



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAIKEL RECK

**“ESTUDOS MOLECULARES EM *Hypochoeris catharinensis*
Cabreria (*ASTERACEAE*) UTILIZANDO MARCADORES
AFLP”**

Londrina
2010

MAIKEL RECK

**“ESTUDOS MOLECULARES EM *Hypochoeris catharinensis*
Cabreria (*ASTERACEAE*) UTILIZANDO MARCADORES
AFLP”**

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

Orientadora: Profa. Dra. Claudete de Fátima Ruas

Londrina
2010

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R298e Reck, Maikel.

Estudos moleculares em *Hipochaeris catharinensis* Cabrera (*Asteraceae*)
utilizando marcadores AFLP/ Maikel Reck – Londrina, 2010.
78 f. : il.

Orientador: Claudete de Fátima Ruas.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação
em Genética e Biologia Molecular, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Genética de populações – Teses. 2. *Hipochaeris catharinensis* – Teses. 3.
Plantas – Genética molecular – Teses. 4. Plantas - Filogenia – Teses. 5. Polimorfismo
– (Genética) – Teses. I. Ruas Claudete de Fátima II. Universidade Estadual de
Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomico do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 641:579

MAIKEL RECK

**“ESTUDOS MOLECULARES EM *Hypochoeris catharinensis* Cabrera
(*ASTERACEAE*) UTILIZANDO MARCADORES AFLP”**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Danielle Cristina Gregório da Silva
UENP – Bandeirantes – PR

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas
UEL – Londrina – PR

Londrina, 25 de fevereiro de 2010.

Dedico esse trabalho a todos que de uma forma ou de outra
fizeram parte desse caminho

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre dar forças e serenidade para enfrentar cada obstáculo.

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

À Universidade Estadual de Londrina, por fornecer um ensino e estrutura de qualidade contribuindo substancialmente para uma boa formação.

À professora Claudete de Fátima Ruas e ao professor Paulo Maurício Ruas, pela receptividade desde o primeiro momento e pela orientação e ensinamentos que me ofereceram durante o mestrado.

À Suely, por toda sua atenção, prestatividade e paciência sempre nos auxiliando com muita competência.

Ao meu pai e a Marisa, por sempre terem me dado condições e apoio para continuar estudando. Ao meu pai principalmente por ser sempre um grande exemplo.

À minha mãe e minha irmã, pelo amor, carinho e atenção que sempre renovaram as minhas forças permitindo aguentar a distância de casa.

Ao meu namorado Gustavo, por tudo, principalmente pela ajuda e apoio nas inúmeras vezes que precisei.

Aos meus colegas de laboratório André, Bruno, Carina, Eduardo, Juliana, Laís, Leonardo, Luana e Thiago, pela amizade e pelos ótimos momentos vividos dentro e fora do laboratório.

Em especial a Luana, não só pela parceria no laboratório e nos estudos para o mestrado, mas também pela grande amizade e parceria na vida, que sem dúvida tornou esse estrada muito mais divertida; “Valeu a pena.. valeu a pena.. sou pescador de ilusões..”

Ao Lucas, pela grande e fundamental ajuda para a realização desse trabalho mesmo com roxos e cotoveladas na frente do computador para analisar géis.

Ao Eduardo, por ter com paciência me ensinado a fazer as análises estatísticas e por ter, com a mesma paciência, me socorrido quando elas cismavam em não rodar.

Aos colegas de mestrado, que foram grandes parceiros e ajudaram a tornar tudo mais divertido.

Aos professores, pelos ensinamentos, dedicação e atenção.

Muito obrigada!

RECK, Maikel “Estudos em *Hypochaeris catharinensis* (Asteraceae) utilizando marcadores AFLP” 78 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

Hypochaeris catharinensis, pertencente ao gênero *Hypochaeris* (Asteraceae), é uma espécie endêmica do sul do Brasil. 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). Para definir a posição filogenética de *H. catharinensis* dentro do grupo sul-americano de *Hypochaeris*, foram aplicados onze primers seletivos de AFLP em oito diferentes espécies sulamericanas de *Hypochaeris* (*H. megapotamica*, *H. pampasica*, *H. neopinatifida*, *H. argentina*, *H. apargioides*, *H. lutea*, *H. petiolaris* e *H. variegata*) além da espécie testada *H. catharinensis* e de *H. angustifolia*, considerada como o possível ancestral do grupo sul-americano de espécies, que foi usada como outgroup. Os resultados AFLP mostraram a formação de três dos grupos filogenéticos já definidos previamente. *Hypochaeris catharinensis* associou-se fortemente (bootstrap de 90%) com *H. lutea*, dando origem a um novo grupo filogenético entre as espécies sul-americanas de *Hypochaeris*. Este grupo encontra suporte nas características cariotípicas, compartilhadas por *H. catharinensis* e *H. lutea*. Assim, foi proposto neste trabalho a formação de um novo grupo filogenético (grupo Lutea) composto por essas duas espécies. Para o estudo de populações, seis combinações de primers de AFLP foram aplicadas em 11 populações de *H. catharinensis* coletadas no sul do Brasil renderam 183 fragmentos sendo 90,16% polimórficos. As análises obtidas para os dados de AFLP mostraram que a porcentagem de variabilidade genética é maior dentro (83,64%) do que entre (16,36%) as populações de *H. catharinensis*. A análise da coordenada principal mostra que a maioria das 11 populações estudadas apresentam indivíduos misturados entre as populações, revelando a ausência de um claro padrão de isolamento. Fatores como tempo de divergência recente juntamente com as características endêmicas e morfológicas, que favorecem a dispersão a longa distância, podem ter contribuído para o pouco grau de diferenciação encontrado.

Palavras-chave: Diversidade gênica. Estrutura de populações. Filogenia. Grupo filogenético. *Hypochaeris*.

RECK, Maikel "Studies in *Hypochoeris catharinensis* (Asteraceae) using AFLP " 78 f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Hypochoeris catharinensis (Asteraceae) is endemic to south Brazil. In this work we used AFLP molecular marks (*Amplified Fragment Length polymorphism*) aiming to determine the genetic structure of *H. catharinensis* and to define its phylogenetic position within the South American group of the genus *Hypochoeris*. To define the phylogenetic position of *H. catharinensis*, eleven AFLP selective primer combinations were used in eight different South American *Hypochoeris* plus *H. catharinensis* and *H. angustifolia*, used as outgroup. The results showed three main phylogenetic groups, as defined in previous studies. *Hypochoeris catharinensis* formed a tight association (90% bootstrap) with *H. lutea*, giving origin to a new phylogenetic group, named *Lutea* group. This group is also supported by the similarities observed on the karyotypes of *H. catharinensis* and *H. lutea*. Together these data provide valuable information that may help to elucidate the processes of adaptive radiation of the genus *Hypochoeris* into the South American continent. Six AFLP primer combinations, applied in 11 populations of *H. catharinensis* collected from the Santa Catarina and Rio Grande do Sul states, rendered 183 fragments of which 165 (90,16%) were polymorphic. AMOVA, applied to the AFLP data revealed that the genetic variability was higher within (83,64%) than among (16,36%) populations. Principal Coordinate Analysis showed that most of the 11 populations studied have individuals that are mixed in other populations, revealing the absence of a clear pattern in the genetic structure. The recent divergence of the South American *Hypochoeris*, together with the morphological and ecological characteristics that favour the seed dispersion of *H. catharinensis*, may have contributed to the low level of divergence observed among populations of this species.

Keywords: Genetic diversity. *Hypochoeris*. Phylogenetic group. Phylogeny. Population structure.

LISTA DE TABELAS

Artigo A

- Table 1** – Number of individuals (N) and collection sites of the South American species of *Hypochoeris* sampled, plus *H. angustifolia* (outgroup) analysed by AFLP markers..... 31
- Table 2** – Selective primers combinations (11) used for AFLP analysis of South American species of *Hypochoeris* and the levels of information obtained from each combination 32

Artigo B

- Tabela 1** – Informações sobre os pontos de coleta de *H. catharinensis* na região sul do Brasil, bem como número de indivíduos por população (N), número de coleta e de coleção e respectivos coletores (Col.)..... 50
- Tabela 2** – Combinações de primers seletivos de AFLP, número de fragmentos amplificados e porcentagem de polimorfismo por primer obtido em *H. catharinensis* 53
- Tabela 3** – Porcentagem de loci polimórficos (Pp) e diversidade gênica (HS) de Nei (1973) em 273 indivíduos de 11 populações de *H. catharinensis* na região Sul do Brasil, obtidos com base em marcadores AFLP..... 55
- Tabela 4** – Distância genética de Nei (1978) abaixo da diagonal e distância geográfica (Km) acima da diagonal em 11 populações de *H. catharinensis* obtidos com base em marcadores AFLP..... 56
- Tabela 5** – Análise de variância para dados moleculares (AMOVA) em 11 populações de *H. catharinensis* 58
- Tabela 6** – Valores de distância genética do FST par-a-par em 11 populações de *H. catharinensis* obtidos com base em marcadores AFLP 61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Local de ocorrência de *H. catharinensis* (A); capítulo solitário (B); flores liguladas com lígulas amarelas que ultrapassam pouco ou não as brácteas (C); Folhas em forma de rosetas (D). Fonte: Fiorin, FG 2007 17

Artigo A

- Figure 1** – Coefficient of variation for the number of amplified markers in the South American species of *Hypochaeris* and in the Marocco Species that used as outgroup *H. angustifolia* 33
- Figure 2** – Consensus tree including groups compatible with 10,000 bootstrap replicates of South American species of *Hypochaeris* and *H. angustifolia* as outgroup based on unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) analysis of 401 AFLP fragments. Numbers on branches are bootstrap proportions (BS). South American species of *Hypochaeris* formed a single group with 100% BS. Number in parentheses after species names indicates the number of individuals from each species analyzed and clustered by TreeExplorer in MEGA4..... 34
- Figure 3** – Consensus tree including groups compatible with 10,000 bootstrap replicates of South American species of *Hypochaeris* and *H. angustifolia* as outgroup based on unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) analysis of 401 AFLP fragments. Numbers on branches are bootstrap proportions (BS). Numbers after branches ends represent individuals from each species according to their respective population collection number. *Pampasica* group = *H. pampasica*, *H. megapotamica* and *H. neopinnatifida*; *Microcephala* group = *H. argentina*; New group proposed *Lutea* group = *H. lutea* and *H. catharinensis*; *Apargioides* group = *H. apargioides* 37

Artigo B

- Figura 1** – Florestas abertas com *Araucaria angustifolia*, local característico de ocorrência da espécie *H. catharinensis* (A); Flor ligulada com brácteas que ultrapassam pouco ou não ultrapassam as lígulas (B); Folhas rosuladas em forma de rosetas (C) 48
- Figura 2** – Mapa representativo das 11 áreas de coleta de *H. catharinensis* situadas nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil 51
- Figura 3** – Coeficiente de variação por número de marcadores moleculares amplificados em 11 populações de *H. catharinensis*..... 54
- Figura 4** – Análise da coordenada principal de cinco populações de *H. catharinensis* da região sul do Brasil. RQ -Rancho Queimado, SC; SJ -São Joaquim, SC; SA -São José dos Ausentes, RS; MN -Pico do Monte Negro, RS; BS -Bom Jardim da Serra, SC; PA -Palmas, PR; MC – Direção a Monte Alegre dos Campos, SC; IR -Irineópolis, SC; BR -Bom Retiro, SC; BJ – Direção a Bom Jesus, RS; CB – Cambará do Sul, RS..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS DE SIGLAS

AFLPA	Amplified fragment length polymorphism
BS	Bootstrap
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
CV	Coefficient of variation
FUEL	Herbarium of the Universidade Estadual de Londrina.
ITS	Nuclear Internal Transcribed Spacer
NTSYS	Numerical Taxonomic System
PAUP	Phylogenetic Analysis Using Parsimony
UPGMA	Unweighted pair-group method with arithmetic averages
Mya	Million years ago

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	GÊNERO HYPOCHAERIS	15
2.2	HYPOCHAERIS CATHARINENSIS	17
2.3	ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES	18
2.4	MARCADORES MOLECULARES E SUAS APLICAÇÕES	20
2.5	MARCADORES MOLECULARES AFLP EM ESTUDOS DO GÊNERO HYPOCHAERIS	22
3	JUSTIFICATIVA	24
4	OBJETIVOS	25
4.1	OBJETIVO GERAL	25
4.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	25
5	ARTIGOS	26
5.1	AFLPs REVEAL THE PHYLOGENETIC POSITION OF THE ENDEMIC HYPOCHAERIS CATHARINENSIS WITHIN THE SOUTH AMERICAN GROUP OF SPECIES	26
	Abstract	27
	Acknowledgments	27
	Introduction	28
	Materials and Methods	30
	Results and Discussion	33
	References	40
5.2	ESTRUTURA DE POPULAÇÕES EM HYPOCHAERIS CATHARINENSIS (ASTERACEAE) ESPÉCIE ENDÊMICA DO SUL DO BRASIL COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES AFLP	45
	Resumo	45
	Abstract	45
	Introdução	46
	Material e Métodos	49

Resultados e Discussão.....	53
Agradecimentos.....	62
Referências	64
CONCLUSÕES GERAIS	68
REFERÊNCIAS TOTAIS	69

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Hypochoeris*, pertencente à família *Asteraceae*, apresenta uma distribuição disjunta com aproximadamente 60 espécies, das quais, cerca de 15 encontram-se distribuídas na Europa, na região Mediterrânea e na Ásia e mais de 50 são nativas da América do Sul (Weiss et al. 2003, Tremetsberger et al. 2005). Conforme apontam diversos estudos, sugere-se que a região Mediterrânea é o centro primário de dispersão enquanto a América do Sul corresponde ao centro de diversificação do gênero *Hypochoeris* (Stebbins 1971; Samuel et al. 2003).

Estudos com diferentes abordagens sobre *Hypochoeris* demonstram que o gênero teve evolução recente e rápida na América do Sul (Tremetsberger et al. 2006). Esta forma de radiação intercontinental representa um importante fenômeno evolucionário (Tremetsberger et al. 2005). O conhecimento dos mecanismos de radiação em conjunto com as características cariotípicas podem fornecer informações importantes sobre os modos de especiação e os padrões de biogeografia, permitindo inferir sobre a importância dos rearranjos cromossômicos durante a especiação do grupo sul-americano (Stebbins 1971; Cerbah et al. 1995, 1998a, 1998b; Ruas et al. 1995, 2005; Weiss et al. 2003).

No Brasil, o maior número de espécies do gênero *Hypochoeris* ocorre na região sul, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, entre as quais, encontra-se *H. catharinensis* Cabr, uma espécie endêmica nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Cabrera 1963). Informações relacionadas a esta espécie estão restritas a dados botânicos e ecológicos (Azevêdo-Gonçalvez e Matzenbacher 2007). Apenas recentemente, estudos sobre estrutura cariotípica foram conhecidos (Fiorin 2008). Entretanto, não existe ainda nenhuma informação sobre a estrutura de populações, tampouco sobre as relações filogenéticas de *H. catharinensis* com as demais espécies do grupo sul-americano de *Hypochoeris*.

Marcadores moleculares têm sido empregados para inúmeros estudos em espécies de *Hypochoeris*, dentre os quais os marcadores AFLP tem sido considerados bastante eficientes para responder questões sobre a estrutura genética de populações e filogenia no gênero (Stuessy et al. 2003, 2004; Tremetsberger et al. 2004; 2006, Muellner et al. 2005). Visando a contribuir com os estudos do gênero *Hypochoeris*, neste trabalho utilizamos a técnica de AFLP para conhecer a estrutura genética de populações de *H. catharinensis*, e para definir sua posição filogenética entre as espécies do grupo sul-americano.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GÊNERO HYPOCHAERIS

O grupo das *Asteraceae* constitui a maior família entre as Angiospermas, com cerca de 1.535 gêneros e 23.000 espécies agrupadas em três subfamílias e 17 tribos (Bremer 1994; Judd et al. 1999). Membros das *Asteraceae* podem ser encontrados nos mais diferentes ecossistemas e apresentam diversidade maior em campos ou ambientes savânicos comparada a ambientes florestais (Leite 2002). As espécies desta família apresentam flores assentadas sobre um receptáculo comum, cercado por brácteas, formando inflorescências denominadas capítulos (Barroso 1991). A maioria das espécies de *Asteraceae* é polinizada por insetos (notadamente abelhas e borboletas), mas há casos de polinização por beija-flores e por vento (Lane 1996).

Dentro das *Asteraceae*, o gênero *Hypochaeris* (tribo Lactuceae) apresenta espécies cosmopolitas com maior ocorrência nas regiões subtropicais e temperadas (Barroso 1991). A tribo se caracteriza por ser a única na família *Asteraceae* a apresentar plantas com látex (Bremer 1994). Esta característica associada à presença de lígulas pentadentadas no ápice, pápus plumosos e páleas nos receptáculos (Cabrera 1976) permite diferenciar as espécies do gênero *Hypochaeris* no campo.

O gênero *Hypochaeris* apresenta uma distribuição disjunta característica, com cerca de 60 espécies, das quais 15 encontram-se distribuídas na Europa, na região Mediterrânea e na Ásia enquanto mais de 50 são encontradas na América do Sul (Bortiri 1999; DeFillips 1976; Stebbins 1971; Samuel et al. 2003).

Hypochaeris apresenta dois centros de diversificação: a região Mediterrânea e a América do Sul. Com base em número e morfologia de cromossomos, Stebbins (1971) propõe que o gênero, mais provavelmente, teve origem na região Mediterrânea e que a América do Sul é o centro secundário de diversificação (Cerbah et al. 1998b). Definir a origem do gênero *Hypochaeris* na América do sul é ainda problemático. Todas as espécies sul-americanas de *Hypochaeris* apresentam cariótipos bimodais e assimétricos (Cerbah et al. 1995, 1998a, 1998b; Ruas et al. 1995). Recentemente, foram identificadas na espécie *H. angustifolia*, endêmica do Marocco, características cromossômicas tais como número básico e assimetria cariotípica similares àquelas das espécies sul-americanas, sugerindo que

H. angustifolia é co-irmã do grupo de *Hypochoeris* da América do Sul. Sugere-se assim, que as espécies sul-americanas tiveram origem possivelmente, após dispersão à longa distância, a partir de uma única introdução de um ancestral hipotético do nordeste da África. Estes dados encontram suporte em estudos utilizando marcadores moleculares de AFLP onde observa-se que *H. angustifolia* ocupa uma posição filogenética intermediária entre as espécies do mediterrâneo e as da América do Sul (Tremetsberger et al. 2005; Tremetsberger et al. 2006).

