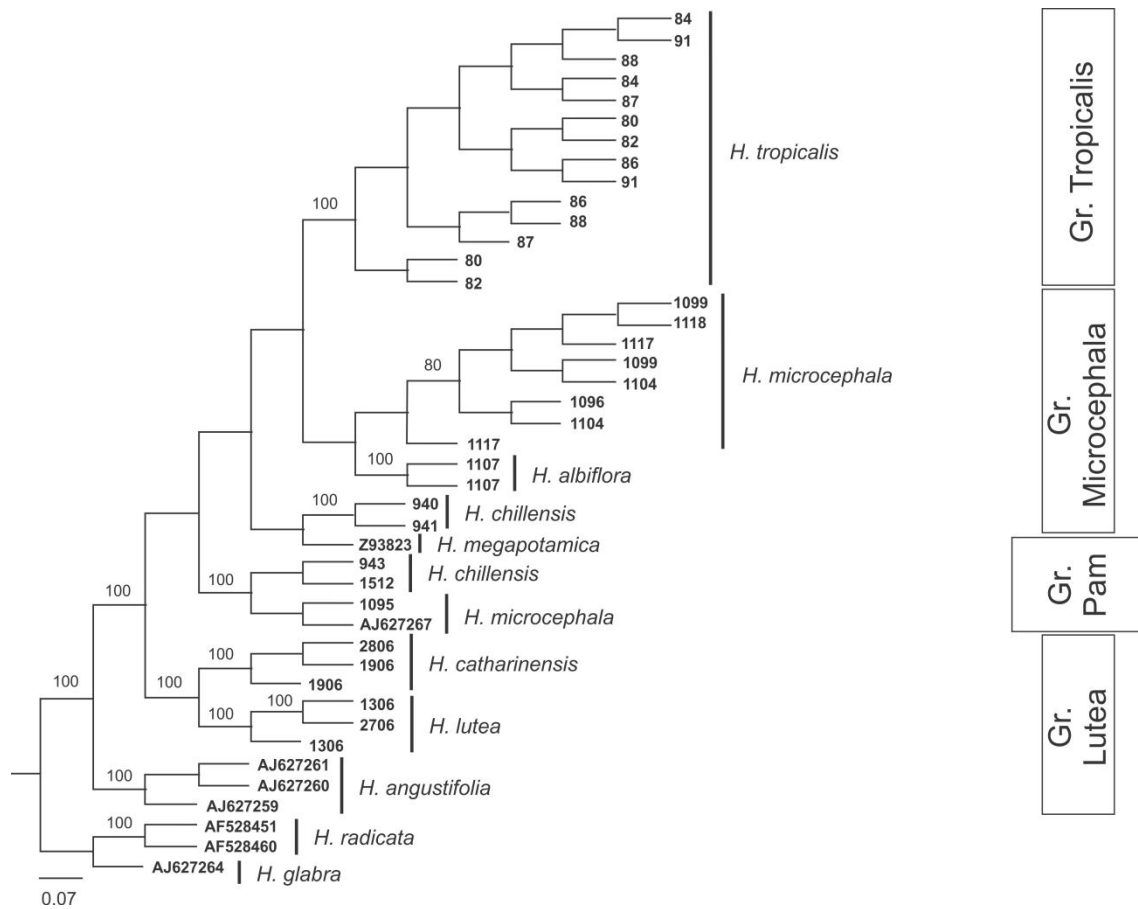


Figura 3: Árvore consenso das espécies sul-americanas de *Hypochaeris* obtida a partir de sequências ITS, avaliados por meio de métodos Bayesianos, com 10.000 replicações de bootstrap. Cada amostra está representada pelo número de coleta (Tabela 1). Os números acima dos nós identificam o grau de suporte das associações. Valores de bootstrap abaixo de 50% foram ocultados.

dificultam ainda mais as delimitações dessas espécies dentro do gênero (Samuel et al. 2003; Stuessy et al. 2003; Tremetsberger et al. 2005, 2006; Azevedo-Gonçalves e Matzenbacher 2007; Weiss-Schneeweiss et al. 2008).