Inúmeros estudos sugerem que o gênero *Hypochoeris* tem passado por processos de especiação de forma rápida e recente na América do Sul tendo surgido há cerca de 3,5 milhões de anos atrás durante o Plioceno ou Pleistoceno e evoluído rapidamente, entre 0,25 a um milhão de anos no Pleistoceno (Samuel et al. 2003; Tremetsberger et al. 2005). Após sua chegada à América do Sul, o gênero colonizou boa parte do território, exceto áreas extremamente áridas, florestas tropicais e costas de desertos, o que reflete um padrão característico de radiação adaptativa (Cabrera e Willink 1980). Estas radiações rápidas e entre continentes, tais como as observadas em *Hypochoeris* na América do Sul, representam um importante fenômeno evolutivo (Tremetsberger et al. 2005). Tais fenômenos são mais comuns em plantas que evoluem de grupos em ilhas ou em cenários como se fossem ilhas, sendo pouco exemplificada em espécies de continentes. Esta forma de radiação combinada com as características cariotípicas (cariótipos bimodais, pequeno número de cromossomos de tamanhos relativamente grandes) pode fornecer informações importantes sobre os modos de especiação e os padrões de biogeografia permitindo inferir a importância dos rearranjos cromossômicos durante a especiação do grupo sul-americano (Stebbins, 1971; Cerbah et al. 1995, 1998a, 1998b; Ruas et al. 1995, 2005; Weiss et al. 2003, Weiss-Schneeweiss et al. 2003, 2008).

No Brasil são conhecidas cerca de oito a 10 espécies de *Hypochoeris*, sendo que a maioria destas ocorre na região sul, particularmente nos estados do Rio Grande do Sul e em Santa Catarina. A única espécie sul-americana cosmopolita conhecida é *H. chillensis* que apresenta uma área ampla de distribuição, podendo ser encontrada em regiões de clima temperado e subtropical desde o sudeste do Brasil até o extremo sul bem como em outros países como Argentina, Uruguai, Paraguai, Peru, Bolívia, Equador e Colômbia (Bortiri 1999; Cabrera 1937, 1974, 1976; Cabrera et al. 2000; Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007).

2.2 HYPOCHAERIS CATHARINENSIS

Hypochaeris catharinensis é uma espécie herbácea perene que apresenta como características raiz fasciculada e rizoma horizontal, resultante de seu desenvolvimento em solos secos e rasos. O rizoma horizontal é uma característica taxonômica importante, pois permite diferenciar este táxon dos demais no gênero. Esta espécie tem como habitat regiões altas (800 a 1400m) e frias, incluindo áreas abertas e pedregosas de campo, em associação com vegetação arbustiva ou ervas, com predominância de gramíneas. Por ocorrer associada a esse tipo de vegetação, *H. catharinensis* desenvolveu folhas rosuladas em forma de rosetas que aumentam a área para absorção de luz, favorecendo a fotossíntese. *Hypochaeris catharinensis* caracteriza-se também por apresentar capítulos solitários, flores liguladas com lígulas amarelas que ultrapassam pouco ou não as brácteas. Esta espécie pode ser encontrada também em florestas abertas com *Araucaria angustifolia*, em barrancos de beira de estrada e em ambientes úmidos (Figura 1) (Azevêdo-Gonçalvez e Matzenbacher 2007).



Figura 1 – Local de ocorrência de *H. catharinensis* (A); capítulo solitário (B); flores liguladas com lígulas amarelas que ultrapassam pouco ou não as brácteas (C); Folhas em forma de rosetas (D).

Fonte: Fiorin, F. G. (2007).

Hypochaeris catharinensis é uma espécie endêmica do sul do Brasil (Cabrera 1963), mais especificamente, sua área de distribuição inclui duas regiões

fisiográficas na Encosta do Nordeste e Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul, sendo de distribuição mais ampla no estado de Santa Catarina, com poucos relatos de ocorrência no estado do Paraná (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007).

Hypochoeris catharinensis começou a ser estudada apenas recentemente e, por isso, informações disponíveis sobre esta espécie se restringem a dados citogenéticos (Fiorin 2008). Devido à falta de estudos ao nível molecular, dados sobre estruturação populacional são desconhecidos, tampouco ela possui posição filogenética definida entre os membros do gênero na América do Sul.

2.3 ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

População é um grupo de indivíduos da mesma espécie que ocupa determinada área geográfica em determinado período e tempo. Numa visão geneticista, população mendeliana é um grupo de indivíduos que se cruzam, de modo que a similaridade intrapopulacional é mantida por relações de intercrossamentos e descendência (Ridley 2006; Cavalli e Winge 2003). A variação genética é um fator fundamental para a evolução das espécies, e conhecer uma determinada estrutura de população de plantas também oferece uma perspectiva histórica das mudanças evolutivas que caracterizam uma espécie e permite aos investigadores prever com mais precisão como essas populações vão reagir a futuros eventos de origem natural e artificial (Wallace 2002).

Em populações naturais, a distribuição da variabilidade genética é influenciada pelo modo de reprodução, sistema de acasalamento, tamanho da população, distribuição geográfica e fluxo gênico, bem como por mudanças ambientais naturais ou causadas pelo homem que venham a eliminar parte dos indivíduos da população (Hamrick 1982).

A extensão da área de distribuição geográfica de uma espécie tem grande influência sobre o nível de variabilidade da mesma. Espécies endêmicas com razoável homogeneidade ambiental podem apresentar menores níveis de variação em suas populações (Cavalli e Winge 2003).

Um dos parâmetros importantes para conhecer a estrutura de uma população é o fluxo gênico (migração e dispersão), que se refere a todos os mecanismos que geram movimento de genes de uma população para outra (Slatkin 1985). A dispersão de pólen e

sementes entre as populações reduz a diferenciação genética entre elas, sendo um dos mecanismos responsáveis pela introdução de novas variações genéticas na população receptora (Wright 1931). Se a ocorrência de fluxo é alta, as populações evoluem de forma conjunta, porém se esta for baixa, as populações podem divergir, o que pode contribuir para um futuro isolamento por distância (Slatkin 1994). Entre os modelos de fluxo gênico verificados em populações podemos citar: o modelo continente-ilha, em que o fluxo de alelos ocorre em uma única direção, partindo de uma população grande para uma população menor e isolada; o modelo de ilhas, onde o movimento de alelos se dá ao acaso, em qualquer direção, entre um grupo de pequenas populações; o modelo *stepping-stone*, onde o fluxo gênico ocorre apenas entre populações vizinhas; e o modelo de isolamento por distância, o qual considera uma população contínua onde o fluxo de alelos ocorre entre vizinhos próximos (Futuyma 1992).

Outro fator que afeta a estrutura genética de uma população e apresenta efeitos contrários ao fluxo gênico é a deriva genética, que está relacionada com as mudanças nas frequências alélicas devido à amostragem aleatória de gametas (Wright 1969), o que pode levar à perda de diversidade genética. A taxa de mudança das frequências gênicas por deriva genética depende do tamanho da população. Assim, quanto menor a população, maior a perda da diversidade genética devido aos efeitos da deriva. Portanto, efeitos de amostragem aleatória são mais significativos em populações pequenas (Ridley 2006).

O modo de reprodução (sexual ou assexual) e o sistema de cruzamento (auto ou alogamia) têm um efeito marcante na composição genética de uma população, pois é a partir do modo de reprodução que se determina a formação ou não de gametas e a partir do sistema de cruzamento que são determinados os padrões pelos quais esses gametas são reunidos (Zanettini e Cavalli 2003).

A relação entre o sistema de acasalamento e deriva genética, principalmente no que diz respeito à depressão por endogamia, é uma importante questão a ser considerada na conservação de recursos genéticos, pois populações pequenas geralmente sofrem endogamia. Estimativas dos níveis de endogamia entre e dentro de populações auxiliam na determinação da estrutura genética de uma população. Segundo Pierce (2004), endogamia é caracterizada pela reprodução entre indivíduos aparentados que ocorre mais frequentemente que o esperado com base no acaso. Populações pequenas fragmentadas em áreas distintas, principalmente de plantas alógamas, estão propensas à endogamia resultante da subdivisão. A endogamia pode atuar desmascarando determinados alelos deletérios recessivos, diminuindo em um curto espaço de tempo o valor adaptativo da população, nas quais ocorre redução da heterozigosidade e pode resultar em perda da diversidade alélica (Avise 1994).

A variabilidade genética é a condição principal para a evolução. Sua amplitude e distribuição são de interesse fundamental para o conhecimento do potencial das espécies de plantas e de suas populações. Além de ser fator fundamental para mudanças evolucionárias e para a existência de capacidade adaptativa (Silvertown e Doust 1993). Diferentes medidas podem ser utilizadas para avaliar o grau de variabilidade genética em populações: P (porção média de loci polimórficos, sendo P_e dentro de espécies e P_p dentro de populações), A (número médio de alelos por loci) e H (proporção média de loci em heterozigose esperada por indivíduos). O número de alelos por locus consiste do número total de alelos detectados na população, dividido pelo número de loci polimórficos (Torggler et al. 1995).

Uma análise que permite estimar a proporção da variabilidade genética contida entre e dentro das populações (Lee et al. 2002; Gonzales e Hamrick 2005) é a estimativas da diversidade genética de Nei (1973, 1978). Esta permite quantificar as proporções de loci polimórficos dentro de espécies (P_e) e dentro de populações (P_p) e a diversidade geral de espécie (H_e) e de populações (H_p) (Hamrick 1994). A distribuição da variabilidade dentro e entre populações pode ser estimada pelas estatísticas F de Wright, que fornecem as médias dos índices da fixação alélica para o total de populações (F_{IT}), dentro da população (F_{IS}), e a divergência genética entre populações (F_{ST}) (Yeoh et al. 1996; Moraes et al. 1999).

2.4 MARCADORES MOLECULARES E SUAS APLICAÇÕES

Um marcador molecular pode ser definido como qualquer fenótipo molecular conhecido ou não, oriundo de um gene expresso ou de um determinado segmento específico de DNA que corresponde a uma região do genoma que pode ser expresso ou não. Eles apresentam características qualitativas com herança mendeliana simples cuja expressão não é influenciada pelo ambiente (Ferreira e Grattapaglia 1998).

A revolução causada pelo uso dos marcadores moleculares teve início em 1959 por Market e Moller, com o descobrimento e utilização de marcadores isoenzimáticos, ampliando vastamente o número de marcadores genéticos e possibilitando a aplicação desta técnica a praticamente todas as espécies de plantas (Ferreira e Grattapaglia 1998). A utilização de isoenzimas permitiu a detecção de polimorfismos entre plantas que não

mostravam diferenças morfológicas, possibilitando uma maior visualização da informação genética contida nas populações (Torggler et al. 1995).

Com avanços da Biologia Molecular e o descobrimento das enzimas de restrição, as pesquisas de conservação de espécies e de biologia populacional em animais e plantas puderam ter suas variações analisadas ao nível de DNA. A primeira técnica a fazer uso das enzimas de restrição foi denominada RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) e surgiu na década de 70 baseando-se no polimorfismo pelo tamanho de fragmento (Grodzicker et al. 1974; Ferreira e Grattapaglia 1998).

O desenvolvimento da tecnologia da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), na década de 80, por Mullis et al. (1986), permitiu a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA e causou uma revolução nas técnicas de biologia molecular. O aperfeiçoamento da técnica possibilitou o surgimento de uma série de marcadores moleculares que detectam polimorfismo ao nível de DNA.

Entre os marcadores moleculares disponíveis que tem como base a PCR podem ser citados os marcadores dominantes RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*) e os marcadores SSR (Simple Sequence Repeats), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), que são marcadores co-dominantes, logo permitem distinguir o fenótipo homozigoto do heterozigoto (Ferreira e Grattapaglia 1998).

As técnicas de PCR revelaram-se ferramentas poderosas com inúmeras aplicações, sendo utilizadas no monitoramento da variabilidade genética, identificação de indivíduos ou famílias divergentes, construção de mapas genéticos, identificação de loci relacionados a caracteres quantitativos e outras (Ribeiro et al. 1997), encontrando também grande aplicação em estudos evolutivos e taxonômicos. Hoje, ao se falar sistemas e classificação de plantas modernas, não se deixa de lado aspectos filogenéticos e o uso de caracteres moleculares (Takhtajan 1997; Judd et al. 1999).

A exploração das informações do genoma nuclear na análise filogenética de plantas teve início com a utilização do marcador nuclear ITS e da subunidade 18S do nrDNA (Martin e Dowd, 1991; Baldwin, 1992, 1993; Chaw et al., 1993; Savard et al., 1993; Suh et al., 1993). Atualmente, diversos trabalhos têm usado marcadores moleculares para inferir relações filogenéticas entre espécies e até mesmo gêneros e famílias. Em *Asteraceae*, marcadores moleculares têm sido usados para esse fim em estudos com o gênero *Lactuca* (Hill et al. 1996; Koopmann et al. 1998, 2001), *Hypochaeris* (Stuessy et al. 2003, 2004; Tremetsberger et al. 2005, 2006; Weiss-Schneeweis et al. 2008) e *Senecio* (Pelser et al. 2003)

Técnicas moleculares com base em marcadores de DNA têm sido empregadas frequentemente também em estudos de genética de populações, possibilitando o acesso aos eventos determinantes na estrutura de populações naturais. A quantificação do grau de estrutura permite estabelecer o nível de endogamia produzido pela deriva genética, pelo sistema reprodutivo e pelo fluxo gênico (Reis 1996). Marcadores moleculares também têm sido amplamente utilizados em estudos de populações na família *Asteraceae*, como nos gêneros *Senecio* (Comes e Abbott 2000; Muller-Schärer e Fischer 2001; Abbott et al. 2007), *Scalesia* (Nielsen 2004; Nielsen et al. 2003) e *Hypochoeris* (Tremetsberger et al. 2003b, 2003a, 2009; Muellner et al. 2005; Mráz et al. 2007; Ortiz et al. 2007; Terrab et al. 2009).

2.5 MARCADORES MOLECULARES AFLP EM ESTUDOS DO GÊNERO HYPOCHAEERIS

Dentre as técnicas de marcadores moleculares, o AFLP destaca-se pelo grande número de marcadores gerados por loci, grande poder de detecção de variabilidade genética e maior repetibilidade no ensaio (Vos et al. 1995). Esta técnica combina o poder de amostragem da digestão por enzimas de restrição com a rapidez e praticidade da detecção dos polimorfismos via PCR (Ferreira e Grattapaglia 1998).

A técnica de AFLP é empregada em quatro etapas: (1) Clivagem do DNA genômico com duas enzimas de restrição, sendo uma de corte raro, que reconhece um sítio de corte com seis a oito nucleotídeos, como a *EcoRI* e outra de corte frequente, que reconhece sítio de corte com quatro nucleotídeos, como a *MseI*; (2) Ligação de adaptadores, que são primers que possuem extremidades complementares às extremidades resultantes da clivagem pelas enzimas de restrição; (3) Amplificação pré-seletiva que usa primers contendo um nucleotídeo seletivo na extremidade 3' dos adaptadores (Ex: adaptador *EcoRI*+A e adaptador *MseI*+C); (4) Amplificação seletiva com primers contendo dois a três nucleotídeos adicionais na extremidade 3' dos primers pré-seletivos.

Os marcadores AFLP apresentam três vantagens importantes em relação aos demais marcadores: a) o grande número de fragmentos que são gerados e visualizados em um único gel, proporcionando uma amostragem ampla e simultânea de um genoma; b) grande poder de detecção de variabilidade genética, pois explora o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição como no ensaio de RFLP e a ocorrência ou não de amplificação a partir de sequências arbitrárias como na técnica de RAPD; c) a maior robustez quando

comparado com RAPD, uma vez que primers mais longos são utilizados na etapa de PCR, aumentando a especificidade da amplificação (Ferreira e Grattapaglia 1998). Outra grande vantagem dos marcadores AFLP é a não necessidade de conhecimento prévio do genoma. As principais limitações da técnica de AFLP incluem: a) seu caráter dominante, que impossibilita a diferenciação entre genótipos heterozigotos e homozigotos e por isso gera um menor conteúdo de informação por locus; b) o custo superior para implantação da técnica quando comparado ao RAPD, porém depois de implementada a técnica, os primers podem ser aplicados em qualquer genoma; c) a necessidade de um DNA altamente puro e de boa qualidade para possibilitar a digestão completa pelas enzimas de restrição (Ferreira 2003).

A metodologia de AFLP tem sido aplicada com sucesso na determinação das relações filogenéticas entre espécies e/ou entre populações de uma mesma espécie. Marcadores moleculares são frequentemente utilizados em estudos sobre o gênero *Hypochoeris* tanto no grupo do velho mundo quanto no grupo sul-americano de espécies (Stuessy et al. 2003; Tremetsberger et al. 2003a, 2003b; Stuessy et al. 2004; Tremetsberger et al. 2004; 2006; Ortiz et al. 2007). Os resultados destes estudos sugerem que o uso de marcadores AFLPs são adequados para estudos filogenéticos e para determinação da estrutura genética das populações do gênero *Hypochoeris* e estes dados podem fornecer informações relevantes para auxiliar na compreensão sobre a radiação adaptativa e chegada do gênero no continente sul-americano.

3 JUSTIFICATIVA

O gênero *Hypochoeris* apresenta dois centros de diversificação: a região Mediterrânea e a América do Sul. Porém a delimitação do grupo sul-americano, sua chegada até a América do Sul e mecanismos de radiação adaptativa neste continente ainda não são completamente entendidos. Portanto, o gênero é considerado um importante modelo para estudos filogenéticos e de biogeografia.

Para compreender melhor os mecanismos de radiação e a evolução deste gênero na América do Sul, não basta somente descobrir o seu centro de origem ou se esta é monofilética, mas também é essencial entender os processos que levaram a diversificação das espécies neste continente. Deste modo, o conhecimento detalhado de limites específicos e as relações filogenéticas em *Hypochoeris* da América do Sul podem resolver questões sobre os mecanismos de radiação adaptativa e de especiação deste gênero.

No Brasil, o maior número de espécies do gênero *Hypochoeris* é principalmente encontrado na região sul, com alguns dados de ocorrência na região sudeste. Dentre as espécies concentradas no sul do Brasil, encontra-se *Hypochoeris catharinensis* Cabr, uma espécie endêmica nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Pouco se sabe a respeito da espécie *H. catharinensis*. Dados sobre a estrutura cariotípica são as únicas informações disponíveis para esta espécie (Fiorin 2008) e nada se conhece sobre a estrutura genética de populações desta espécie, tampouco sobre a sua posição filogenética dentro do grupo sul-americano de *Hypochoeris*.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAIS

Conhecer a estrutura genética de *Hypochoeris catharinensis* e sua relação filogenética com as demais espécies sul-americanas do gênero *Hypochoeris*, visando a contribuir para o entendimento dos estudos biogeográficos da espécie de *H. catharinensis* e com isso gerar informações que ajudem também a compreender a evolução do gênero *Hypochoeris*.

4.2 ESPECÍFICOS:

- Aplicar as técnicas de AFLP em onze diferentes populações de *H. catharinensis* encontradas na região sul do Brasil, a fim de verificar a estrutura genética dessas populações;
- Determinar a posição filogenética desta espécie junto às outras do grupo sul-americano utilizando marcadores AFLP.

5 ARTIGOS

5.1 ARTIGO A

AFLPs REVEAL THE PHYLOGENETIC POSITION OF THE ENDEMIC HYPOCHAERIS CATHARINENSIS
WITHIN THE SOUTH AMERICAN GROUP OF SPECIES

**Maikel Reck; Lucas M Benício; Eduardo A Ruas; Luana A Rodrigues; Paulo M
Ruas; María A Ortiz; Salvador Talavera; Estrella Urtubey; Nelson I Matzenbacher;
Claudete F Ruas.**

Este artículo será sometido a la revista **Biologia Plantarum**

AFLPs REVEAL THE PHYLOGENETIC POSITION OF THE ENDEMIC *HYPOCHAERIS CATHARINENSIS*
WITHIN THE SOUTH AMERICAN GROUP OF SPECIES

Maikel Reck¹; Lucas M Benício¹; Eduardo A Ruas¹; Luana A Rodrigues¹; Paulo M Ruas¹; María A Ortiz²; Salvador Talavera²; Estrella Urtubey³; Nelson I Matzenbacher⁴; Claudete F Ruas¹.

Abstract

The genus *Hypochaeris* exhibits a disjunct distribution with 15 species in the Mediterranean region and around 50 species in South America. *Hypochaeris catharinensis* is an endemic species that occurs exclusively in a restricted area of Brazil. We applied *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) fingerprinting to investigate the position of *H. catharinensis* within the South American *Hypochaeris* group and to supplement the framework of a phylogenetic relationship proposed for the genus. Our study included 55 individuals, comprising nine South American species besides *H. angustifolia* from Morocco which is the putative ancestor of this group of species. Eleven AFLP primer combinations generated a total of 401 fragments of which 388 (96.75%) were polymorphic. The South American species were genetically very similar and they mostly fall into one main cluster (100% bootstrap support). *Hypochaeris catharinensis* is well-separated into the South American group and closely related to *H. lutea* (90% BS), even though these species are clearly distinguishable by morphological and ecological standpoints. This report is the first that included *H. catharinensis* in a molecular based study of *Hypochaeris* adding important information for the delimitation of this species into the South American group of species.

Keywords: *Asteraceae*. Genus *Hypochaeris*. *Lutea* group. Phylogeny.

Acknowledgments

We sincerely thank The Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP6510), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (grants to C.F. Ruas and P.M. Ruas CNPQ no. 201254/2003-4 and 201332/2003-5), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes and Fundacion BBVA for providing fundings.

¹ Departamento de Biología Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil. Author and address for correspondence: PhD – Department of General Biology Center of Biological Sciences State University of Londrinada 86051-990 Londrina, Parana State, Brasil Telephone: 55 43 33713317 E-mail: ruas@uel.com.br Email: ruas@sercomtel.com.br

² Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Espanha

³ Instituto de Botánica Darwinion, Labardén 200, CC 22, San Isidro. Argentina

Introduction

The genus *Hypochaeris* L. (*Asteraceae*) is represented by around 60 species distributed in North Africa, the Canary Islands, Europe, Asia, and South America (Samuel et al. 2003; Tremetsberger et al. 2005). The genus has two centers of diversification, the Mediterranean region with 15 species (DeFillips 1976) and South America with approximately 50 species (Bortiri 1999). Based on the number and morphology of the chromosomes, it was suggested that the genus probably originated in the Mediterranean region being South America the secondary center of diversification (Stebbins 1971; Ruas et al. 1995; Cerbah et al. 1998). Recent DNA sequence analyses support this idea, showing that *H. angustifolia* (Litard. & Maire) Maire, endemic to Morocco, is the sister taxon to all the South American clade of *Hypochaeris*, given support that the New World is the secondary center of diversity (Stuessy et al. 2003; Tremetsberger et al. 2005).

The genus *Hypochaeris* is considered very young in South America, where it has apparently derived from a single ancestral species through events of long distance dispersion, during the Pliocene or Pleistocene, between ~ 0.25 and ~1.00 mya, (Tremetsberger et al. 2005). Single colonization of a common ancestor followed by rapid radiation allowed the genus to diverge into new habitats throughout the South American continent (Stuessy et al. 2003; Tremetsberger et al. 2005), developing a great extent of morphological divergence among species. Recent interpretation of the karyotypic information in a phylogenetic context suggests that the early evolution of *Hypochaeris* in South America was characterized by considerable karyotype differentiation resulting from independent derivations from the ancestral karyotype and marked diversification with respect to the position and evolution of the 35S rDNA locus on chromosome 3 (Weiss-Schneeweis et al. 2008). Nonetheless, the South American *Hypochaeris* has revealed a low degree of chromosome and genetic divergence, corroborating with the idea that this group of species is very young. Studies based on karyological data (Stebbins 1971; Cerbah et al. 1995, 1998; Ruas et al. 1995, 2005; Weiss-Schneeweis et al. 2003, 2007, 2008), nuclear internal transcribed spacer (ITS), chloroplast (trnL intron and trnL/trnF spacer and matK) gene sequences (Cerbah et al. 1998; Samuel et al. 2003), and AFLP data (Tremetsberger et al. 2005; 2006) suggested that the South American group of genus *Hypochaeris* is monophyletic.

⁴ Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Adaptative radiations have produced ecologically and morphologically distinct taxa, many of which have highly restricted distributions (Sang et al. 1994; Kim et al. 1996, 2008). In Brazil, the genus *Hypochaeris* is represented by eight to ten species that are mostly endemic to the southern region. The exception is *H. chillensis* (Kunth) Britton, which present a higher range of distribution, from Rio Grande do Sul to São Paulo states in Brazil and in other countries of South America such as, Argentina, Uruguay, Paraguay, Peru, Bolivia, Ecuador and Colombia (Bortiri 1999; Cabrera, 1937, 1974, 1976; Cabrera et al. 2000; Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher 2007). Among the Brazilian taxa, *H. catharinensis* Cabrera is an endemic species that grows in a restricted area, comprising the north of Rio Grande do Sul and the Santa Catarina states, mostly at high altitudes (up to 1400m) and cold areas (Cabrera 1963; Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher 2007). Morphologically, *H. catharinensis* has rose-like entire oblanceolate leaves, forming a rosette that favours the total light incidence, solitary stem, with or without bracts. The capitula of *H. catharinensis* has florets with yellow corolles of size equal or a little longer than involucre, and beaked achenes with the rostrete longer than fertile part (Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher 2007). *Hypochaeris catharinensis* exhibits an endemic evolutionary process, probably due to its adverse environmental restrictions, usually composed by grass-dominated areas, slopes or in fields with *Araucaria angustifolia*. The species is adapted only to dry, rocky and shallow soils resulting of basalt weathering, (Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher 2007), that characterize a nutrient-poor environment, due to the regional high rate of bleaching (Almeida 2009).

Detection and analysis of genetic variation can help us understand the molecular basis of various biological phenomena in plants. Several authors suggest that AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) method can be used for phylogenetic reconstructions, especially when the species group had diverged recently or radiated within a short period of time (Bussell et al. 2005; Koopman 2005). The AFLP technique detects genomic restriction fragments by PCR amplification, combining the reliability of the restriction enzymes and the power of the PCR technique (Vos et al. 1995). AFPLs have been successfully applied in studies of *Hypochaeris* (Stuessy et al. 2003, 2004; Tremetsberger et al. 2005, 2006; Ortiz et al. 2007, 2008; Terrab et al. 2009) and proved to be a good source of information to study the genus in the South American continent.

We employed the AFLP molecular markers to continue the studies of the genus *Hypochaeris*, with the main purpose of defining for first time the phylogenetic relationships of the *H. catharinensis* within the South American group of species.

Materials and Methods

Species and material: To define the phylogenetic position of *H. catharinensis* within the South American group of *Hypochoeris*, this species was investigated together with eight additional representatives, including *H. megapotamica*, *H. pampasica*, *H. neopinnatifida* subspecies *pinnatifida* Speg., *H. argentina* and *H. apargioides*, from three of the six phylogenetic groups described by Tremetsberger et al. (2006). Besides, three other species (*H. lutea*, *H. petiolaris* and *H. variegata*) that did not associate to any molecular group in the work of Tremetsberger et al. (2006) were also used. The Moroccan *H. angustifolia* that is considered the sister species of the entire South American group (Tremetsberger et al. 2005) was used as outgroup (Table 1).

Plant material consisted of tissue samples (young leaves) collected from 55 plants that comprise 17 individuals, representatives of three populations of *H. catharinensis*, plus three to six individuals, sampled from each of the eight additional South American species of *Hypochoeris* (Table 1). The leaves of *H. catharinensis* were collected and dried in silica gel during field work in 2006 and 2007 in South Brazil. Samples of other related species were obtained from field collection of 2006 in Brazil (*H. lutea* and *H. megapotamica*) or from collections of the University of Sevilla, Spain (*H. pampasica*, *H. variegata*, *H. neopinnatifida*, *H. apargioides*, *H. argentina* and *H. petiolaris*). *Hypochoeris angustifolia* was represented by five individuals representing four populations from Morocco. The number of individuals, number the collection and collection site are presented in Table 1. The vouchers of species collected in Brazil are maintained in the Herbarium of the Universidade Estadual de Londrina (FUEL) and in the Herbarium SEV of the University of Seville, Spain.

DNA isolation and AFLP analysis and AFLP fingerprinting: Total genomic DNA was extracted from dried leaves using a CTAB protocol (Doyle and Doyle, 1987) with minor modifications (Tremetsberger et al. 2003), and the quality-checked on 1% TAE-agarose gels. For each sample, approximately 800 ng of DNA was restricted with 5 U of EcoRI (Fermentas) and 5 U of MseI (NEB), in a total volume of 20 μ L, at 37 °C overnight. Eco- and Mse-adaptors were then ligated to the resulting DNA fragments by incubating with T4 DNA ligase (Fermentas) at 37 °C for 3:30 h (Vos et al. 1995). Pre-selective PCR amplification was in of 3.5 μ L GoTaq® Green Master mix (Promega) 0.5 μ L of each Eco+A (0.5 μ M) and Mse+C (0.5 μ M) primers and 3.5 μ L of restriction-ligation solution (diluted 4 x in sterile water), adjusted to 10 μ L with double distilled water. The pre-amplification PCR

program consisted of 1 cycle at 72 °C for 2 min followed by 20 cycles at 90 °C for 1 sec, 56 °C for 30 sec and 72 °C for 2 min and 1 final cycle of 60 °C for 30 min.

Table 1 – Number of individuals (N) and collection sites of the South American species of *Hypochoeris* sampled, plus *H. angustifolia* (outgroup) analysed by AFLP markers

Species	N	Collection sites
Pampasica group		
- <i>H. megapotamica</i> Cabrera	4	Brazil, Rio Grande do Sul: Montenegro and Jaquirana (NM, 2106 and 2606).
- <i>H. pampasica</i> Cabrera	6	Argentina, Prov. Buenos Aires: Saladillo (EU, 234); Prov. San Luis: Villa Mercedes (EU, 236 e 237).
- <i>H. neopinnatifida</i> C.F. Azevêdo-Gonçalves & N.I. Matzenbacher	4	Argentina, Prov. Buenos Aires: Saladillo (EU, 234); Prov. San Luis: Villa Mercedes (EU, 236 e 237).
Microcephala group		
- <i>H. argentina</i> Cabrera	3	Argentina, Prov. Córdoba: Córdoba (EU et al., 200 e 208).
Apargioides group		
- <i>H. apargioides</i> Hook. & Arn.	4	Argentina (EU et al., 42)
Ungrouped species		
- <i>H. catharinensis</i> Cabrera	17	Brazil, Rio Grande do Sul: São José dos Ausentes and Cambará do Sul (NM, 1906 and 2806); Santa Catarina, Rancho Queimado (CR, 0407).
- <i>H. lutea</i> (Vell.) Britton	4	Brazil, Rio Grande do Sul: Fazenda Capão Muniz, between São Francisco de Paula and Cambará do Sul (NM, 1306) and Canyon Fortaleza Município of Cambará do Sul (NM 2706).
- <i>H. petiolaris</i> (Hook. et Arn.) Griseb.	4	Argentina, Prov. Buenos Aires: Mar del Plata and La Plata (EU, 200 and 223)
- <i>H. variegata</i> (Lam.) Baker	4	Argentina, Prov. Buenos Aires: Olavarria and Tandil (EU, 212 and 172)
Outgroup		
- <i>H. angustifolia</i> (Litard. & Maire) Maire	5	Marocco, Middle Atlas: Bekrite and Larais (ST, 263, 193, 703/03 and 73/03).

Abbreviations of collectors: AT, A. Terrab; CR, C.F. Ruas; EU, E. Urtubey; NM, N.I. Matzenbacher; ST, S. Talavera; TS, T. Stuessy.

Selective PCR amplifications contained 3.5 µL of GoTaq® Green Master mix (Promega), 0.54 µL of each of the Eco and Mse (5 pmol) selective-primers, and 3.0 µL of the diluted (5 x in sterile water) pre-amplification product, adjusting to a final volume of 10 µL with double distillate water. For selective amplification the primer combinations had an extension of two or three additional nucleotides (Table 2).

Table 2 – Selective primers combinations (11) used for AFLP analysis of South American species of *Hypochaeris* and the levels of information obtained from each combination.

Primers Combinations	Number of markers	% Polymorphism
<i>EcoRI</i> -ACT + <i>MseI</i> -CTGA	55	100%
<i>EcoRI</i> -ACT + <i>MseI</i> -CAG	30	93,3%
<i>EcoRI</i> -AGC + <i>MseI</i> -CAG	53	94,34%
<i>EcoRI</i> -ACG + <i>MseI</i> -CTC	30	100%
<i>EcoRI</i> -AGC + <i>MseI</i> -CTCG	42	100%
<i>EcoRI</i> -ATC + <i>MseI</i> -CTCG	40	97,5%
<i>EcoRI</i> -ACG + <i>MseI</i> -CAT	35	100%
<i>EcoRI</i> -ACT + <i>MseI</i> -CAC	24	91,66%
<i>EcoRI</i> -AGC + <i>MseI</i> -CAT	24	95,83%
<i>EcoRI</i> -AGC + <i>MseI</i> -CTGA	30	100%
<i>EcoRI</i> -ATC + <i>MseI</i> -CAG	38	92,10%

Primer selection was performed on four samples using sixteen *EcoRI*/*MseI* primer combinations. Based on the number and quality of polymorphic fragments, 11 informative primer combinations were screened in all 55 samples (Table 1). A reproducibility assay was performed to increase the consistency of the results using two selected samples that were processed independently twice with all 11 primer combinations. Selective PCR conditions consisted of an initial cycle of 94 °C for 2 min, 65 °C for 30 sec and 72 °C for 2 min; 8 cycles of 94 °C for 1 sec, 64 °C for 30 sec and 72 °C for 2 min; 23 cycles of 94 °C for 1 sec, 56 °C for 30 sec and 72 °C for 2 min, and a final extension of 60 °C for 30 min. The products of the selective amplification were run on a 7% acrylamide:bisacrylamide (29:1) gel (200 W for 3:30 h), silver stained, visualized by exposing the gels to white light and photographed using a digital camera.

Data Analysis: The raw AFLP fragments, ranging between 50 and 1000 bp in length, were scored as present (1) or absent (0). The binary AFLP matrix was imported into dBoot ver. 1.1 (Coelho 2001b) to check the consistency of the data using the coefficient of variation (CV%) for the total number of amplified products. For phylogenetic analysis, all individuals belonging to the same species were condensed into clusters by using Tree-Explorer into the MEGA4 package (Tamura et al. 2007). Moreover, cluster analysis based on DICE coefficient (data not shown) was performed on the similarity matrix of all individuals

sampled employing the unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA) algorithm (Sneath and Sokal, 1973) provided in the software program NTSYSpc, version 2.1 (Exeter Software, Rohlf 2000). The robustness of the data was tested by bootstrap analysis with 10,000 replicates using the Bood software v 3.0 (Coelho 2001a) (data not shown). The tree from the AFLP data was confirmed using the UPGMA method with Nei-Li distance implemented in PAUP ver. 4.0b10 (Swofford 2003) and its robustness was confirmed using the bootstrap method (Felsenstein 1985) with 10,000 replicates using PAUP ver. 4.0b10 (Swofford 2003).

Results and Discussion

The use of 11 AFLP primer combinations yielded 401 markers, ranging in size from 50 to 1000bp, of which 388 (96.75%) were polymorphic. The number of bands over all samples detected by individual primer combinations ranged from 24, for primer combinations EcoRI-ACT/MseI-CAC and EcoRI-AGC/MseI-CAT, to 55 for primer combination EcoRI-ACT/MseI-CTGA (Table 2). The coefficient of variation (CV%) calculated for the total number of markers was 4,32%, demonstrating a high level of trustworthiness in our results (Fig. 1).

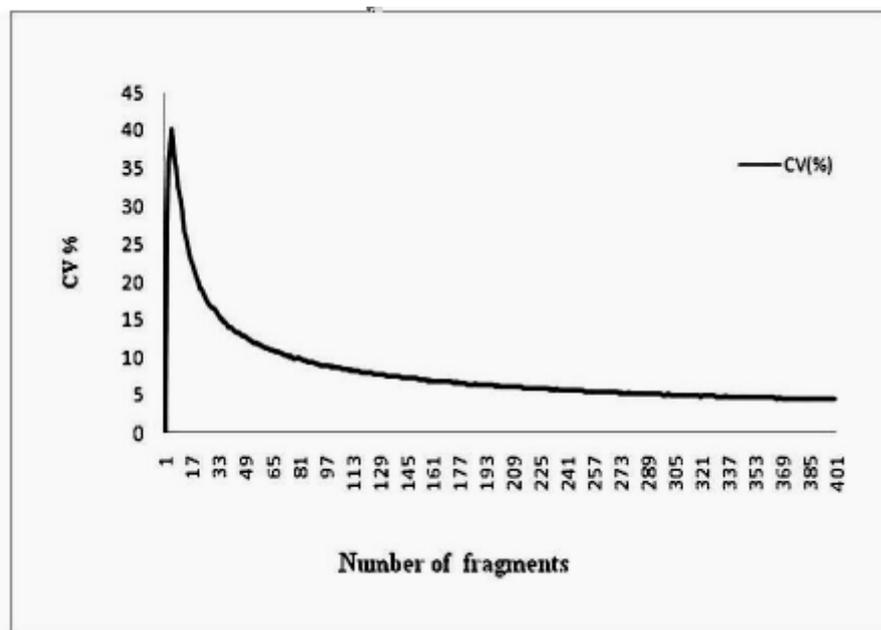


Figura 1 – Coefficient of variation for the number of amplified markers in the South American species of *Hypochaeris* and in the Marocco Species that used as outgroup *H. angustifolia*.

Phylogenetic Relationships: AFLP markers have proved to be useful for delimitation of South American species of *Hypochoeris* (Tremetsberger et al. 2006; Weiss-Schneeweis et al. 2008). In this study, we also found the South American species associated as a monophyletic group in a single clade with 100% bootstrap (BS) (Fig. 2). Whereas some phylogenetic relationships remain unresolved (weak bootstrap support), the AFLP analysis show that most of the associations within species are supported by very high bootstrap (88-100% BS) values (Figs. 2-3). The species *H. pampasica*, *H. megapotamica*, and *H. neopinnatifida*, were set with no support. These species cluster together with *H. petiolaris*, *H. variegata* and *H. argentina* while *H. apargioides* appears as sister species of the South American group (100% BS). The AFLP phenograms clearly show that *H. catharinensis*, which is included by the first time in molecular based studies, is closely related to *H. lutea*. The two species form a cluster between *H. apargioides* and the remaining South America species. *Hypochoeris angustifolia*, the presumptive ancestor of the South American *Hypochoeris*, branches off from deep nodes of the tree with 100% BS (Fig. 2).