Nossos resultados mostraram que *H. tropicalis* é uma espécie geneticamente distinta dentro do grupo sul-americano, que se caracteriza por sua adaptação a ambientes restritos. Observou-se que *H. megapotamica*, espécie de distribuição mais ampla, pode ocorrer em simpatria em algumas áreas de distribuição de *H. tropicalis*. As duas espécies também apresentam a mesma distribuição dos sítios de rDNA 35S, situados adjacente ao centrômero no braço curto do cromossomo 3 (Ruas et al., 1995, 2005; Weiss-Schneeweiss, 2003, 2008; neste trabalho). Entretanto, as inferências filogenéticas, obtidas tanto com marcadores AFLP quanto com sequências ITS, mostram que as duas espécies são pouco relacionadas geneticamente, com todos os indivíduos de *H. tropicalis* formando um único cluster. Além disso, nos estudos de campo onde as espécies coexistem não foram identificados híbridos naturais (observação pessoal), como ocorre para outras espécies que ocupam o mesmo ambiente (Azevedo-Gonçalves e Matzenbacher, 2007). Nossos resultados mostram claramente *H. tropicalis* é uma espécie geneticamente diversa e nos permite considerá-la como uma entidade filogenética exclusiva dentro do grupo sul-americano, propondo sua inclusão em um novo grupo filogenético, ou Grupo Tropicalis.

CONCLUSÃO

Marcadores moleculares de AFLP e sequências ITS possibilitaram a inserção de *H. tropicalis* na filogenia de *Hypochoeris* da América do Sul. Os marcadores AFLP possibilitaram definir a posição de *H. tropicalis* entre os grupos Lutea e Pampasica. Os resultados confirmam que *H. tropicalis* é uma espécie verdadeira que pode ser incluída em um novo grupo filogenético, ou Grupo Tropicalis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevêdo-Gonçalves CF, and Matzenbacher NI (2005) Taxonomic notes in *Hypochoeris* (Asteraceae). *Compositae Newsletter* 42: 1-4.
- Azevêdo-Gonçalves CF, Matzenbacher NI (2007) O gênero *Hypochoeris* (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Botânica* 62: 55-87.
- Bortiri E (1999) Flora Fanerogâmica Argentina. Asteraceae, Lactuceae: *Hypochoeris*. *Conicet* 63: 1-25.
- Cabrera AL (1937) Compuestas Argentinas nuevas o interesantes. *Notas del Museo de la Plata* 2: 171–204.
- Cabrera AL (1963) Estudios sobre o gênero *Hypochoeris*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 10: 166- 195.
- Cabrera AL (1974) Compositae. In: Burkart A (ed) *Flora Ilustrada de Entre Ríos* (Argentina). *Collección Científica del INTA, Buenos Aires*, 512–525.
- Cabrera AL, Crisci JV, Delucchi G, Freire SE, Giuliano DA, Iharlegui L, Katinas L, Sáenz AA, Sancho G, Urtubey E (2000) *Catálogo ilustrado de las compuestas (Asteraceae) de la provincia de Buenos Aires, Argentina: Sistemática, Ecología y Usos*. *Conicet, Buenos Aires*.
- Cerbah M, Coulaud J, Brown SC, Siljak-Yakovlev S (1998a) rDNA organization and evolutionary relationship in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae). *J. Hered* 89: 312-318.
- Cerbah M, Souza-Chies T, Jibier MF, Lejeune B, Siljak-Yakovlev S (1998b) Molecular phylogeny of the genus *Hypochoeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution. *Molecular Biology Evolution* 15: 345–354.
- Defillips RA (1976) *Hypochoeris* L. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, Chater AO, Defillips RA, Richardson IBK (eds). *Flora Europaea*. Cambridge University Press, Cambridge, 4: 308-310.
- Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A, (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology Evolution* 29: 1969-1973.
- Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-1797.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47–50.
- Ewing B, and Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186–194.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, and Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8: 175–185.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Green P (1999) Phrap, versão 0.990329, distribuído pelo o autor: <http://www.phrap.org>

Hodkinson TRSA, Renvoize G, Ní Chonghaile C, Stapleton MW (2000). A comparison of ITS Nuclear rDNA sequence data and AFLP markers for phylogenetic studies in *Phyllostachys* (Bambusoideae, Poaceae). *Journal of Plant Research* 113: 259-269.

Koopman WJM (2005). Phylogenetic signal in AFLP data sets. *Systematic Biology* 54: 197–217.

Maddison DR, Maddison WP, (2011a) Chromaseq: a Mesquite module for analyzing sequence chromatograms. Version 1.0. <http://mesquiteproject.org/packages/chromaseq>

Maddison WP, Maddison DR, (2011b) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>

Maddison DRTJ, Wheeler and WP Maddison (2007). Align: a Mesquite package for aligning sequence data. Version 1.11. <http://mesquiteproject.org>

Müller K (2005). SeqState—primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics* 4: 65-69.

Matzenbacher NI (1998) O complexo “Senecionóide” (Asteraceae—Senecioneae) no Rio Grande do Sul—Brasil. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Nylander JAA, Ronquist F, Huelsenbeck JP, Nieves-Aldrey JL (2004). Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology*.53: 47-67.