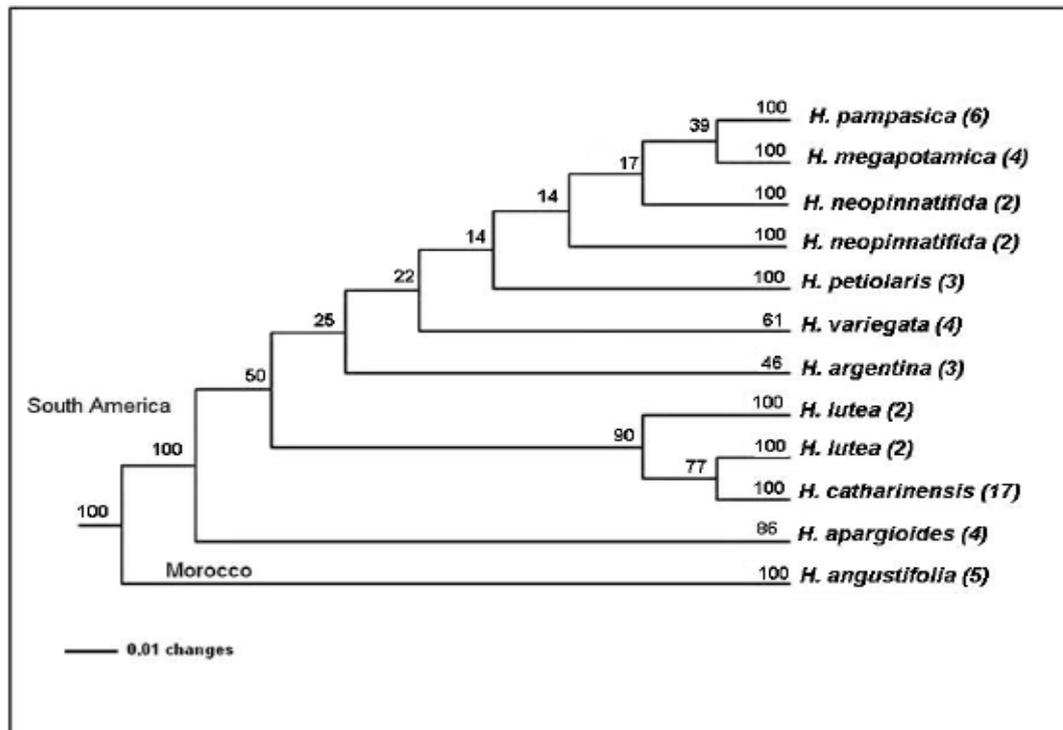


Figura 2 – Consensus tree including groups compatible with 10,000 bootstrap replicates of South American species of *Hypochoeris* and *H. angustifolia* as outgroup based on unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) analysis of 401 AFLP fragments. Numbers on branches are bootstrap proportions (BS). South American species of *Hypochoeris* formed a single group with 100% BS. Number in parentheses after species names

indicates the number of individuals from each species analyzed and clustered by TreeExplorer in MEGA4.

In examples of recent and rapid radiation in plants such as *Hypochoeris*, it could be argued that the AFLP data have simply not evolved fast enough to accumulate substitutions at restriction sites and thus support species relationships. Nevertheless, Tremetsberger et al. (2006) showed that AFLP data were useful for the delimitation of South America species into six phylogenetic groups that were, however, unresolved because the basal nodes receive only low (below 50%) bootstrap support. Three of the phylogenetic groups obtained by Tremetsberger et al. (2006) were confirmed by Weiss-Schneeweiss et al. (2008) and also in this study (Fig. 3). Our AFLP data identified the first cluster as the *Pampasica* group, where *H. pampasica* and *H. megapotamica* were associated in the tree (39% BS) and both clustered together with individuals of *H. neopinnatifida* (17% BS) from two different populations. The species of the *Pampasica* group were collected from the San Luis province (Argentina), South of Rio Grande do Sul state (Brazil), and Buenos Aires province (Argentina), respectively. This result confirmed these taxa as sister species such as verified from RAPD (Ruas et al. 2005) and AFLP data (Stuessy et al. 2004; Tremetsberger et al. 2006; Weiss-Schneeweiss et al. 2008). *Hypochoeris petiolaris* was placed between the species of the *Pampasica* group and *H. variegata* of the *Microcephala* group (Fig. 3). Whereas similar results were reported by Tremetsberger et al. (2006) and Weiss-Schneeweiss et al. (2008), the relationships among these species remain unresolved. *Hypochoeris argentina*, the only representative of the *Microcephala* group (Tremetsberger et al. 2006), is not associated with the others phylogenetic groups. The individuals of *H. apargioides* (*Apargioides* group, Tremetsberger et al. 2006; Weiss-Schneeweiss et al. 2008) formed an isolated cluster that is associated (100% BS) with the other South America species (Fig. 3).

In the present work, the inclusion of *H. catharinensis* in molecular based studies revealed a new phylogenetic group for South American *Hypochoeris*. Our study included 17 individuals of *H. catharinensis* belonged to three different populations in southern Brazil. Although these individuals appeared intermixed in the tree, they associated as a monophyletic entity with a high (100%) BS support. The AFLP data clearly revealed that *H. catharinensis* form a well resolved cluster with *H. lutea* (77-90% BS). This association is strengthened (90% BS) when four individuals of two different populations of *H. lutea* (NM-2706, Canyon Fortaleza and NM-1306, Fazenda Capão Muniz, Rio Grande do Sul state), were

considered. When only two individuals of *H. lutea* (NM-1306 population) were compared with *H. catharinensis*, the two species clustered with 77% BS.

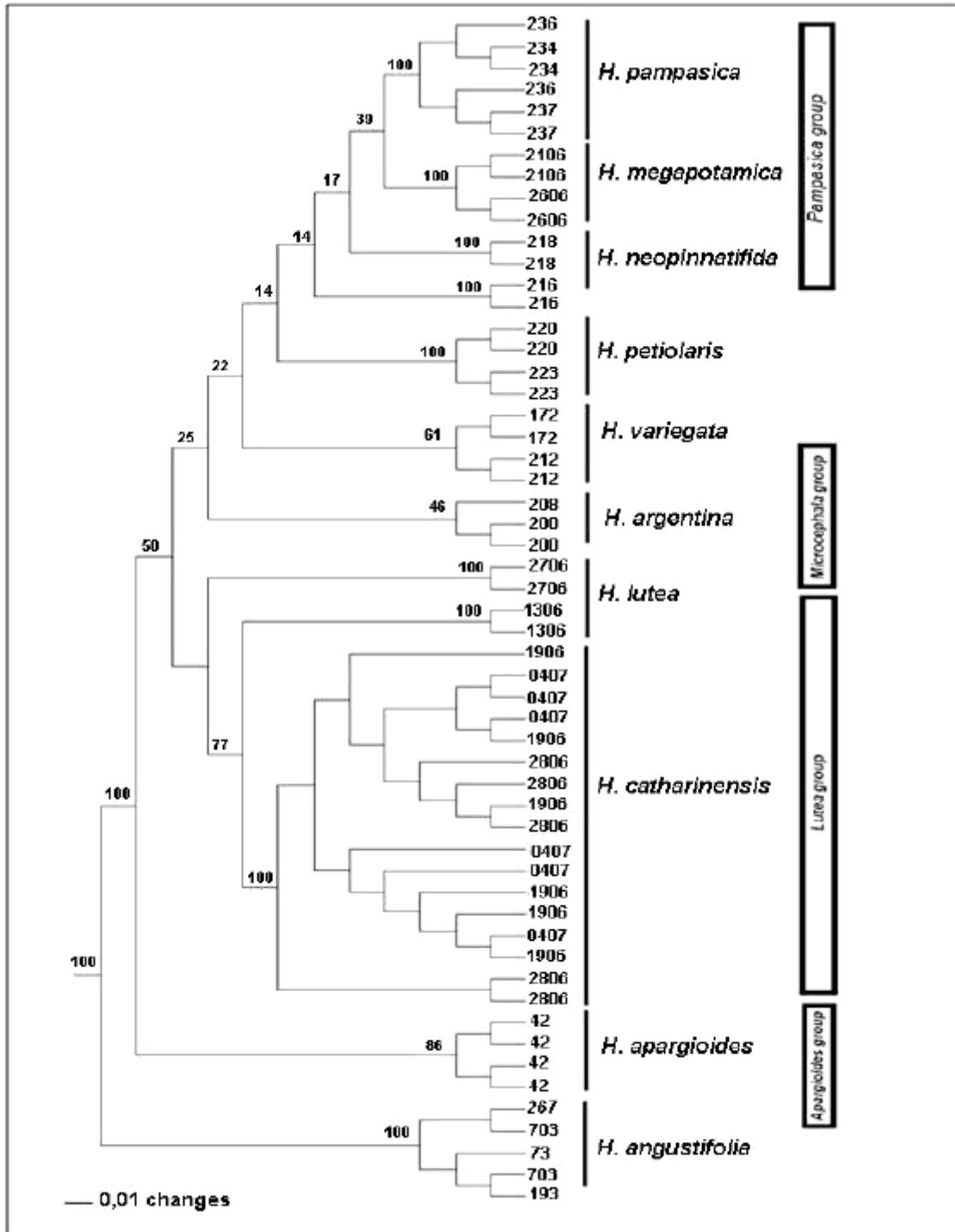


Figura 3 – Consensus tree including groups compatible with 10,000 bootstrap replicates of South American species of *Hypochaeris* and *H. angustifolia* as outgroup based on unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA) analysis of 401 AFLP fragments. Numbers on branches are bootstrap proportions (BS). Numbers after branches ends represent individuals from each species according to their respective population collection number.

Several studies with South American species of *Hypochaeris*, including *H. lutea* (syn. *H. rosengurtii* var. *rosengurtii*; Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher 2005; 2006 and 2007), used molecular markers and cytogenetic (Ruas et al. 1995, 2005; Tremetsberger et al.

2006; Weiss-Schneeweiss et al. 2007, 2008) to identify the phylogenetic relationships among species. However, none of the molecular groups, defined by Tremetsberger et al. (2006) on the basis of AFLP markers, included *H. lutea*. The present AFLP data showing the association between *H. lutea* and *H. catharinensis* is therefore, of relevance to define a new phylogenetic group for the South American *Hypochoeris*.

Based on similar distribution of the 35S rDNA, Weiss-Schneeweiss et al. (2008) included *H. lutea* and *H. patagonica* in the same karyotype group, named the Patagonica group. The authors suggested that the Patagonica group karyotype might have derived from the ancestral *H. angustifolia*-like karyotype by a single-step loss of the 35S rDNA locus on chromosome 2. Though *H. lutea* and *H. patagonica* were in the same karyotype group, they were not associated on the AFLP work of Tremetsberger et al. (2006) and Weiss-Schneeweiss et al. (2008), probably because the processes of karyotype evolution take place independently in *H. patagonica* and in *H. lutea*.

Recent chromosome studies (data not shown) carried out for ten populations of *H. catharinensis* revealed that this species share the same karyotype pattern with *H. lutea*. Both species have only a single 35S rDNA locus per genome located at the end of the short arm on chromosome 3 (personal communication). This data is supported by our AFLP results, which suggest that *H. lutea* is more closely related to *H. catharinensis*. Both *H. lutea* and *H. catharinensis* can be mostly found in Southern Brazil (Santa Catarina and Rio Grande do Sul states), although *H. lutea* exhibits a broad range of geographic distribution (Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher 2007). Based on the current AFLP and cytogenetic data (manuscript in preparation) we propose a new phylogenetic group named the *Lutea* group that is composed by *H. lutea* and *H. catharinensis*.

According to Stuessy et al. (2004), ecological differentiation may have occurred independently in different lineages of *Hypochoeris* during the assembling in the continent, sustaining a basic pattern of adaptive radiation. Even though the AFLP and chromosome (not shown) data revealed a close relationship between *H. catharinensis* and *H. lutea*, the genetic similarity is not positively correlated with morphological and ecological characteristics. Morphologically, *H. catharinensis* and *H. lutea* are clearly distinguishable as seen by the simple vs. ramified stem, basal vs. basal and caulinar leaves, corollas that are equal or shorter vs. longer than involucres, ligules that are shorter vs. longer than the tube of the corolla, and shorter vs. longer achenes. Besides, *H. catharinensis* presents rose-like leaves forming rosettes, which favours the total light incidence (Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher 2007). Additionally, the distribution of *H. catharinensis* is limited to dry, shallow and rocky soils that favours the development of a horizontal root system, characteristic to this species. *Hypochoeris*

catharinensis occurs in association with shrub or herbs, with prevalence of grass in open forests of *Araucaria angustifolia*, and in the boundaries of the roadsides. The ecological requirements of *H. catharinensis* suggest that possibly this species went through an endemic evolutionary process, probably due to environmental constraints motivated by intrinsic adverse climate features of the plateau regions where the species is distributed.

In contrast, *H. lutea* is adapted only to wet environment and apparently, it has become a very plastic species, occurring in a considerable variety of physiographic regions (Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher 2007; Matzenbacher 1998). *Hypochaeris lutea* is commonly associated with grasses, *Sphagnum* sp, *Baccharis* sp, ferns and other species that are adapted to deep, wet and swampy soils. These characteristics have favoured in *H. lutea* the development of pivotant roots, a long and thin flower stem and very narrow long leaves that assist it in searching for photosynthetic resources (Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher 2007; Matzenbacher 1998). Interestingly, the ecological features of *H. lutea* are shared with the Moroccan *H. angustifolia*, the putative ancestor of the South American *Hypochaeris*.

Delimiting the boundaries of species within a group of very young species, such as *Hypochaeris* in South America, has been difficult because the criteria for recognizing species continue to be debated and because the phylogenetic relationships of species, as well as the genetic characteristics that distinguish them, are not completely understood (Samuel et al. 2003; Stuessy et al. 2003; Tremetsberger et al. 2005, 2006; Weiss-Schneeweiss et al. 2008). As demonstrated recently, hybridization between *Hypochaeris* species with overlapping distribution (Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher 2007) may complicate this scenario. Our study the AFLP data allowed to set the phylogenetic position of *H. catharinensis* among others species of South American *Hypochaeris*. The results contributed not only to the delimitation of *H. catharinensis* within the South American group of species, but also permitted to define a novel and well resolved phylogenetic group (the *Lutea* group), represented by *H. lutea* and *H. catharinensis*, within the South American group of species.

REFERENCES

- Almeida, J. A.: [Abiotic factors] Fatores Abióticos. -In: Boldrini, I.I. (ed.): [Biodiversity of the fields of the Araucária Plateau]. Pp. 19-38. Ministério do Meio Ambiente, Brasília 2009. [In Portug.]
- Azevêdo-Gonçalves, C. F., Matzenbacher, N. I.: Taxonomic notes in *Hypochaeris* L. (*Asteraceae*). - Comp. Newsl. **42**: 1-4, 2005.
- Azevêdo-Gonçalves, C. F., Matzenbacher, N. I.: [Nomenclatural notes in *Hypochaeris* L. (*Asteraceae*).] - Pesquisas. Ser. Bot. **57**: 157-159, 2006. [In Portug.]
- Azevêdo-Gonçalves, C. F., Matzenbacher, N. I.: [The genus *Hypochaeris* L. (*Asteraceae*) in Rio Grande do Sul, Brazil.] – Iheringia. Ser. Bot. **62**: 55-87, 2007. [In Portug.]
- Bortiri, E.: [Argentine Phanerogamic Flora. *Asteraceae*, Lactuceae: *Hypochaeris*.] Pp.1-25. CONICET - Cordoba, 1999.
- Bussell, J. D., Waycott, M., Chappill, J. A.: Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. - Perspect. Plant. Ecol. Evol. Syst. **7**: 3-26, 2005.
- Cabrera, A. L.: [Interesting or new Argentine Compounds.] -Notas del Museo de la Plata. **2**: 171-204, 1937. [In Spain.]
- Cabrera, A. L.: [Studies on the genus *Hypochoeris*.] -Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. **10**: 166- 195, 1963. [In Spain.]
- Cabrera, A. L.: [Compositae]. -In: Burkart, A. (ed.): [Illustrated Flora of Entre Ríos (Argentina).] Pp.512-525. -I.N.T.A. -Buenos Aires, 1974. [In Spain.]
- Cabrera, A. L.: [Material for a review of the genus *Hypochoeris* I. *Hypochoeris chillensis* (H.B.K.) Hieron.] Darwiniana. **20**: 312-322, 1976. [In Spain.]
- Cabrera, A. L., Crisci, J.V., Delucchi, G., Freire, S.E., Giuliano, D.A., Iharlegui, L., Katinas, L., Sáenz, A.A., Sancho, G., Urtubey, E.: [Illustrated catalogue of the compositae (*Asteraceae*) from Buenos Aires province, Argentina: Systematics, Ecology and Use.] Pp.136 – CONICET -Buenos Aires, 2000. [In Spain.]
- Cerbah, M., Coulaud, J., Godelle, B., Siljak-Yakovlev, S.: Genome size, fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochaeris* species. -Genome. **38**: 689-695, 1995.

- 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. -Mol. Biol. Evol. **15**: 345-354, 1998.
- Coelho, A. S. G.: [BOOD – Dendrogram assessment based on genetic similarities/distance estimates through bootstrap procedure, Version 3.0.] – UFG -Goiânia, 2001a. [In Portug.]
- Coelho, A.S.G.: [Software: DBOOT – Errors assessment associated to genetic similarities/distance estimates through bootstrap procedure with variable number of markers, Version 1.1.] – UFG -Goiânia, 2001b. [In Portug.]
- Defilipps, R. A.: *Hypochoeris* L. In: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., Webb, D. A., Chater, A. O., Defilipps, R. A., Richardson, I.B.K.: -(eds.) Flora Europea. Vol. 4. Pp.308–310. Cambridge University Press -Cambridge, 1976.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L.: A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. - Phytochem. Bull. **19**: 11-15, 1987.
- Felsenstein, J.: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution **39**: 783-791, 1985.
- Kim, S. C., Crawford, D. J., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A.: A common origin for woody *Sonchus* and five related genera in the Macaronesian islands: molecular evidence for extensive radiation. -PNAS. **93**: 7743-7748, 1996.
- Kim, S. C., McGowen, M. R., Lubinsky, P., Barber, J. C., Mort, M. E., Santos-Guerra, A.: Timing and tempo of early and successive adaptive radiations in Macaronesia. -PLoS ONE. **3**: e2139, 2008.
- Koopman, W.: Phylogenetic signal in AFLP data sets. – Syst. Biol. **54**: 197–217, 2005.
- Matzenbacher, N. I.: [The complex “Senecionioide” (*Asteraceae* – Senecioneae) in Rio Grande do Sul – Brazil. 276p. il. Thesis (Doctorship)] – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1998. [In Portuguese]
- Ortiz, M. A., Tremetsberger, K., Talavera, S., Stuessy, T. F., Garcia-Castano, J. L. : Population structure of *Hypochoeris salzmanniana* DC. (*Asteraceae*), an endemic species to the Atlantic coast on both sides of the Strait of Gibraltar, in relation to Quaternary sea level changes. - Mol. Ecol. **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. -*Mol. Ecol.* **17**: 3664-3667, 2008.
- Rohlf, F. J.: NTSYS-pc Numerical taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. -Exeter Publishing Ltd. Setauket, NY (Software), 2000.
- Ruas, C. F., Ruas, P. M, Matzenbacher N. I., Ross, G., Bernini, C., Vanzela, A. L. L.: Cytogenetic studies of some *Hypochaeris* species (*Compositae*) from Brazil. -*Amer. J. Bot.* **82**: 369-375, 1995.
- Ruas, C. F., Vanzela, A. L. L., Santos, M. O., Fregonezi, J. N., Ruas, P. M., Matzenbacher, N. I., Aguiar-Perecin, M.L.R.: Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochaeris* species (*Asteraceae*) from Brazil. - *Genet. Mol. Biol.* **28**: 129-139, 2005.
- Samuel, R., Stuessy, T. F., Tremetsberger, K., Baeza, C. M., Siljak-Yakovlev, S.: Phylogenetic relationships among species of *Hypochaeris* (*Asteraceae*, *Cichorieae*) based on ITS, plastid trnL intron, trnL-F spacer, and matK sequences. -*Am. J. Bot.* **90**: 496-507, 2003.
- Sang, T., Crawford, D. J., Kim, S. C., Stuessy, T. F.: Radiation of the endemic genus *Dendroseris* (*Asteraceae*) on the Juan Fernández Islands – evidence from sequences of the ITS regions of nuclear ribosomal DNA. - *Amer. J. Bot.* **81**: 1494-1501, 1994.
- Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R.: Numerical taxonomy. W. H. Freeman, San Fransisco, 1973.
- Stebbins, G. L.: Chromosomal evolution in higher plants. - Edward Arnold -London, 1971.
- 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. Appl. Ecol.* **4**: 287–296, 2003.
- 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, B.A., Chiang, T.Y., Chuou, C.H. (eds.): Plant evolutionary genetics and the biology of weeds. Pp.23-39. Endemic Species Research Institute - Chi-Chi, 2004.
- Swofford, D. L.: PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), Version 4.0b10. - Sinauer Associates - Sunderland, 2003.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S.: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 4.0. – *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599, 2007.
- Terrab, A., Ortiz, M. A., Talavera, M., Ariza, M. J., Moriana, M. C., Garrcía-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. – *Mol. Phylogenet.Evol.* **53**: 13-22, 2009.
- Tremetsberger, K., Stuessy, T. F., Kadlec, G., Urtubey, E., Baeza, C. M., Beck, S. G., Valdebenito, H. A., Ruas, C. F., Matzenbacher, N.I.: AFLP Phylogeny of South American Species of *Hypochaeris* (*Asteraceae*, *Lactuceae*). – *Syst. Bot.* **3**: 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. – *Mol. Ecol.* **12**: 2649–2659, 2003.
- 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*). – *Mol. Phylogenet. Evol.* **35**: 102-116, 2005.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van, D.E., Lee, T., Hornes, M., Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper, M., Zabeau, M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. – *Nucleic. Acids. Res.* **23**: 4407-4414, 1995.
- 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. Syst. Evol.* **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*). – *Bot. J. Linn. Soc.* **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. – *Ann. Bot.* **101**: 909-918, 2008.

5.2 ARTIGO B

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *HYPOCHAERIS CATHARINENSIS* (ASTERACEAE)
ESPÉCIE ENDÊMICA DO SUL DO BRASIL COM BASE EM MARCADORES
MOLECULARES AFLP

Maikel Reck, Lucas Milanez Benício, Luana A. Rodrigues, Eduardo A. Ruas, Paulo M. Ruas, María A. Ortiz, Salvador Talavera, Todd Stuessy, Karin Tremetsberger, Estrella Urtubey, Nelson I. Matzenbacher, Claudete F. Ruas

* Este artigo será enviado para a revista **Genetica**.

ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *HYPOCHAERIS CATHARINENSIS* (ASTERACEAE)
 ESPÉCIE ENDÊMICA DO SUL DO BRASIL COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES AFLP

Maikel Reck¹, Lucas Milanez Benício¹, Luana A. Rodrigues¹, Eduardo A. Ruas¹, Paulo M. Ruas¹, María A. Ortiz², Salvador Talavera², Todd Stuessy³, Karin Tremetsberger³, Estrella Urtubey⁴, Nelson I. Matzenbacher⁵, Claudete F. Ruas¹

Resumo

O gênero *Hypochoeris* chegou na América do Sul, aparentemente, através de um único evento de dispersão à longa distância, a partir de uma espécie ancestral do Noroeste da África. Processos rápidos e recentes de radiação adaptativa no continente sul-americano deram origem à aproximadamente 50 espécies, das quais 8-10 podem ser encontradas ao sul do Brasil. Neste trabalho usamos a técnica do polimorfismo de fragmentos amplificados (AFLP) para o estudo de *Hypochoeris catharinensis*, a única espécie de *Hypochoeris* reconhecidamente endêmica do Brasil a qual, é incluída pela primeira vez em estudos moleculares. Seis combinações de primers de AFLP foram aplicados em uma amostra de 273 indivíduos representantes de 11 populações de *H. catharinensis*, coletadas de diferentes áreas de ocorrência no sul do Brasil. De um total de 183 fragmentos produzidos, 165 (90,16 %) foram polimórficos. As populações de *H. catharinensis* apresentaram altas frequências (56,88%) de loci polimórficos (Pp) e alta (0,2025) diversidade gênica (Hs) comparadas com outras espécies sul-americanas. A Análise da Coordenada Principal mostrou que a maioria das 11 populações tem indivíduos que estão misturados em outras populações, revelando a ausência de um padrão claro na estrutura genética. A distribuição da variabilidade genética foi maior dentro (83,64%) das populações que entre (16,36%) as populações de *H. catharinensis*. O padrão na distribuição da variabilidade genética e a falta de uma estrutura genética clara em *H. catharinensis* são consistentes com um processo de radiação rápida e recente que tem sido proposto para explicar a diversificação do gênero no continente sul-americano.

Palavras-chave: Endemismo. *Hypochoeris*. Radiação adaptativa. Variabilidade genética.

Abstract

Hypochoeris has apparently arrived in South America, by a single event of long distance dispersal of an ancestral species from Northwest Africa. Rapid and recent processes of adaptative radiation into the South American continent gave rise to about 50 species, 8-10 of which can be found in southern Brazil. *Hypochoeris catharinensis* is recognized as the only

¹ Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil

² Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Espanha

³ Department of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, University of Vienna, Vienna, Áustria

⁴ Instituto de Botánica Darwinion, Labardén 200, CC 22, San Isidro. Argentina

⁵ Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

known endemic species of *Hypochoeris* in Brazil and it is included here by the first time in a molecular based study. We applied the *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) to in a sample of 273 individuals, representatives of 11 populations of *H. catharinensis*, collected from its range of occurrence in southern Brazil. Six AFLP primers combinations rendered a total of 183 markers of which, 165 (90.16%) were polymorphic. The populations of *H. catharinensis* exhibited high frequencies (56.88%) of polymorphic loci (Pp) and high (0.2025) genic diversity (Hs) compared to other South-American species. Principal Coordinate Analysis (PCO) showed that most of the 11 populations studied have individuals that are mixed in other populations, revealing the absence of a clear pattern in the genetic structure. The distribution of the genetic variability was higher within (83.64%) populations than among (16.36%) populations of *H. catharinensis*. The pattern in the distribution of genetic variability and the lack of a clear genetic structure observed for *H. catharinensis* are consistent with a process of rapid and recent radiation that has been proposed to explain the diversification of the genus into the South American continent.

Keywords: Adaptative radiation. Endemism. Genetic variability. *Hypochoeris*.

Introdução

Hypochoeris catharinensis é uma espécie brasileira do gênero *Hypochoeris*. O gênero *Hypochoeris* pertence à família *Asteraceae*, tribo *Lactuceae*. A família *Asteraceae* apresenta espécies cosmopolitas com maior ocorrência nas regiões subtropicais e temperadas (Barroso 1991). Entre as tribos da família *Asteraceae*, a tribo *Lactuceae* é a única que apresenta plantas com látex, essa característica ajuda no reconhecimento de espécies do gênero *Hypochoeris* no campo (Bremer 1994).

O gênero *Hypochoeris* ocorre em duas áreas distintas de distribuição, na região Mediterrânea, considerada como o centro primário de dispersão, onde são encontradas aproximadamente 15 espécies, e na América do Sul que, conforme apontam diversos estudos, corresponde ao centro de diversificação, onde são encontradas por volta de 50 espécies do gênero (Bortiri 1999; DeFillips 1976; Stebbins 1971; Samuel et al. 2003).

O surgimento do gênero *Hypochoeris* na América do Sul ocorreu aparentemente a partir da introdução de um único ancestral oriundo do noroeste da África por dispersão à longa distância, entre 0,25 e 3,5 milhões de anos (Samuel et al. 2003). O processo de diversificação do gênero é mais recente, tendo seu início estimado por volta de 0,25 a 1,00 milhão de anos, durante o Pleistoceno (Tremetsberger et al. 2005). Estes dados mostram que o gênero *Hypochoeris* apresentou evolução rápida e recente na América do

sul (Tremetsberger et al. 2005, 2006). Esta forma de radiação intercontinental representa um importante fenômeno evolucionário (Tremetsberger et al. 2005).

Definir a origem do gênero *Hypochaeris* na América do sul é ainda problemático. Recentemente, a espécie *H. angustifolia*, endêmica do Marocco, foi sugerida como co-irmã do grupo de *Hypochaeris* da América do Sul por apresentar número cromossômico básico e assimetria cariotípica igual a das espécies sul-americanas de *Hypochaeris*. Estes dados encontram suporte em estudos utilizando marcadores moleculares AFLP (Tremetsberger et al. 2005; Tremetsberger et al. 2006).

Conhecer os mecanismos de radiação, bem como as características cariotípicas, pode fornecer informações importantes sobre os modos de especiação e os padrões de biogeografia, permitindo inferir a importância dos rearranjos cromossômicos durante a especiação do grupo sul-americano (Stebbins 1971; Cerbah et al. 1995, 1998a, 1998b; Ruas et al. 1995, 2005; Weiss et al. 2003).

No Brasil, o maior número de espécies do gênero *Hypochaeris* ocorre na região sul, principalmente nos estados do Rio Grande do Sul e em Santa Catarina. Dentre estas espécies podemos encontrar a espécie *Hypochaeris catharinensis* Cabr, endêmica do Brasil do Brasil (Cabrera 1963).

Hypochaeris catharinensis é uma espécie herbácea perene que evoluiu de forma endêmica, provavelmente devido às restrições ambientais motivadas por características inerentes e climáticas adversas das regiões do planalto. Esta espécie tem como habitat regiões altas (800 a 1400m) e frias, incluindo áreas abertas e pedregosas de campo, em associação com vegetação arbustiva ou ervas, com predominância de gramíneas.

Devido à ocorrência de *H. catharinensis* ser exclusivamente em solos secos e rasos, seu desenvolvimento resultou em um sistema radicular horizontal, que é bem característico da espécie, e como neste tipo de solo predominam as gramíneas estoloníferas, o sistema foliar de *H. catharinensis* desenvolveu-se em forma de rosetas possibilitando uma incidência luminosa total, favorecendo as funções fotossintéticas (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007). Além de ocorrer em áreas abertas e pedregosas de campo associada à vegetação arbustiva ou herbáceas, com predominância de gramíneas, a espécie *H. catharinensis* ocorre também em florestas abertas com *Araucaria angustifolia*, em barrancos de beira de estrada e em ambientes úmidos (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007) (Figura 1).



Figura 1 – Florestas abertas com *Araucaria angustifolia*, local característico de ocorrência da espécie *H. catharinensis* (A); Flor ligulada com brácteas que ultrapassam pouco ou não ultrapassam as lígulas (B); Folhas rosuladas em forma de rosetas (C). Fontes: Fiorin, FG 2007 (A e B); Reck, M 2008 (C).

Hypochaeris catharinensis começou a ser estudada recentemente e, por isso, informações disponíveis sobre esta espécie se restringem a dados citogenéticos (Fiorin 2008) e de posição filogenética entre as espécies sul-americanas do gênero (dados não publicados). Porém, dados sobre estrutura populacional de *H. catharinensis* são ainda desconhecidos.

Para adicionar informações importantes no estudo de evolução, como conhecer os mecanismos de radiação adaptativa e de especiação do gênero *Hypochaeris* na América do sul, é de fundamental importância conhecer o comportamento das espécies que compreendem o gênero nesse continente.

Marcadores moleculares têm sido empregados com sucesso em estudos de estrutura de populações (Tremetsberger et al. 2003a, 2003b, 2009; Mráz et al. 2007; Ortiz et al. 2007; Terrab et al. 2009) e de filogenia no gênero *Hypochaeris* (Samuel et al. 2003; Stuessy 2003; Tremetsberger et al. 2005, 2006). Dentre os marcadores moleculares, o AFLP tem se mostrado um método bastante eficiente permitindo fazer delimitações entre as espécies sul-americanas de *Hypochaeris* (Stuessy et al. 2003; 2004; Tremetsberger et al. 2006). Visando a contribuir com os estudos do gênero *Hypochaeris*, neste trabalho utilizamos a

técnica de AFLP para conhecer a estrutura genética de populações de *H. catharinensis* coletadas em 11 diferentes localidades da Região Sul do Brasil.

Material e Métodos

Coleta e extração do material vegetal

Para conhecer a estrutura genética nas populações de *H. catharinensis* foram utilizadas 11 populações de *H. catharinensis* sendo uma do estado do Paraná, seis de Santa Catarina e quatro do Rio Grande do Sul (Figura 2). Das 11 populações, foram coletados e armazenados em sílica gel aproximadamente 25 indivíduos de cada. Amostras de alguns indivíduos foram adicionadas à coleção no Herbário da Universidade Estadual de Londrina (FUEL) (Tabela 1). O DNA total foi extraído das folhas secas de *H. catharinensis* com nitrogênio líquido utilizando o protocolo de Doyle e Doyle (1987) com modificações (Tremetsberger et al. 2003b) utilizando CTAB 2 % (brometo de cetil trimetil amônio). A qualidade do DNA total obtido foi verificado em gel de agarose 1%.

Tabela 1 – Informações sobre os pontos de coleta de *H. catharinensis* na região sul do Brasil, bem como número de indivíduos por população (N), número de coleta e de coleção e respectivos coletores (Col.).

Siglas Pop.	Localização	N	Coordenadas geográficas
BJ	Caminho de terra entre São Joaquim e Bom Jesus (RS) (Bosque de Araucárias). CR, PR, EU - 359/08	25	28° 27' 45'' S 50° 03' 17'' O
BR	Rota Bom Retiro (SC), antes de Águas Brancas. CR, PR, EU - 354/08 (FUEL40656)	25	27° 49' 51'' S 49° 34' 11'' O
BS	A 2km de Bom Jardim da Serra (SC). CR, PR, EU - 356/08	25	28° 18' 42'' S 49° 42' 44'' O
CB	5 km de Cambará do Sul (RS). CR,PR, NM, MO - 28/06 (FUEL42237)	25	29° 2' 52'' S 50° 8' 41'' O
IR	R 280, Entrada de Irineópolis (SC). EU - 363/08	25	26° 16' 3,5'' S 50° 44' 8,5'' O
MC	Estrada em direção a Monte Alegre dos Campos (SC). CR, PR, EU - 361/08 (FUEL 44)	25	28° 06' 05'' S 50° 44' 42'' O
MN	Alto do Pico Monte Negro – São José dos Ausentes (RS). CR,PR, NM, MO - 19/06 (FUEL42239)	25	28° 37' 06'' S 49° 48' 04'' O
PA	R280 passando o cruzamento com R153 antes de Palmas (PR). EU - 365/08	24	26° 34' 00'' S 51° 30' 00'' O
RQ	Rancho Queimado (SC). CR, PR, TN - 04/07	25	27° 40' 21'' S 49° 01' 18'' O
SA	São José dos Ausentes, próximo ao Hotel Vale das Trutas (RS). CR,PR, NM, MO - 18/06 (FUEL42228)	24	28° 44' 54'' S 50° 03' 57'' O
SJ	São Joaquim, entrada da cidade, pradaria pedregosa (SC). CR, PR, TN - 10/07 (FUEL40655)	25	28° 17' 38'' S 49° 56' 54'' O

Abbreviations of collectors: CR, C.F. Ruas; EU, E. Urtubey; MO, M. A. Ortiz; NM, N.I. Matzenbacher; PR, P. M. Ruas; TN, T. J. Nakayama. FUEL – Herbário da Universidade Estadual de Londrina.

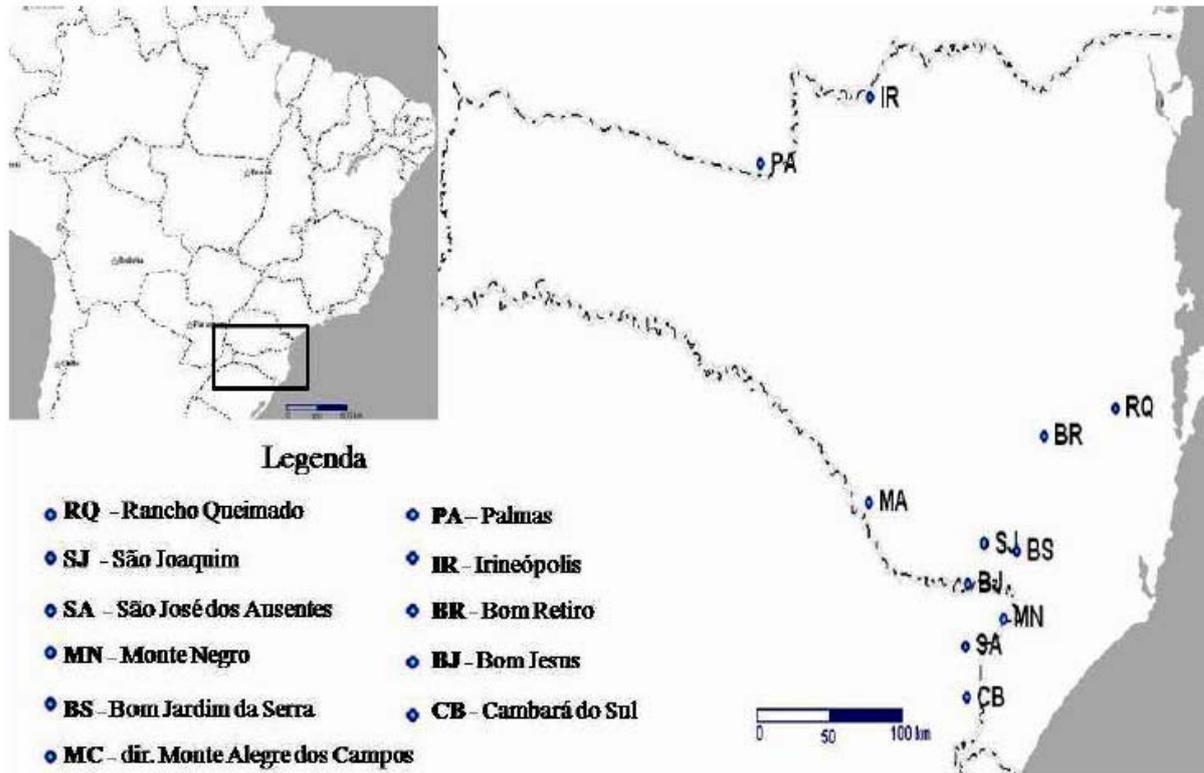


Figura 2 – Mapa representativo das 11 áreas de coleta de *H. catharinensis* situadas nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Brasil.