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

Ortiz MA, Tremetsberger K, Terrab A, Stuessy TF, García-Castanõ JL, Urtubey E, Baeza CM, Ruas CF, Gibbs PE, Talavera S. (2008). Phylogeography of the invasive weed *Hypochaeris radicata* (Asteraceae): from Moroccan origin to worldwide introduced populations. *Molecular Ecology* 17: 3664–3667.

Rambaut A, and AJ Drummond (2004). Tracer. University of Oxford, Oxford.

Reck M, Benício L, Ruas EA, Rodrigues LA, Ruas PM, Ortiz MA, Talavera S, Urtubey E, Stuessy T, Weiss-Schneeweiss H, et al.(2011). Karyotype and AFLP data reveal the phylogenetic position of the Brazilian endemic *Hypochaeris catharinensis* (Asteraceae). *Plant Systematic Evolution* 296: 231–243.

Ruas CF, Ruas PM, Metzenbacher NI, Ross G, Bernini C, Vanzela ALL, (1995) Cytogenetic studies of some *Hypochoeris* species (compositae) from Brasil. American Journal of botany 82: 369–375.

Ruas CF, Vanzela ALL, Santos OM, Fregonez JN, Ruas PM, Matzenbacher NI, Aguiar-Perecin MLR (2005). Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochoeris* species (Asteraceae) from Brazil. Genetic Molecular Biology 28: 129–139.

Saitou N, Nei M 1987. The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Molecular Biology Evolution 4: 406-425.

Samuel R, Stuessy TF, Tremetsberger K, Baeza CM, Siljak-Yakovlev S (2003) phylogenetic relationships among species of *Hypochoeris* (Asteraceae, lactuceae) based on its, plastid trnI intron, trnI-f spacer and matk sequences. American Journal of Botany 90: 496–507.

Simmons MP, Ochoterena H (2000). Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. Systematic Biology 49: 369-381.

Stebbins GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, London, UK.

Stöver BC, Müller KF (2010) TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. BMC Bioinformatics 11: 7.

Stuessy T, Tremetsberger K, Samuel R, Jankowicz J, Guo Y-P, Muellner AN, Baeza,CM (2004). Phylogenetic relationships among South American species of *Hypochoeris* (Asteraceae) based on AFLP data. In: Schaal BA, Chiang TY, Chou CH (eds) Plant evolutionary genetics and the biology of weeds. Chi-Chi: Endemic Species Research Institute 23–39.

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

Sun YDZ, Skinner GH, Liang, and SH Hulbert (1994). Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. Theoretical and Applied Genetics 89: 26–32.

Suzaki V (2011). Filogenia e biogeografia do complexo *Croton pallidulus* (Euphorbiaceae), inferidas por sequências de DNA e marcadores AFLP. Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas na área de botânica. Universidade de São Paulo – São Paulo – SP.

Swofford DL (2003). PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Beta, Vers. 4.0b 10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Terrab A, Ortiz MA, Talavera M, Ariza MJ, Moriana MC, García-Cataño JL, Tremetsberger K, Stuessy TF, Baeza M, Urtubey E, Ruas CF, Casimiro-Soringuer R, Balao F, Gibbs PE, Talavera S (2009) AFLP and breeding system studies indicate

vicariance origin for scattered populations and enigmatic low fecundity in the Moroccan endemic *Hypochaeris angustifolia* (Asteraceae), sister taxon to all of the South American *Hypochaeris* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 13-22.

Tremetsberger K, Stuessy TF, Kadlec G, Urtubey E, Baeza CM, Beck SG, Valdebenito HÁ, Ruas CF, Matzenbacher NI (2006) aflu phylogeny of south american species of *Hypochaeris* (Asteraceae, lactuceae). *Systematic Botany* 31: 610–626.

Tremetsberger K, Weiss-Schneeweiss H, Stuessy T, Samuel R, Kadlec G, Ortiz MA, Talavera S (2005) nuclear ribosomal dna and karyotypes indicate a nw african origin of south american *Hypochaeris* (Asteraceae, cichorieae). *Molecular Phylogenetic Evolution* 36: 102-116.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for dna fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 407-4414.

Weiss-Schneeweiss H, Stuessy TF, Siljak-Yakovlev S, Baeza CM, Parker J (2003) Karyotype evolution in south american species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Plant Systematic and Evolution* 241: 171–184.

Weiss-Schneeweiss H, Tremetsberger K, Schneeweiss GM, Parker JS, Stuessy TF (2008) Karyotype diversifications and evolution in diploid and polyploid south american *Hypochaeris* (Asteraceae) inferred from rdna localization and genetic fingerprint data. *Annals of Botany* 101: 909-918.

Weiss-Schneeweiss H, Stuessy TF, Tremetsberger K et al. (2007) Chromosome numbers and karyotypes of South American species and populations of *Hypochaeris* (Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 49–60.

Záveská Drábková L, Kirschner J, Štěpánek J, Záveský L, Vlček Č (2009) Analysis of nrDNA polymorphism in closely related diploid sexual, tetraploid sexual and polyploid agamospermous species. *Plant Systematics and Evolution* 278: 67–85.

4. CONCLUSÃO GERAL

As análises de populações de *H. tropicalis* com marcadores AFLP e SSR mostraram um padrão característico de espécies alógamas, bem como uma baixa diferenciação genética entre estas, não definindo assim um padrão claro de estruturação. Provavelmente isto pode estar associado a processos de radiação adaptativa e diversificação recente do gênero na América do Sul. Análise dos dados filogenéticos obtidos para ambos, AFLPs ITS, foram congruentes, mostrando que *H. tropicalis* é uma espécie geneticamente distinta, com todos os indivíduos associados em um único cluster, dentro do grupo sul-americano e próximo dos grupos Pamasic e Lutea, podendo ser incluída em um novo grupo filogenético, ou Grupo Tropicalis.

5. REFERÊNCIAS GERAIS

- AGARWALL M.; SHRIVASTAVA N.; PADH H. **Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences**. Plant Cell Reports 27: 617-631, 2008.
- AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. Sunderland: Sinauer 2: 684, 2004.
- AYRES M.; AYRES J.R M.; AYRES D.L.; SANTOS A.S. **Bioestat: 2.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológica e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá, Belém, 2007.
- AZEVÊDO-GONÇALVES C.F.; MATZENBACHER N.I.; **Taxonomic notes in *Hypochoeris* (Asteraceae)**. Compositae Newsletter 42: 1-4, 2005.
- AZEVÊDO-GONÇALVES C.F.; MATZENBACHER N.I.; **O gênero *Hypochoeris* (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. Iheringia, Série Botânica 62: 55-87, 2007.
- BARBARÁ T.; ET AL. **Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations**. Molecular Ecology 16: 3759–3767, 2007.
- BARROSO G.M.; **Sistemática de angiosperma no Brasil subclasse: Asteridae**. Viçosa, 3: 326, 1991.
- BORTIRI **Flora Fanerogâmica Argentina. Asteraceae, Lactuceae: *Hypochoeris***. Conicet 63: 1-25, 1999.
- BREMER K. **Asteraceae – Cladistics & Classification**. Timber Press, Portland, 752, 1994.
- BUSO G. S. C. **Marcadores moleculares e análise filogenética – Documento 137**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia 22, 2005.
- CABRERA A.L. **Compuestas Platenses**. Revista del centro estudiantes de agronomía y veterinária, Buenos Aires 139: 17-52, 1929.
- CABRERA A.L. **Estudios sobre o gênero *Hypochoeris***. Boletín de la sociedad argentina de botânica 10: 166- 195, 1963.
- CABRERA A.L. **Materiales para una revisión, del gênero *Hypochoeris*. I. *Hypochoeris chillensis* (h.b.k.) Hieron**. Darwiniana, 20: 312-322, 1976.
- CABRERA A.L.; WILLINK A. **Biogeografía da America Latina**. Washington dc: Secretaria geral da organização dos estados americanos 2ª Ed., 1980.
- CABRERA A.L. **Compuestas Argentinas nuevas o interesantes**. Notas del Museo de la Plata 2: 171–204, 1937.
- CABRERA A.L. **Compositae. In: Burkart A (ed) Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina)**. Coleccion Científica del INTA, Buenos Aires 512–525, 1974.
- CABRERA A.L.; CRISCI J.V.; DELUCCHI G.; FREIRE S.E.; GIULIANO D.A.; IHARLEGUI L.; KATINAS L.; SA'ENZ A.A.; SANCHO G.; URTUBEY E. **Catálogo**

ilustrado de las compuestas (Asteraceae) de la provincia de Buenos Aires, Argentina: Sistemática, Ecología y Usos. Conicet, Buenos Aires, 2000.

CAVALLI S.S.; WINGE H. **Variabilidade genética em populações naturais. In: Genética e Evolução Vegetal.** Freitas LB, Bered F (Org.). Porto Alegre: Ed. UFRGS, 165-175, 2003.