Ensaio de AFLP

Os ensaios de AFLP foram realizados com base no protocolo de Vos et al. (1995). Para cada amostra, aproximadamente 1000 ng de DNA foram utilizados para a reação de restrição do DNA com 5U de EcoRI (Fermentas), 5U de MseI (NEB) em um volume total de 20 μ L de reação. Essa reação de restrição foi incubada a 37°C por 16h para uma completa digestão do DNA total. Adaptadores para as extremidades geradas pelas enzimas EcoRI e MseI foram ligados ao produto da restrição por incubação com T4 DNA ligase 1U (Fermentas) a 37°C por 3:00h seguido de 30 min a 17°C e 10 min a 70°C (Vos et al. 1995). A amplificação pré-seletiva foi feita com 4,5 μ L GoTaq® Green Master mix (Promega) 0,58 μ L do primer pré-seletivo o qual possui um nucleotídeo arbitrário para cada primer: Eco+A e Mse+C e 3,0 μ L do produto da ligação (diluído 4 x em água estéril), foi utilizado água esteril para completar o volume de 10 μ L de reação. O programa de PCR da amplificação pré-seletiva consiste em 1 ciclo de 72 °C por 2 min, seguido por 20 ciclos de 90 °C por 1 sec, 56 °C por 30 sec e 72 °C por 2 min e um ciclo final de 60 °C por 30 min. Para amplificação seletiva, foi utilizado 3,5 μ L de GoTaq® Green Master mix (Promega), 0,54 μ L (5 pmol) de cada primer seletivo EcoRI e MseI e 2,5 μ L do produto da pré-amplificação diluída (4 x em

água estéril) e água esteril para completar o volume da reação para 10 µL. A PCR seletiva foi realizada nas seguintes condições um ciclo inicial de 94 °C por 2 min, 65 °C por 30 sec e 72 °C por 2 min; 8 ciclos de 94 °C por 1 sec, 64 °C por 30 sec e 72 °C por 2 min; 23 ciclos de 94 °C por 1 min, 56 °C por 30 sec e 72 °C por 2 min, e uma extensão final de 60 °C por 30 min.

Para a amplificação seletiva, foram utilizados primers com dois a três nucleotídeos adicionais. A seleção dos primers a serem utilizados no estudo de populações foi realizada a partir de um teste feito com três amostras utilizando nove diferentes combinações de primers EcoRI/MseI. Com base no número, polimorfismo e qualidade dos fragmentos gerados foram selecionados os seis melhores primers para aplicar no estudo de populações. O produto da amplificação seletiva foi separado em gel de poliacrilamida (acrilamida 29:1 bis-acrilamida) a 7% com eletroforese vertical conduzida a 200 volts por 3h e 20min, corado com nitrato de prata 20% e fotografado usando câmera digital. Para o controle da repetibilidade dos ensaios de AFLP, foram adicionadas em todas as reações duas amostras controles.

Análise dos dados de AFLP

Fragmentos de AFLP com tamanhos entre 50 e 700 bp foram analisados e usados para gerar uma matriz binária de presença (1) e ausência (0) de fragmentos. Esta matriz foi importada para o programa dBoot ver. 1.1 para verificar a confiabilidade dos dados usando o coeficiente de variação (Coelho 2001b). A porcentagem de locos polimórficos, a diversidade gênica de Nei (1973) e a distância genética Nei (1978) foram calculadas para as 11 populações utilizando o programa POPGENE 1.31 (Yeh et al. 2000). Para verificar a existência de correlação entre a distância genética e geográfica, foi utilizado o teste de Mantel (Manly 1997), realizado pelo programa TFPGA (“Tools For Population Genetics Analyses”) versão 1.3 (Miller 1997) onde foram comparadas as matrizes de distâncias genéticas e de distância geográfica. A variação da variabilidade genética total entre e dentro de populações bem como o índice de fixação alélica (FST) foram verificados utilizando a análise de variância molecular (AMOVA) conduzida no programa Arlequin v. 3.11 (Excoffier et al. 2005). A análise da coordenada principal foi utilizada para avaliar a distribuição da distância genética através do programa FAMD (“Fingerprint Analysis with Missing Data”) (Schluter 2006).

Resultados e Discussão

O gênero *Hypochoeris* representa um importante modelo para estudos genéticos e evolutivos, devido a processos rápidos e recentes de radiação adaptativa e diversificação no continente sul-americano, onde muitas das aproximadamente 50 espécies ainda não foram estudadas. Este é o primeiro estudo realizado com a espécie *H. catharinensis*, endêmica do Sul do Brasil. Seis combinações de primers de AFLP foram usadas em 275 indivíduos, provenientes de 11 populações de *H. catharinensis*, para avaliar a estrutura genética desta espécie. De um total de 183 fragmentos produzidos, 165 (90,16 %) foram polimórficos (Tabela 2). Marcadores AFLP tem sido amplamente utilizados em estudos do gênero *Hypochoeris* tanto para delimitação das espécies como para definir as posições filogenéticas entre grupos de espécies (Stuessy et al. 2003; 2004; Tremetsberger et al. 2006). Da mesma forma, marcadores AFLP aplicados em estudos que buscam conhecer a estrutura genética de populações de diferentes espécies de *Hypochoeris* (Tremetsberger et al. 2003a, 2003b, 2004, 2009; Mráz et al. 2007; Ortiz et al. 2007; Terrab et al. 2009) tem ajudado a compreender os processos biogeográficos e evolutivos do gênero *Hypochoeris*.

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

Combinação de <i>primers</i>	Número de fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos (%)
<i>EcoRI-AGC/MseI-CAG</i>	35	97,14
<i>EcoRI-AGC/MseI-CTCG</i>	30	86,66
<i>EcoRI-ACG/MseI-CTC</i>	27	88,88
<i>EcoRI-ACG/MseI-CAT</i>	25	84
<i>EcoRI-ACT/MseI-CAG</i>	36	88,88
<i>EcoRI-ATC/MseI-CTCG</i>	30	93,33
Média	30,5	89,81

O coeficiente de variação, aplicado ao número total de fragmentos de AFLP, apresentou valor próximo a 2,5%, demonstrando que a quantidade de marcadores foi suficientemente abrangente, gerando um bom nível de confiabilidade nos dados obtidos (Figura 3).

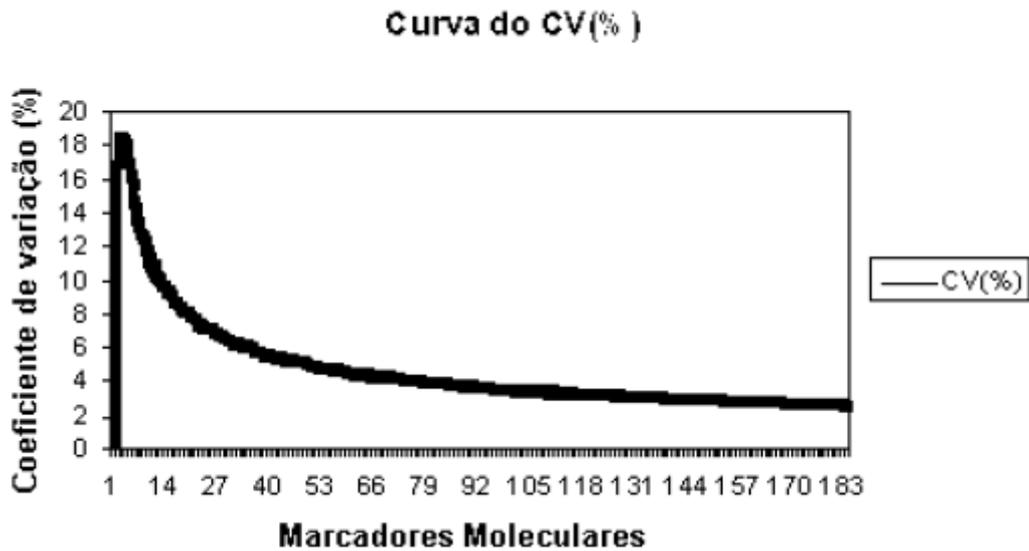


Figura 3 – Coeficiente de variação por número de marcadores moleculares amplificados em 11 populações de *H. catharinensis*.

A porcentagem de locos polimórficos permite estimar a frequência dos alelos na população e é um dos parâmetros utilizados para estimar a diversidade genética intrapopulacional. Em *H. catharinensis* a porcentagem de locos polimórficos variou de 43,72%, na população de Irineópolis (norte de Santa Catarina), a 71,04%, na população de São Joaquim, região serrana do mesmo estado (Tabela 3). Diferentes porcentagens de locos polimórficos tem sido encontradas, a partir de estudos de AFLP, em várias outras espécies de *Hypochoeris*. Por exemplo, na espécie do sudeste dos Andes *H. acaulis* (Tremetsberger et al. 2003a), a porcentagem de locos polimórficos não ultrapassou 24%, e variou de 8,2 a 23,6% e de 0,7 a 20,7% em outras duas espécies andinas *H. incana* (Tremetsberger et al. 2009) e *H. palustris* (Muellner et al. 2005), respectivamente. Essas diferenças podem estar relacionadas com características dos refúgios, que possibilitaram a sobrevivência de poucos indivíduos destas espécies andinas de *Hypochoeris* durante as mudanças ambientais extremas ocorridas na última glaciação. Por outro lado, em estudos realizados com *H. lutea* (comunicação pessoal), outra espécie brasileira de *Hypochoeris*, a porcentagem de locos polimórficos variou de 83,42 a 91,66%, sugerindo que as populações desta espécie, assim como de *H. catharinensis*, não passaram por processos evolutivos extremos.

Tabela 3 – Porcentagem de loci polimórficos (Pp) e diversidade gênica (H_S) de Nei (1973) em 273 indivíduos de 11 populações de *H. catharinensis* na região Sul do Brasil, obtidos com base em marcadores AFLP.

População	Pp	H _S
São Joaquim (SJ)	71,04	0,1937
Bom Jesus (BJ)	67,76	0,1965
Bom Retiro (BR)	63,39	0,2071
Bom Jardim da Serra (BS)	59,02	0,2124
Palmas (PA)	58,47	0,2018
Cambará do Sul (CB)	57,38	0,2046
São José dos Ausentes (SA)	54,10	0,2050
Monte Alegre dos Campos (MC)	52,46	0,2049
Rancho Queimado (RQ)	49,73	0,1975
Pico do Monte Negro (MN)	48,63	0,2059
Irineópolis (IR)	43,72	0,1983
Média	56,88	0,2025

Os índices de diversidade gênica (H_S) de Nei (1973) apontam para a diversidade contida dentro de cada população. Segundo Cornuet e Luikart (1996) e Piry et al. (1999), esse parâmetro pode ser influenciado pelo tamanho efetivo das populações, cuja redução poderia igualmente reduzir o índice de diversidade gênica. Em *H. catharinensis* os índices de diversidade gênica não foram muito diferentes entre as 11 populações, variando de 0,1937, na população de São Joaquim, SC a 0,2124, na população de Bom Jardim da Serra, RS (Tabela 3). *Hypochaeris catharinensis* apresenta índices de diversidade gênica considerados altos, sendo estes valores inferiores somente àqueles encontrados para *H. lutea*, onde os índices de diversidade gênica variaram de 0,2588 a 0,3442 (comunicação pessoal). Em estudos realizados com populações de outras espécies do gênero *Hypochaeris*, os índices de diversidade gênica variaram de 0,002 a 0,056 na espécie sul-americana *H. acaulis* (Tremetsberger et al. 2003a), de 0,001 a 0,15 em *H. angustifolia*, espécie marroquina co-irmã do grupo sul-americano (Terrab et al. 2009) e de 0,0426 a 0,1675 na espécie européia *H. salzmanianna* (Ortiz et al. 2007).

A combinação entre uma alta porcentagem de locos polimórficos e um alto grau de diversidade gênica sugere que *H. catharinensis*, assim como *H. lutea* (dados não publicados), não deve ter passado por nenhum processo que tenha afetado o tamanho efetivo de suas populações, ou que esse tenha sido recuperado ao longo do tempo. As características morfológicas de *H. catharinensis* como pápus plumosos e altura de 15,5 a 33 cm (Azevêdo-Gonçalves and Matzenbacher 2007) favorecem a dispersão de sementes a longa distância,

favorecendo o fluxo gênico e auxiliando na recuperação da diversidade genética dessa espécie. Em estudos realizados com *H. incana*, uma espécie que sofreu grande influência do acúmulo de gelo e formação de refúgios durante o período de glaciação, verificou-se que uma de suas populações, localizadas em Tierra del Fuego, foi capaz de recuperar a variabilidade genética, através do aumento de fluxo gênico quando o clima tornou-se mais quente e úmido após o Pleistoceno (Tremetsberger et al. 2009). Característica diferente é verificada em *H. acaullis* (Tremetsberger et al. 2003a) onde, apesar dos pápus plumosos, o pequeno porte (menor que 2 cm) das plantas dessa espécie dificulta o fluxo gênico, diminuindo as chances de recuperação da diversidade intrapopulacional na espécie.

Comparando a variabilidade entre as populações, obtidas a partir da distância genética de Nei (1978), a menor distância genética observada foi de 3,57% entre as populações de Cambará do Sul (CB) e Bom Jesus (BJ). A maior distância genética (7,83%) foi verificada entre as populações de Rancho Queimado (RQ) e Irineópolis (IR) as quais, além de serem as mais distantes geneticamente, também apresentam maior distância genética quando comparadas com as demais populações (Tabela 4). A população de Palmas, única representante do estado do Paraná, apresenta-se próxima das populações do Rio Grande do Sul, Bom Jesus e Cambará do Sul, indicando que não há correlação entre distância genética/geográfica entre as populações de *H. catharinensis* investigadas.

Tabela 4 – Distância genética de Nei (1978) abaixo da diagonal e distância geográfica (Km) acima da diagonal em 11 populações de *H. catharinensis* obtidos com base em marcadores AFLP.

Populações	RQ	SJ	SA	MN	BS	PA	MC	IR	BR	BJ	CB
RQ	****	112	157	130	98	275	177	180	57	229	188
SJ	0.0481	****	53	39	21	245	82	222	61	23	87
SA	0.0559	0.0516	****	30	59	280	98	274	112	32	34
MN	0.0552	0.0630	0.0444	****	36	282	109	261	91	30	58
BS	0.0768	0.0553	0.0622	0.0483	****	263	104	226	55	37	92
PA	0.0585	0.0618	0.0506	0.0499	0.0452	****	185	157	236	253	304
MC	0.0629	0.0524	0.0631	0.0589	0.0579	0.0414	****	216	120	79	119
IR	0.0783	0.0728	0.0677	0.0714	0.0700	0.0634	0.0461	****	176	242	305
BR	0.0744	0.0688	0.0700	0.0650	0.0613	0.0495	0.0424	0.0710	****	85	146
BJ	0.0655	0.0612	0.0513	0.0514	0.0431	0.0371	0.0427	0.0585	0.0387	****	66
CB	0.0708	0.0706	0.0530	0.0586	0.0554	0.0383	0.0373	0.0531	0.0438	0.0357	****

Abreviaturas: RQ -Rancho Queimado, SC; SJ -São Joaquim, SC; SA -São José dos Ausentes, RS; MN -Pico do Monte Negro, RS; BS -Bom Jardim da Serra, SC; PA -Palmas, PR; MC - Direção a Monte Alegre dos Campos, SC; IR -Irineópolis, SC; BR -Bom Retiro, SC; BJ - Direção a Bom Jesus, RS; CB - Cambará do Sul, RS.

A falta de correlação entre distância geográfica (Km) e distância genética nas populações foi confirmada pelo teste de Mantel ($r = -0,2946$; $P > 0,05$). Essa falta de

correlação entre distância genética/geográfica também foi verificada na espécie sul-americana *H. lutea* (dados não publicados). Esse resultado sugere que *H. catharinensis* não obedece a um claro padrão de isolamento por distância, ao contrário do verificado na espécie sul-americana *H. acaulis* estudada por Tremetsberger (2003a).

As espécies sul-americanas de *Hypochaeris* são relativamente jovens. Conforme verificado recentemente em trabalhos de filogenia molecular em espécies de *Hypochaeris* da América do Sul que, a delimitação de espécies dentro de grupos nem sempre pode ser dada com alto suporte (Samuel et al. 2003; Stuessy 2003; Tremetsberger et al. 2005, 2006). Um fator que comprova que as espécies sul-americanas de *Hypochaeris* ainda não estão completamente isoladas é o alto índice de hibridação verificado entre as diferentes espécies (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007). Este alto índice de hibridação previamente reportado foi confirmado por estudos com marcadores moleculares AFLP (Tremetsberger et al. 2006).

O processo recente de radiação adaptativa seguida de especiação do gênero neste continente sugere que não houve ainda tempo suficiente para uma maior diferenciação entre as espécies. Obviamente o pouco tempo de divergência também tem influência na estrutura das populações como visto em *H. catharinensis*. Em espécies sul-americanas de *Hypochaeris* que sofreram influência de períodos de glaciação, como *H. acaulis*, o isolamento de populações sobreviventes em refúgios, favoreceu a diferenciação entre populações (Tremetsberger et al. 2003a).

Os valores de distância genética observados entre as populações de *H. catharinensis*, são relativamente baixos. Uma hipótese para isso é que, ao contrário do observado em *H. acaulis*, nenhum fator seletivo extremo parece ter levado a um isolamento de suas populações, mesmo quando se compara populações distantes em até 305 Km. Além disso, assim como as populações da espécie *H. incana* (Tierra del Fuego; Tremetsberger et al. 2009) e de *H. tenuifolia* (Tremetsberger et al. 2003b), possivelmente as populações de *H. catharinensis* mantêm altos níveis de fluxo gênico através da dispersão de sementes a longa distância, o que favorece a baixa diferenciação entre as populações dessa espécie.