CERBAH M.; COULAUD J.; BROWN S.C.; SILJAK-YAKOVLEV S. **rDNA organization and evolutionary relationship in the genus *Hypochoeris* (Asteraceae).** J. Hered 89: 312-318, 1998a.

CERBAH M.; SOUZA-CHIES T.; JIBIER M.F.; LEJEUNE B.; SILJAK-YAKOVLEV S. **Molecular phylogeny of the genus *Hypochoeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution.** Molecular Biology Evolution 15: 345–354, 1998b.

CERBAH M.; COULAUD J.; GODELLE B.; SILJAK-YAKOVLEV S. **Genome size, fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species.** Genome 38: 689–695, 1995.

CHAVES C.L. **Estrutura genética de populações de *Hypochoeris catharinensis* Cabrera (Asteraceae) utilizando marcadores de microssatélites.** 2012. Dissertação de Mestrado em Agronomia. Universidade Estadual de Londrina. Londrina – Pr, 2012.

CORNUET J.M.; LUIKART G. **Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data.** Ecology Resources 9: 1322-1332, 1996.

DEFILLIPS R.A. *Hypochoeris* L. In: TUTIN T.G.; HEYWOOD V.H.; BURGESS N.A.; MOORE D.M.; VALENTINE D.H.; WALTERS S.M.; WEBB D.A.; CHATER A.O.; DEFILLIPS R.A.; RICHARDSON I.B.K.(EDS). **Flora Europaea.** Cambridge University Press, Cambridge, 4: 308-310, 1976.

DIAS L. **Análises Multidimensionais. In: Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos.** Viçosa: Editora UFV 2: 405-475, 2006.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. **A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** Phytochemical Bulletin 19: 11-15, 1987.

DRUMMOND A.J.; SUCHARD M.A.; XIE D.; RAMBAUT A. **Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7.** Molecular Biology Evolution 29: 1969-1973, 2012.

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

EDGAR R.C. **MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput.** Nucleic Acids Research 32: 1792-1797, 2004.

ELLEGREN H. **Microsatellites: simple sequences with complex evolution.** Nature Reviews Genetics 5: 435–445, 2004.

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

EWING B.; GREEN P. **Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. II. Error probabilities.** *Genome Research* 8: 186–194, 1998.

EWING B.; HILLIER L.; WENDL M. C.; GREEN P. **Base-calling of automated sequencer traces using *phred*. I. Accuracy assessment.** *Genome Research* 8: 175–185, 1998.

EXCOFFIER L.; LAVAL G.; SCHNEIDER S. **Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis.** *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47–50, 2005.

FELSENSTEIN J. **Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap.** *Evolution* 39: 783-791, 1985.

FERREIRA E GRATTAPAGLIA. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** Embrapa - Cenargen, Brasília 3: 220, 1998.

FUTUYMA D.J. **Biologia evolutiva.** FUNPEC-RP, Ribeirão Preto 2: 631, 1992.

GARCIA E.M.; BOLDRINI I.I.; JACQUES A.V.A. **Dinâmica de formas vitais de uma vegetação campestre sob diferentes práticas e exclusão.** *Iheringia Série Botânica, Porto Alegre* 2: 215-241, 2000.

GIRARDI-DEIRO A.M.; GOMES K.E. **Sistema de Criação para a Terminação de Bovinos de Corte na Região Sudoeste do Rio Grande do Sul.** EMBRAPA PECUÁRIASUL, 2008. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/BovinoCorte/BovinoCorteRegiaoSudoesteRioGrandeSul/aspectosecologicos.htm>. Acesso: 02/10/2014.

GITZENDANNER M.A.; SOLTIS P.S. **Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners.** *American Journal of Botany* 87: 783-792, 2000.

GOUDET J. **FSTAT: a program to estimate and test diversities and fixation indices (version 2.9.3.2).** Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2014.

GREEN P. **Phrap, versão 0.990329,** 1999. Distribuído pelo autor: <http://www.phrap.org>

HAMRICK J.L. **Plant population genetics and evolution.** *American Journal of Botany* 69(10): 1685-1693, 1982.

HAMRICK J.L. **Plant population genetics and evolution.** *American Journal of Botany* 10: 1685-1693, 1992.

HAMRICK J.L.; GODT M.J.W. **Allozyme diversity in plant species. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, (ed) Plant Population Genetics, breeding and Genetic Resources.** Sinauer Associates, Sunderland 43-63, 1989.

HARTL D.L.; CLARK A.G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts 4: 652, 2007.

HODKINSON T. R. S. A.; RENVOIZE G. N.Í.; CHONGHAILE C.; STAPLETON M.W.; CHASE. **A comparison of ITS Nuclear rDNA sequence data and AFLP markers for phylogenetic studies in *Phyllostachys* (Bambusoideae, Poaceae)**. Journal of Plant Research 113: 259-269, 2000.