A análise de variância para dados moleculares (AMOVA) mostra que a maior parte (83,64%) da variação genética na espécie *H. catharinensis* se encontra dentro das populações, comparada com a variação entre populações (16,36%) (Tabela 5). Padrão similar de distribuição da variabilidade foi encontrado em *H. lutea* (80,66% dentro e 19,34% entre populações) e na espécie sul-americana *H. tenuifolia* que mostrou maior variação dentro (69,11%) do que entre populações (30,89%) (Tremetsberger et al. 2003b). Em

Senecio gallicus, outro membro da família *Asteraceae*, também foi observado esse padrão de variação, sendo encontrado 66,09% da variabilidade dentro e 33,91% entre populações (Comes e Abbott 2000).

Tabela 5 – Análise de variância para dados moleculares (AMOVA) em 11 populações de *H. catharinensis*.

Fonte de variação	G. L.	Soma de quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação
Entre populações	10	926.541	3.09553	16.36**
Dentro de populações	262	4.147.598	15.83053	83.64
Total	272	5.074.139	1.892.606	
Índice de Fixação	F_{ST} :	0.163	56	

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

A diversidade genética dentro e entre populações é resultado de eventos históricos e de processos evolutivos recentes (Lee et al. 2002), como observado no gênero *Hypochaeris*. Desta forma, a ocorrência de menor variabilidade entre as populações de *H. catharinensis* pode ser resultado de a sua evolução recente e pelas características endêmicas (Cabrera 1963; Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007) e de distribuição desta espécie, bem como pela sua forma de reprodução.

De acordo com Hamrick e Godt (1996), a distribuição geográfica é um dos principais fatores correlacionados com a variabilidade genética de populações de plantas. Espécies vegetais com distribuição geográfica restrita tendem a ter níveis mais baixos de variação genética (Gitzendanner e Soltis 2000). Da mesma forma, espécies endêmicas, habitantes de áreas com pouca heterogeneidade ambiental, têm menores níveis de variação entre suas populações por estarem adaptadas a um nicho de distribuição geográfica restrita (Gitzendanner e Soltis 2000; Cavalli e Winge 2003). Os locais, tipo de solo e relevo onde as 11 populações de *H. catharinensis* foram coletadas apresentam pouca variação (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007). Na sua maioria, são representados por Planaltos de Araucárias e solos resultantes do intemperismo do basalto onde predomina o Cambissolo Húmico Alumínico, com textura muito argilosa, sendo que em alguns pontos também ocorre o Nitossolo Háptico (Almeida 2009).

O fluxo gênico entre populações é outro fator que contribui significativamente para o padrão de distribuição da variabilidade genética em populações de plantas. Segundo Slatkin (1994), se a ocorrência de fluxo é alta, as populações evoluem de

forma conjunta, tornando-se mais similares. A capacidade das populações de realizar fluxo gênico reduz as diferenças causadas por deriva genética e seleção, reduzindo a diversidade genética entre populações (Kageyama et al. 2003). As espécies de *Hypochoeris* apresentam como uma de suas características, sementes plumosas que podem ser dispersas pelo vento (Soons et al. 2004), facilitando o fluxo gênico. A dispersão pode também ocorrer pela aderência das sementes de *Hypochoeris* em animais, como sugerido nos estudos de Terrab (2009), onde o fluxo gênico entre populações foi explicado pela atividade local de pastoreio. Populações que apresentam dispersão de sementes pelo vento e por ingestão ou aderência em animais, em regra, mantêm níveis de variação menor entre do que dentro delas (Cavalli e Winge 2003).

Embora a maior parte da variabilidade em *H. catharinensis* esteja distribuída dentro de populações, é possível também verificar um bom nível de diferenciação entre populações. Segundo Yeh (2000) os valores de F_{ST} são definidos como: $< 0,050$ = nível baixo de diferenciação genética, de $0,051$ a $0,150$ = nível médio e de $0,151$ a $0,250$ = nível alto de diferenciação genética. As populações de *H. catharinensis* estão próximas ao limite entre moderada e alta ($F_{ST} = 0,163$) de diferenciação genética.

Não existem ainda dados sobre o sistema de cruzamento de *H. catharinensis*. Porém, a distribuição de variabilidade verificada nas populações desta espécie está de acordo com o esperado para espécies de fecundação cruzada (alógama) ou de sistema misto, onde predomina a alogamia, com eficiente mecanismo de dispersão de pólen e sementes (Kageyama et al. 2003). Por apresentar mecanismos de dispersão pelo vento, o sistema de reprodução por fecundação cruzada pode ser favorecido no gênero *Hypochoeris*. Em *H. tenuifolia*, espécie alógama sul-americana de *Hypochoeris*, o maior grau de variabilidade foi verificado dentro de populações (Tremetsberger et al. 2003b). Outra característica presente que favorece o sistema de fecundação cruzada é a ocorrência de auto-incompatibilidade esporofítica que já foi verificada em mais de 40 gêneros da família *Asteraceae* (Charlesworth 1985) incluindo o gênero *Hypochoeris*, onde foi documentada para as espécies *H. radicata* (Parker 1975) e *H. maculata* (Wells 1976). Porém no gênero *Hypochoeris* também são verificadas espécies que se reproduzem por autogamia, como verificado em *H. acaullis* (Tremetsberger et al. 2003a), e pelo sistema misto de cruzamento, como em *H. palustris* (Muellner et al. 2005).

As comparações par-a-par de F_{ST} (Tabela 6) apresentaram valores mais altos de distância quando comparados às distâncias genéticas de Nei (1978), contudo, as populações mais próximas (Cambará do Sul -CB e Bom Jesus -BJ) e as mais distantes

geneticamente (Rancho Queimado -RQ e Irineópolis -IR) permaneceram as mesmas para as duas estimativas.

A análise da coordenada principal demonstrou que algumas populações de *H. catharinensis* não apresentam estruturação genética clara. Porém, em outras populações como a de Rancho Queimado (RQ), São Joaquim (SJ) e Irineópolis (IR), um início de estruturação pode ser verificado (Figura 4).

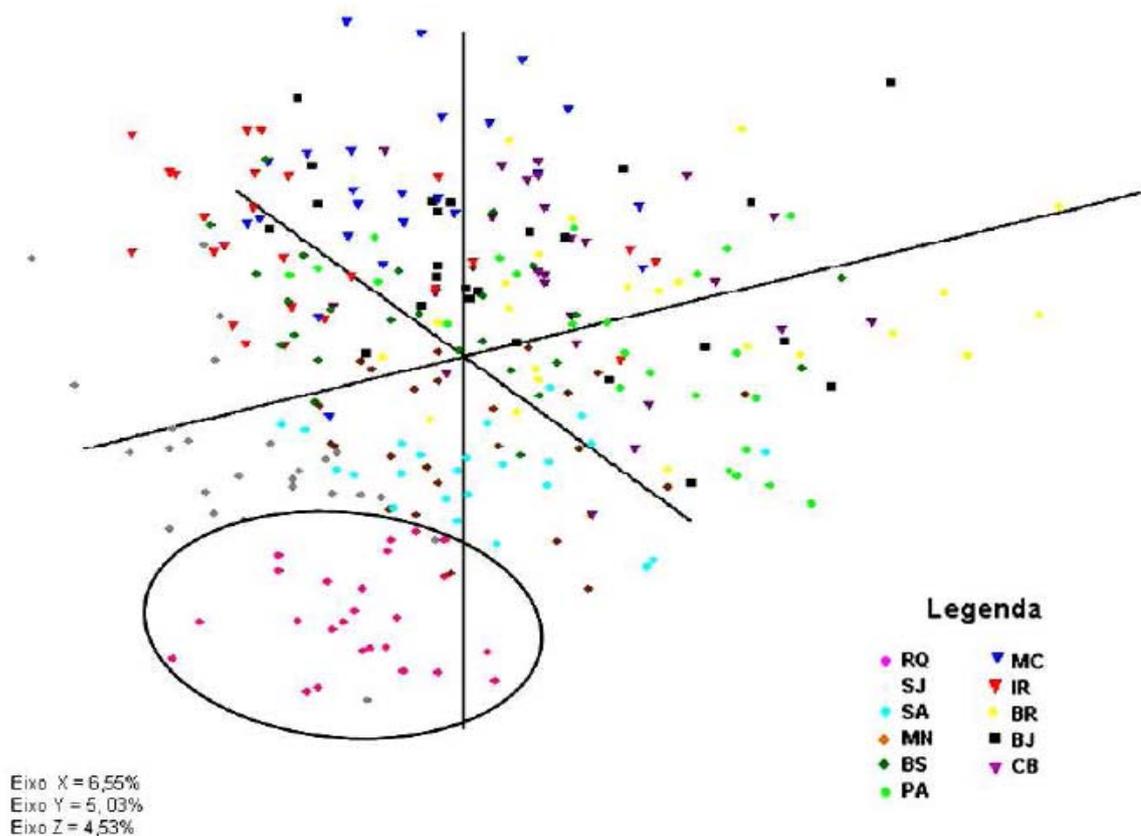


Figura 4 – Análise da coordenada principal de cinco populações de *H. catharinensis* da região sul do Brasil. RQ -Rancho Queimado, SC; SJ -São Joaquim, SC; SA -São José dos Ausentes, RS; MN -Pico do Monte Negro, RS; BS -Bom Jardim da Serra, SC; PA -Palmas, PR; MC - Direção a Monte Alegre dos Campos, SC; IR -Irineópolis, SC; BR -Bom Retiro, SC; BJ - Direção a Bom Jesus, RS; CB - Cambará do Sul, RS.

Tabela 6 – Valores de distância genética do FST par-a-par em 11 populações de *H. catharinensis* obtidos com base em marcadores AFLP.

Populações	RQ	SJ	SA	MN	BS	PA	MC	IR	BR	BJ	CB
RQ	0,000										
SJ	0,163	0,000									
SA	0,219	0,162	0,000								
MN	0,231	0,157	0,129	0,000							
BS	0,237	0,124	0,158	0,132	0,000						
PA	0,222	0,167	0,152	0,167	0,108	0,000					
MC	0,235	0,152	0,211	0,192	0,166	0,155	0,000				
IR	0,269	0,167	0,204	0,223	0,173	0,178	0,136	0,000			
BR	0,224	0,159	0,177	0,166	0,137	0,135	0,135	0,197	0,000		
BJ	0,221	0,144	0,153	0,142	0,093	0,102	0,127	0,138	0,097	0,000	
CB	0,207	0,177	0,170	0,176	0,135	0,111	0,123	0,156	0,122	0,079	0,000

A ausência de um padrão claro de estruturação genética verificada em *H. catharinensis* foi também encontrada em estudos com a espécie *H. lutea* (dados não publicados). Essas duas espécies, por não apresentarem muita diferenciação entre suas populações e conseqüentemente pouca estruturação genética, diferenciam-se das demais espécies sul-americanas já estudadas (*H. acaulis*: Tremetsberger et al. 2003b; *H. palustris*: Muellner et al. 2005). Algumas possíveis explicações que podem ser consideradas em relação às diferenças observadas entre *H. catharinensis* e as outras espécies sul-americanas já investigadas (exceto *H. lutea*) incluem. Primeiro, *H. catharinensis* não sofreu com as alterações significativas, devido as flutuações climáticas das últimas glaciações no Pleistoceno, as quais influenciaram na diferenciação e estruturação das demais espécies sul-americanas; segundo, as populações de *H. catharinensis* sofreram influências fracas desses períodos mas, após as glaciações, passaram por períodos de recuperação devido a um aumento do fluxo gênico; terceira, os eventos de especiação que deram origem a *H. catharinensis* são muito recentes, tendo ocorrido após o período de glaciações, e portanto, não houve ainda tempo suficiente para a diversificação de suas populações.

Nossos resultados mostram que as populações de *H. catharinensis* apresentam um bom nível de variabilidade genética e que a maior parte desta variação (83,64%) esta contida entre indivíduos dentro de populações. Esta variação intrapopulacional é muito superior àquelas encontradas em outras espécies sul-americanas de *Hypochaeris* (Tremetsberger et al. 2003b; 2003a; Muellner et al. 2005) sendo inclusive superior ao valor (80,66%) encontrado na espécie *H. lutea* (dados não publicados).

Entre as espécies sul-americanas de *Hypochaeris*, *H. lutea* é a que tem mostrado características de distribuição da variabilidade e estruturação genéticas mais

parecidas com as de *H. catharinensis*. Da mesma forma, as duas espécies estão distribuídas em ambientes com características semelhantes, em relação à altitude e temperatura, com ambas ocorrendo em regiões altas e frias. Estudos filogenéticos e cariotípicos recentes (dados não publicados) mostram também uma estreita relação entre *H. catharinensis* e *H. lutea*. Entretanto, *H. catharinensis* ocorre normalmente em ambientes pedregosos enquanto *H. lutea* esta restrita a solos encharcados. Diferenças morfológicas marcantes são também evidentes entre as duas espécies. *Hypochaeris catharinensis* tem rizoma horizontal, flores liguladas de tamanho variável, que podem ultrapassar as brácteas, e folhas arredondadas em forma de rosetas. *Hypochaeris lutea* desenvolve raiz fasciculada, flores liguladas maiores que as brácteas e folhas alongadas com formato semelhante ao de gramíneas (Azevêdo-Gonçalves e Matzenbacher 2007).

Os estudos realizados com *H. catharinensis* não possibilitaram a definição de um padrão claro de estruturação genética para todas as populações desta espécie. Possivelmente, as características de distribuição endêmica e restrita, bem como, o tempo relativamente recente de divergência não contribuíram para uma diferenciação suficiente para o isolamento das populações.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq e ao Austrian Science Foundation (FWF projetos P15225-BIO e P18446-BO3 para T.F. Stuessy) pelo suporte financeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES pela concessão de bolsas às alunas de mestrado Maikel Reck e Luana Alves Rodrigues.

REFERÊNCIAS

- Almeida J A (2009) Fatores Abióticos. In: Boldrini II Biodiversidade dos Campos do Planalto das Araucárias. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas. 19-38.
- Azevêdo-Gonçalves C F, Matzenbacher N I (2007) O Gênero *Hypochoeris* L. (*Asteraceae*) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia. Ser. Bot.* 62: 55-87.
- Barroso G M (1991) Sistemática de Angiosperma no Brasil. Subclasse VI: Asteridae, V. F, Viçosa, v.3, p 326.
- Bortiri E (1999) *Asteraceae*, parte 14. Tribu XIII. Lactuceae. In: *Hypochoeris*. Flora Fanerogâmica Argentina. v. 63, pp 1-25.
- Bremer K (1994) *Asteraceae – Cladistics & Classification*. Timber Press, Portland, pp752.
- Cabrera A L (1963) Estudios sobre o gênero *Hypochoeris*. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, v. 10, n. 2-3, p. 166- 195.
- Cavalli S S e Winge H (2003) Variabilidade genética em populações naturais. In: Freitas L B, Bered F (org.) *Genética e Evolução Vegetal*. Ed. UFRGS, Porto Alegre, pp165-175.
- Cerbah M, Coulaud J, Godelle B, Siljak-Yakovlev S (1995) Genome size, fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. *Genome* 38:689–695.
- Cerbah M, Coulaud J, Siljak-Yakovlev S (1998a) rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochoeris* (*Asteraceae*). *J. Heredity* 89: 312–318.
- Cerbah M, Souza-Chies T, Jibier M F, Lejeune B, Siljak-Yakovlev S (1998b) Molecular phylogeny of the genus *Hypochoeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution. *Molec. Biol. Evol.* 15:345–354.
- Charlesworth D (1985) Distribution of dioecy and self-incompatibility in angiosperms. In Greenwoog PJ, Harvey PH, Slatkin M (ed) *Evolution: essays in honor of John Maynard Smith*, Cambridge University Press, Cambridge, pp 237–268
- Coelho A S G (2001b) Software: BOOD Versão 2.0 Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de

bootstrap, Versão 3.0. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiana

- Comes H P, Abbott R J (2000) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and quantitative trait analyses across a major phylogeographical break in the Mediterranean ragwort *Senecio gallicus* Vill. (*Asteraceae*). *Mol. Ecol.* 9:61-76.
- Cornuet J M e Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144(4): 2001-2014.
- Defillips R A (1976) *Hypochoeris*. In: Tutin T G, Heywood V H, Burges N A, Moore D M, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, (ed). *Flora Europaea*, Cambridge University Press, Cambridge, 4:308-310.
- Doyle J J e Doyle J L (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 1:47-50.
- Fiorin F G (2008) Estrutura Cariotípica de Duas Espécies de *Hypochoeris* (*H. catharinensis* e *H. lutea*), *Asteraceae* Endêmicas do Sul do Brasil. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina. Gitzendanner MA, Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Amer. J. Bot.* 87:783-792.
- Hamrick J L, Godt M J W (1996) Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise J C, Hamrick J L, eds. *Conservation genetics. Case histories from nature*. New York: Chapman & Hall. 281-304.
- Lee S L, Ng K K S, Saw L G, Norwati A, Salwana M H S, Lee C T (2002) Norwati, M. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virgin Jungle Reserves in Peninsular Malaysia. *Am. J. Bot.* 89:447-459.
- Kageyama P Y, Sebbenn A M, Ribas L A, Gandara F B (2003) Castellen, M., Percim, M. B., Vencovsky, R. Diversidade genética em espécies tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Sci. For.* 64:93-107.
- Manly B F J (1997) *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology*. London.
- Mráz P, Gaudeul M, Rioux D, Gielly L, Choler P, Taberlet PE (2007) Intra-biodiversity Consortium. Genetic structure of *Hypochoeris uniflora* (*Asteraceae*) suggests vicariance

in the Carpathians and rapid post-glacial colonization of the Alps from an eastern Alpine refugium. *J. Biogeogr.* 34: 2100-2114.

Miller M P (1997) Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), Version 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population data. Computer software distributed by author.

Muellner A N, Tremetsberger K, Stuessy T, Baeza CM (2005) Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochoeris palustris* (*Asteraceae*, *Lactuceae*). *Mol. Ecol.* 14:203–212.

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(12):3321-3323.

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

Ortiz M A, Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy T F, Garcia-Castano J L (2007) Population structure of *Hypochoeris salzmanniana* DC. (*Asteraceae*), an endemic species to the Atlantic coast on both sides of the Strait of Gibraltar, in relation to Quaternary sea level changes. *Mol. Ecol.* 16:541–552.

Parker J (1975) Aneuploidy and isolation in two *Hypochoeris* species. *Chromosoma* 52: 89–101. 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.

Ruas C F, Ruas P M, Metzenbacher N I, Ross G, Bernini C, Vanzela A L L (1995) Cytogenetic studies of some *Hypochoeris* species (*Compositae*) from Brasil. *Amer. J. Bot.* 82:369–375.

Ruas C F, Vanzela A L L, Santos M O, Fregonezi J N, Ruas P M, Matzenbacher N, Aguiar-Perecin MLR (2005) Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochoeris* species (*Asteraceae*) from Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 28:129-13.

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

Schluter P M, Harris S A (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes.* 6:569-572.