HOFFMANN O. **Liguliflorae-chichoriae**. in: engler a, prantl k, (eds) **die naturlichen pflanzenfamilien**. Leipzig 350–387, 1891.

HUBISZ J.M.; FALUSH D.; STEPHENS M.; PRITCHARD J.K. **Inferring weak population structure with the assistance of sample group information**. Molecular Ecology Resources 9: 1322-1332, 2009.

HUGHES C.R.; QUELLER D.C. **Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a specie with little allozyme polymorphism**. Molecular Ecology 2: 131-137, 1993.

JUDD W.S. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. Massacgusetts: Sinauer Associater inc. 464, 1999.

KOOPMAN W. J. M. **Phylogenetic signal in AFLP data sets**. Systematic Biology 54: 197–217, 2005.

LANE M.A. **Pollination biology of compositae in compositae: biology and utilization (p.d.s. caligari & d.j.n. hind, eds.)**. Royal Botanic Gardens 61-80, 1996.

LEITE P.F. **Contribuição ao conhecimento fitoecológico do sul do Brasil**. Ciência & Ambiente 24: 51-73, 2002.

LUCIO K.C.F. **Estudos genéticos em populações da espécie *Hypochaeris chillensis* (Asteraceae) utilizando marcadores microssatélites**. 101p. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina. Londrina – PR, 2011.

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

MADDISON D.R.; MADDISON W.P. **Chromaseq: a Mesquite module for analyzing sequence chromatograms. Version 1.0.** 2011a <http://mesquiteproject.org/packages/chromaseq>.

MADDISON W.P.; MADDISON D.R. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75.** 2011b <http://mesquiteproject.org>.

MADDISON D. R.; WHEELER T.J.; MADDISON W.P.; **Align: a Mesquite package for aligning sequence data. Version 1.11.** 2007 <http://mesquiteproject.org>.

MATZENBACHER N.I. **Levantamento florístico preliminar das Compostas da fazenda São Maximiano – Guaíba – RS – Brasil**. Comunicações do museu de Ciências da PUCRS, Ser Bot 37: 115-127, 1985.

MATZENBACHER N.I. **O complexo “Senecionoide” (Asteraceae—Senecioneae) no Rio Grande do Sul—Brasil.** Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, 1998.

MILLER M. **TFPGA (Tools for population genetic analyses). Version 1.3: a windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data,** 1997.

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

MOREIRA R.F.C. **Estrutura genética de populações de *Crinipellis erniciosa* e *Moniliophthora roreri* utilizando marcadores RAPD e SSR.** Tese (Doutorado, Agronomia), Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 117, 2006.

MOYSÉS C.B. **Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes) São Paulo.** Tese de Doutorado em Ciências Biológicas. Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 2005.

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

MÜLLER K. **SeqState—primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets.** *Applied Bioinformatics* 4: 65-69, 2005.

NEI M. **Analysis of gene diversity in subdivided populations.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 12: 3321-3323, 1973.

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

NYLANDER J. A. A.; RONQUIST F.; HUELSENBECK J. P.; NIEVES-ALDREY J. L.; **Bayesian phylogenetic analysis of combined data.** *Systematic Biology* 53: 47-67, 2004.

OBERPRIELER C. VOGT R. ***Hypochaeris arachnoidea* Poir., a hitherto neglected species in NW Africa.** *Willdenowia* 32: 231–236, 2002.

OLIVEIRA E.J.; PÁDUA J.G.; ZUCCHI M.I.; VENCOVSKY R.; VIEIRA M.L.C. **Origin evolution and genome distribution of microsatellites.** *Genetic and Molecular Biology* 29(2): 294-307, 2006.

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

ORTIZ M.A.; TREMETSBERGER K.; TERRAB A.; STUESSY T.F.; GARCÍA-CASTAÑO J.L.; URTUBEY E.; BAEZA C.M.; RUAS C.F.; GIBBS P.E.; TALAVERA S. **Phylogeography of the invasive weed *Hypochaeris radicata* (Asteraceae): from Moroccan origin to worldwide introduced populations.** *Molecular Ecology* 17: 3664–3667, 2008.

PIRY S. LUIKART G. CORNUET J. **A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data.** *J. Hered.* 90: 502-503, 1999.

RAMBAUT A.; DRUMMOND A.J. **Tracer.** University of Oxford, Oxford, 2004.

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

RECK M.; BENÍCIO L.; RUAS E.A.; RODRIGUES L.A.; RUAS P.M.; ORTIZ M.A.; TALAVERA S.; URTUBEY E.; STUESSY T.; WEISS-SCHNEEWEISS H.; ET AL. **Karyotype and AFLP data reveal the phylogenetic position of the Brazilian endemic *Hypochaeris catharinensis* (Asteraceae).** *Plant Systematic Evolution* 296: 231–243, 2011.

RECK M. **Estudos moleculares em *Hypochaeris catharinensis* Cabrera (Asteraceae) utilizando marcadores AFLP.** 77p. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina- Londrina-PR, 2010.

RIDLEY M. **Evolução.** Artmed, Porto Alegre 3: 752, 2006.

RODRIGUES L.A. **Estrutura Genética de Populações de *Hypochaeris lutea* (Asteraceae).** Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Londrina- Londrina-PR, 2010.

RUAS C.F.; RUAS P.M.; METZENBACHER N.I.; ROSS G.; BERNINI C.; VANZELA A.L.L. (1995) **cytogenetic studies of some *Hypochaeris* species (compositae) from Brasil.** *American Journal of Botany* 82: 369–375, 1995.

RUAS C.F.; VANZELA A.L.L.; SANTOS M.O.; FREGONEZI J.N.; RUAS P.M.; MATZENBACHER N.; AGUIAR-PERECIN M.L.R. **Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (Asteraceae) from Brazil.** *Genetic Molecular Biology* 28: 129-13, 2005.

RUAS C.F.; WEISS-SCHNEEWEISS H.; STUESSY T.F.; SAMUEL M.R.; PEDROSA-HARAND A.; TREMETSBERGER K.; RUAS P.M.; SCHLÜTER P.M.; ORTIZ H.M.A.; KÖNIG C.; MATZENBACHER N.I. **Characterization, genomic organization and chromosome distribution of Ty1-copia retrotransposons in species of *Hypochaeris* (Asteraceae).** *Gene* 412(1-2): 39-49, 2008.

SAINUDIIN R.; DURRETT R.; AQUADRO C.F.; NIELSEN R.; **Microsatellite Mutation Models: Insights From an Comparison of Humans and Chimpanzees.** *Genetics* 168: 383-395, 2004.

SAITOU N.; NEI M. **The Neighbor-Joining Method - a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees.** *Molecular Biology Evolution* 4: 406-425, 1987.

SAMUEL R.; STUESSY T.F.; TREMETSBERGER K.; BAEZA C.M.; SILJAK-YAKOVLEV S. **Phylogenetic relationships among species of *Hypochaeris* (Asteraceae, lactuceae) based on its, plastid trnI intron, trnI-f spacer and matK sequences.** American Journal of Botany 90: 496–507, 2003.

SCHLOTTERER C.; TAUTZ D. **Slippage synthesis of simple sequence DNA.** Nucleic Acids Research, Eynsham 20: 211-215, 1992.

SCHLUTER P.M.; HARRIS S.A. **Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data.** Molecular Ecology Notes 6: 569-572, 2006.

SCHUELKE M. **An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments.** Nature Biotechnology 18: 233–234, 2000.

SEBBENN A.M. **Distribuição da variação genética de populações de jequitibá-rosa [*cariniana legalis* (mart.) o. ktze] por caracteres quantitativos e isoenzimas.** Tese. Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, 2011.

SHARMA J.; GEORGE S.; PANDEY M.; NORCINI J.; PEREZ H. **Genetic differentiation in natural populations of a Keystone Bunchgrass (*Aristida stricta*) across its native range.** Genetica 139(2): 261-71, 2011.

SIMMONS M.P.; OCHOTERENA H. **Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses.** Systematic Biology 49: 369-381, 2000.

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

SLATKIN M. **Gene flow and population structure.** En: **Ecological Genetics** (ed Real LA). Princeton University Press 3-18, 1994.

SOKAL R. R.; MICHENER C.D. **A statistical method for evaluation systematic relationships.** University Kansas Science Bulletin 38: 1409-1438, 1958.

SOLÉ-CAVA, A.M. **Biodiversidade molecular e genética da conservação.** In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução.** Ribeirão Preto: Holos 202, 2001.

SOONS M.B.; HEIL G.W.; NATHAN R.; KATUL G.G.; **Determinants of long-distance seed dispersal by wind in grasslands.** Ecology 85: 3056–3068, 2004.

STEBBINS G.L. **Chromosomal evolution in higher plants.** Edward Arnold, London, UK, 1971.

STÖVER B.C.; MÜLLER K.F. **TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses.** BMC Bioinformatics 11: 7, 2010.

STUESSY T.; TREMETSBERGER K.; SAMUEL R.; JANKOWICZ J.; GUO Y-P.; MUELLNER A.N.; BAEZA C.M. **Phylogenetic relationships among South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae) based on AFLP data.** In: Schaal BA, Chiang TY, Chou CH (eds) **Plant evolutionary genetics and the biology of weeds. Chi-Chi: Endemic Species.** Research Institute 23–39, 2004.

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

SUN Y. D. Z.; SKINNER G. H.; LIANG S.; HULBERT H. **Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA.** Theoretical and Applied Genetics 89: 26–32, 1994.

SUZAKI V. **Filogenia e biogeografia do complexo *Croton pallidulus* (Euphorbiaceae), inferidas por sequências de DNA e marcadores AFLP.** Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas na área de botânica. Universidade de São Paulo – São Paulo – SP, 2011.

SWOFFORD D.L. **PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods).** Beta, Vers. 4.0b 10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2003.

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

TELLES M.P.C.; VALVA F.D.; BANDEIRA L.F.; COELHO A.S.G. **Caracterização genética de populações naturais de aratincunzeiro (*annona crassiflora* mart. – annonaceae) no estado de Goiás.** Revista brasileira de botânica 26(1): 123-129, 2003.

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

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

TREMETSBERGER K.; STUESSY T.F.; KADLEC G.; URTUBEY E.; BAEZA C.M.; BECK S.G.; VALDEBENITO H.Á.; RUAS C.F.; MATZENBACHER N.I. **Aflp phylogeny of south american species of *Hypochaeris* (Asteraceae, lactuceae).** Systematic botany. 31: 610–626, 2006.

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

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

TREMETSBERGER K.; WEISS-SCHNEEWEISS H.; STUESSY T.; SAMUEL R.; KADLEC G.; ORTIZ M.A.; TALAVERA S. **Nuclear ribosomal dna and karyotypes**

indicate a nw african origin of south american *Hypochaeris* (Asteraceae, cichorieae). *Molecular phylogenetics and evolution* 36: 102-116, 2005.

TREMETSBERGER K.; URTUBEY E.; TERRAB A.; BAEZA C.M.; ORTIZ M.A.; TALAVERA M.; KÖNIG C.; TEMSCH E.M.; KOHL G.; TALAVERA S.; STUESSY T.F. **Pleistocene refugia and polytopic replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and Subantarctic plant *Hypochaeris incana* (Asteraceae, Cichorieae).** *Molecular Ecology* 18: 3668– 3682, 2009.

VAN OOSTERHOUT C.; HUTCHINSON W.F.; WILLS D.P.M.; SHIPLEY P. **MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data.** *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538, 2004.

VOS P.; HOGERS R.; BLEEKER M.; REIJANS M.; VAN DE LEE T.; HORNES M.; FRIJTERS A.; POT J.; PELEMAN J.; KUIPER M.; ZABEAU M. **AFLP: a new technique for dna fingerprinting.** *Nucleic Acids Research* 23: 407-4414, 1995.

WANG J. **Coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients.** *Molecular Ecology Resources* 11(1): 141–145, 2010.

WEISS-SCHNEEWEISS H.; STUESSY T.F.; SILJAK-YAKOVLEV S.; BAEZA C.M.; PARKER J. **Karyotype evolution in south american species of hypochaeris (Asteraceae, Lactuceae).** *Plant Systematic and Evolution*. 241: 171–184, 2003.

WEISS-SCHNEEWEISS H.; STUESSY T.F.; TREMETSBERGER K. URTUBEY E. VALDEBENITO H.A.; BECK S.G.; BAEZA C.M. **Chromosome numbers and karyotypes of south american species and populations of *Hypochaeris* (Asteraceae).** *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 49-60, 2007.

WEISS-SCHNEEWEISS H.; TREMETSBERGER K.; SCHNEEWEISS G.M.; PARKER J.S.; STUESSY T.F. **Karyotype diversifications and evolution in diploid and polyploid South American *Hypochaeris* (Asteraceae) inferred from rdna localization and genetic fingerprint data.** *Annals of Botany*. 101: 909-918, 2008.

WILSON G.A.; RANNALA B. **Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes.** *Genetics* 163: 1177-1191, 2003.

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

ZÁVESKÁ DRÁBKOVÁ L.; KIRSCHNER J.; ŠTĚPÁNEK J.; ZÁVESKÝ L.; VLČEK Č. **Analysis of nrDNA polymorphism in closely related diploid sexual, tetraploid sexual and polyploid agamospermous species.** *Plant Systematics and Evolution* 278: 67–85, 2009.