- Slatkin M (1994) Gene flow and population structure. En: Ecological Genetics (ed Real LA). Pp. 3-18. Princeton University Press.
- Soons M B, Heil G W, Nathan R, Katul G G (2004) Determinants of long-distance seed dispersal by wind in grasslands. *Ecology* 85:3056–3068.
- Stebbins GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, London.
- Stuessy T F, Tremetsberger K, Mullner A N, Jankowicz J, Guo Y-P, Baeza C M, Samuel R M. (2003) The melding of systematics and biogeography through investigations at the populational level: examples from the genus *Hypochaeris* (Asteraceae). *Basic. Appl. Ecol.* 4:287–296.
- Stuessy T, Tremetsberger K, Samuel R, Jankowicz J, Guo Y-P, Muellner AN (2004) Baeza, C.M. Phylogenetic relationships among South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae) based on AFLP data. In: Schaal B A, Chiang T Y, Chou C H (eds) Plant evolutionary genetics and the biology of weeds. Chi-Chi: Endemic Species Research Institute. pp. 23–39.
- Terrab A, Ortiz M A, Talavera M, Ariza M J, Moriana M C, Garrcía-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 (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. *Mol. Phylogenet.Evol.* 53:13-22.
- Tremetsberger K, Stuessy T F, Guo Y P, Baeza C M, Weiss H, Samuel R M (2003a) *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (Asteraceae) of Andean southern South America. *Taxon* 52:237–245.
- Tremetsberger K, Stuessy T F, Samuel R M, Baeza C M, Fay M F (2003b) Genetics of colonization in *Hypochaeris tenuifolia* (Asteraceae, Lactuceae) on Volcán Lonquimay, Chile. *Mol. Ecol.* 12:2649–2659.
- Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy T F, Ortiz M A, 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. *Bot. J. Linean. Soc.* 146:79–95.
- Tremetsberger K, Weiss-Schneeweiss H, Stuessy T, Samuel R, Kadlec G, Ortiz M A, Talavera S (2005) Nuclear ribosomal DNA and karyotypes indicate a NW African origin of South American *Hypochaeris* (Asteraceae, Cichorieae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 36:102-116

- Tremetsberger K, Stuessy T F, Kadlec G, Urtubey E, Baeza C M, Beck S G, Valdebenito H Á, Ruas C F, Matzenbacher N I (2006) AFLP phylogeny of South American species of *Hypochaeris* (Asteraceae, Lactuceae). *Syst. Bot.* 31:610–626.
- 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 (2009) Pleistocene refugia and polytopic replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and Subantarctic plant *Hypochaeris incana* (Asteraceae, Cichorieae). *Mol. Ecol.* 18:3668-3682.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids. Res.* 23(21):4.407-4.414.
- Weiss H, Stuessy T F, Grau J, Baeza CM (2003) Chromosome reports from South American *Hypochaeris* (Asteraceae). *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 90:53-63. Wells T C E (1976) *Hypochaeris maculata* L. (*Achyrophorus maculatus* (L.) Scop.). *J. Ecol.* 64: 757–774
- Yeh F C (2000) Population genetics. In: *Forest conservation genetics: principles and practice*. A.Young, D. Boshier & T.Boyle (eds.). pp. 21-37. Collingwood: CSIRO Publishing.
- Yeh F C, Yang R, Boyle, T J, Xiyang J M (2000) *Pop Gene* 32. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, v. 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.

CONCLUSÕES GERAIS

As análises da espécie *H. catharinensis* utilizando marcadores moleculares AFLP permitiu definir a posição filogenética dessa espécie entre as espécies sul-americanas de *Hypochoeris*, possibilitando sugerir a formação de um novo grupo filogenético chamado Grupo Lútea, formado por *H. catharinensis* e *H. lutea*. As análises de populações de *H. catharinensis* mostraram que as populações não apresentam padrão claro de isolamento, mostrando indivíduos misturados entre populações. Apenas algumas das populações de *H. catharinensis* apresentaram um início de estruturação. Embora não existam informações sobre o sistema de reprodução de *H. catharinensis*, a forma que a variabilidade genética está distribuída (maior dentro do que entre) em suas populações indica características de espécies alogâmicas.

REFERÊNCIAS

- Abbott R J, Ireland H E, Rogers HJ (2007) Population decline despite high genetic diversity in the new allopolyploid species *Senecio cambrensis* (*Asteraceae*) Mol. Ecol. 16: 1023-1033.
- Almeida J A (2009) Fatores Abióticos. In: Boldrini I I. Biodiversidade dos Campos do Planalto das Araucárias. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas. 19-38.
- Avise J C (1994) Molecular markers: natural history and evolution. New York: Chapman & Hall, p. 511.
- Azevêdo-Gonçalves C F, Matzenbacher NI (2005) Taxonomic notes in *Hypochaeris* L. (*Asteraceae*). Comp. Newsl. 42: 1-4.
- Azevêdo-Gonçalves C F, Matzenbacher NI (2006) Notas nomenclaturais em *Hypochaeris* L. (*Asteraceae*). Pesquisas. Ser. Bot. 57: 157-159.
- Azevêdo-Gonçalves C F, Matzenbacher NI (2007) O Gênero *Hypochaeris* L. (*Asteraceae*) no Rio Grande do Sul, Brasil. Iheringia. Ser. Bot. 62: 55-87.
- Baldwin B G (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. Mol. Phylogenet. Evol. 1: 3-16.
- Baldwin B G (1993) Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequence of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. Am. J. Bot. 88: 1103-1117.
- Barroso G M (1991) Sistemática de Angiosperma no Brasil. Subclasse VI: Asteridae, V. F, Viçosa, v.3, p 326.
- Bortiri E (1999) *Asteraceae*, parte 14. Tribu XIII. Lactuceae. In: *Hypochaeris*. Flora Fanerogâmica Argentina. v. 63, pp 1-25.
- Bremer K (1994) *Asteraceae – Cladistics & Classification*. Timber Press, Portland, pp752.
- Bussell J D, Waycott M, Chappill J A (2005) Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. Perspect. Plant. Ecol. Evol. Syst. 7: 3–26.

- Cabrera A L (1937) Compuestas Argentinas nuevas o interesantes. Notas del Museo de la Plata, v. 2, p. 171-204.
- Cabrera A L (1963) Estudios sobre o gênero *Hypochoeris*. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, v. 10, n. 2-3, p. 166- 195.
- Cabrera A L (1974) Compuestas. In: Burkart A. Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Buenos Aires: I.N.T.A. pt. 6, p. 512-525.
- Cabrera A L (1976) Materiales para una revisión, del gênero *Hypochoeris*. I. *Hypochoeris chillensis* (H.B.K.) Hieron. Darwiniana, v. 20, n. 3-4, p. 312-322.
- Cabrera A L, Willink A (1980) Biogeografia da America Latina. 2. Ed. Washington DC: Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos.
- Cabrera A L, Crisci J V, Delucchi G, Freire S E, Giuliano D A, Iharlegui L, Katinas L, Sáenz A A, Sancho G, Urtubey E (2000) Catalogo ilustrado de las compuestas (=Asteraceae) de la provincia de Buenos Aires, Argentina: Sistemática, Ecología y Usos. Buenos Aires: CONICET. p. 136.
- Cavalli S S, Winge H (2003) Variabilidade genética em populações naturais. In: Genética e Evolução Vegetal. Freitas LB, Bered F (Org.). Porto Alegre: Ed. UFRGS, p.165-175.
- Cerbah M, Coulaud J, Godelle B, Siljak-Yakovlev S (1995) Genome size, fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. Genome 38:689–695.
- Cerbah M, Coulaud J, Brown SC, Siljak-yakovlev S (1998a) Evolutionary DNA variation in the genus *Hypochoeris*. Heredity 82: 261-266.
- Cerbah M, Souza-Chies T, Jibier M F, Lejeune B, Siljak-Yakovlev S (1998b) Molecular phylogeny of the genus *Hypochoeris* using internal transcribed spacers of nuclear rDNA: inference for chromosomal evolution. Mol. Biol. Evol. 15: 345–354.
- Charlesworth D (1985) Distribution of dioecy and self-incompatibility in angiosperms. In Greenwood P J, Harvey P H, Slatkin M (ed) Evolution: essays in honor of John Maynard Smith, Cambridge University Press, Cambridge, pp 237–268
- Chaw S M, Long H, Wang B S, Zharkikh A, Li W H (1993) The phylogenetic position of Taxaceae based on 18S rRNA sequences. J. Mol. Evol. 37: 624-630.

- Coelho A S G (2001a) Software: BOOD -Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap v 3.0. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.
- Coelho A S G (2001b) Software: DBOOT -Avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores, Versão 1.1. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.
- Comes H P, Abbott R J (2000) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and quantitative trait analyses across a major phylogeographical break in the Mediterranean ragwort *Senecio gallicus*Vill. (*Asteraceae*). *Mol. Ecol.* 9: 61-76.
- Cornuet J M e Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144(4): 2001-2014.
- Defillips R A (1976) *Hypochoeris*. In: Tutin T G, Heywood V H, Burges N A, Moore D M, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, (ed). *Flora Europaea*, Cambridge University Press,Cambridge, 4:308-310.
- Doyle J J e Doyle J L (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.* 1:47-50.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Ferreira M A J F (2003) Utilização das técnicas de marcadores moleculares na genética de populações, na genética quantitativa e no melhoramento de plantas. Boa Vista: Embrapa Roraima, 63p.
- Ferreira M E, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, p.220.
- Fiorin F G (2008) Estrutura Cariotípica de Duas Espécies de *Hypochoeris* (*H. catharinensis* e *H. lutea*), *Asteraceae* Endêmicas do Sul do Brasil. Dissertação, Universidade Estadual de Londrina. Futuyma DJ (1992) *Biologia reprodutiva*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 631.

- Gitzendanner M A, Soltis PS (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *Amer. J. Bot.* 87:783-792. Gonzales EE, Hamrick J L (2005) Distribution of genetic diversity among disjunct populations of the rare forest understory herb, *Trillium reliquum*. *Heredity* 95: 306-314.
- Grodzicker T, Williams J, Sharp P, Sambrook J (1974) Physical mapping of temperature-sensitive mutation of adenoviruses. *Cold. Spring. Harb. Sym.* 39: 439-446.
- Hamrick J L (1982) Distribution of genetic whitin and among natural forest population. In: Chambers, S.M., Macbide, B., Thomas, W.L. (Eds.) *Shonewald-cox*.
- Hamrick J L (1994) Genetic diversity and conservation in tropical forests. *Proc. International Symposium on Genetic conservation and Production of Tropical forest Tree Seed. Asean-Canada*. In Drysdale, RM, John, SET, Yopa, AC (ed) *Forest Tree Centre pp1-9*
- Hamrick J L, Godt M J W (1996) Conservation genetics of endemic plant species. In: Avise J C, Hamrick J L, eds. *Conservation genetics. Case histories from nature*. New York: Chapman & Hall. 281-304.
- Hill M, Witsenboer H, Zabeau M, Vos P, Kesseli R, Michelmore R (1996) PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1202–1210.
- Judd W S (1999) *Plant Systematics: a phylogenetic approach*. Massachusetts: Sinauer Associater Inc., p. 464.
- Kageyama P Y, Sebbenn A M, Ribas L A, Gandara F B (2003) Castellen, M., Percim, M. B., Vencovsky, R. Diversidade genética em espécies tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Sci. For.* 64:93-107.
- Kim S C, Crawford D J, Francisco-Ortega J, Santos-Guerra A A (1996) common origin for woody *Sonchus* and five related genera in the Macaronesian islands: molecular evidence for extensive radiation. – *PNAS*. 93: 7743-7748.
- Kim S C, MCGowen M R, Lubinsky P, Barber J C, Mort M E, Santos-Guerra A (2008) Timing and tempo of early and successive adaptive radiations in Macaronesia. -*PLoS ONE*. 3: e2139.
- Koopman W J M, Guetta E, VanDeWiel C C M, Vosman B, VanDenBerg R G (1998) Phylogenetic relationships among *Lactuca* (*Asteraceae*) species and related genera based on ITS-1 DNA sequences. *Amer. J. Bot.* 85: 1517–1530.

- Koopman W J M, Zevenbergen M J, VanDenBerg A G (2001) Species relationships in *Lactuca S. L.* (Lactuceae, Asteraceae) inferred from AFLP fingerprints. *Amer. J. Bot.* 88: 1881–1887. Koopman W (2005) Phylogenetic signal in AFLP data sets. *Syst. Biol.* 54: 197–217.
- Lane M A (1996) Pollination biology of Compositae. In *Compositae: Biology and utilization* (P.D.S. Caligari & D.J.N. Hind, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew .61-80.
- Lee S L, Ng K K S, Saw L G, Norwati A, Salwana M H S, Lee C T (2002) Norwati, M. Population genetics of *Intsia palembanica* (Leguminosae) and genetic conservation of Virgin Jungle Reserves in Peninsular Malaysia. *Am. J. Bot.* 89:447-459.
- Leite P F (2002) Contribuição ao conhecimento fitoecológico do sul do Brasil. *Ciência & Ambiente* 24: 51-73.
- Manly B F J (1997) *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in Biology*. London.
- Martin P G, Dowd J M (1991) A comparison of 18S ribosomal RNA and rubisco large subunit sequences for studying angiosperm phylogeny. *J. Mol. Evol.* 33: 274-282.
- Matzenbacher N I (1998) O complexo “Senecionioide” (*Asteraceae* – Senecioneae) no Rio Grande do Sul – Brasil. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. p. 276.
- Miller M P (1997) *Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA), Version 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population data*. Computer software distributed by author.
- Moraes PLR, Monteiro R, Vencovsky R (1999) Conservação genética de populações de *Cryptocarya moschata* Nees (Lauraceae) na Mata Atlântica do estado de São Paulo. *Rev. Brás. Bot.* 22: 237-248.
- Mráz P, Gaudeul M, Rioux D, Gielly L, Choler P, Taberlet PE (2007) Intra-biodiversity Consortium. Genetic structure of *Hypochoeris uniflora* (Asteraceae) suggests vicariance in the Carpathians and rapid post-glacial colonization of the Alps from an eastern Alpine refugium. *J. Biogeogr.* 34: 2100-2114.
- Muellner A N, Tremetsberger K, Stuessy T, Baeza CM (2005) Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochoeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). *Mol. Ecol.* 14:203–212.

- Muller-Schärer H, Fischer M (2001) Genetic structure of the annual weed *Senecio vulgaris* in relation to habitat type and population size. *Mol. Ecol.* 10: 17-28.
- Mullis K B, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : the polymerase chain reaction. *Cold. Spring. Hárbs.Symp. Quant.Biol.* 51: 263-273.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 70:3321-3323.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics.* 89:583-590.
- Nielsen L R, Cowan RS, Siegismund HR, Adersen H, Philipp M, Fay MF (2003) Morphometric, AFLP and plastid microsatellite variation in populations of *Scalesia divisa* and *S. incise* (*Asteraceae*) from the Galápagos Islands. *Bot. J. Linean. Soc.* 143: 243–254.
- Nielsen L R (2004) Molecular differentiation within and among island populations of the endemic plant *Scalesia affinis* (*Asteraceae*) from the Galápagos Islands. *Heredity* 93: 434–442.
- Ortiz M A, Tremetsberger K, Talavera S, Stuessy T F, Garcia-Castano J L (2007) Population structure of *Hypochoeris salzmanniana* D C. (*Asteraceae*), an endemic species to the Atlantic coast on both sides of the Strait of Gibraltar, in relation to Quaternary sea level changes. *Mol. Ecol.* 16:541–552.
- Parker J (1975) Aneuploidy and isolation in two *Hypochoeris* species. *Chromosoma* 52: 89–101. Pelsler PB, Gravendeel B, VanDerMeijden R (2003) Phylogeny reconstruction in the gap between too little and too much divergence: The closest relatives of *Senecio jacobaea* (*Asteraceae*) according to DNA sequences and AFLPs. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 613-628.
- Pierce B A (2004) *Genética – Um Enfoque Conceitual*. Rio De Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p.693.
- 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.
- Reis M S (1996) Distribuição e dinâmica da variabilidade genética em populações naturais de palmito (*Euterpe edulis* Martius). Tese (doutorado) -Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP. p.210.

- Ribeiro V J, Bertolucci F L, Grattapaglia D (1997) RAPD marker-guided mating in a reciprocal recurrent selection program of *Eucalyptus*. Iufro Conference On Silviculture And Improvement Of Eucalypts, Salvador. Proceedings. Colombo: EMBRAPA / CNPF, v.2, p.156-160.
- Ridley M (2006) *Evolução*. 3ªEd. Porto Alegre: Artmed.
- Rohlf F J (2000) Software: NTSYS-pc Numerical taxonomy and Multivariate Analysis System v 2.1. Exeter Publishing Ltd. Setauket, NY.
- Ruas C F, Ruas P M, Metzenbacher N I, Ross G, Bernini C, Vanzela ALL (1995) Cytogenetic studies of some *Hypochoeris* species (Compositae) from Brasil. *Amer. J. Bot.* 82:369–375.
- Ruas C F, Vanzela A L L, Santos M O, Fregonezi J N, Ruas P M, Matzenbacher N, Aguiar-Perecin M L R (2005) Chromosomal organization and phylogenetic relationships in *Hypochoeris* species (*Asteraceae*) from Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 28:129-13.
- Samuel R, Stuessy T F, Tremetsberger K, Baeza C M, Siljak-Yakovlev S (2003) Phylogenetic relationships among species of *Hypochoeris* (*Asteraceae*, *Lactuceae*) based on ITS, plastid trnL intron, trnL-F spacer and matK sequences. *Amer. J. Bot.* 90:496–507.
- Sang T, Crawford D J, Kim S C, Stuessy T F (1994) Radiation of the endemic genus *Dendroseris* (*Asteraceae*) on the Juan Fernández Islands – evidence from sequences of the ITS regions of nuclear ribosomal DNA. *Amer. J. Bot.* 81: 1494-1501.
- Savard L, Muchaud M, Bousquet J (1993) Genetic diversity and phylogenetic relationships between birches and alder using ITS, 18S, rRNA and rbcL gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2: 112-118.
- Schluter P M, Harris SA (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes.* 6:569-572.
- Silvertown J W, Doust J L (1993) *Introduction to plant population biology*. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, p. 210.
- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16: 393-430.
- Slatkin M (1994) Gene flow and population structure. En: *Ecological Genetics* (ed Real LA). Pp. 3-18. Princeton University Press.

- Sneath P H A, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy. W. H. Freeman, San Fransisco.
- Soons M B, Heil G W, Nathan R, Katul GG (2004) Determinants of long-distance seed dispersal by wind in grasslands. *Ecology* 85:3056–3068.
- Stebbins G L (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, London.
- Stuessy T F, Tremetsberger K, Mullner A N, Jankowicz J, Guo Y-P, Baeza C M, Samuel R M. (2003) The melding of systematics and biogeography through investigations at the populational level: examples from the genus *Hypochaeris* (*Asteraceae*). *Basic. Appl. Ecol.* 4:287–296.
- Stuessy T, Tremetsberger K, Samuel R, Jankowicz J, Guo Y-P, Muellner AN (2004) 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. pp. 23–39.
- Suh Y, Thien L B, Reeve H E, Zimmer E A (1993) Molecular evolution and phylogenetic implication of internal transcribed spacer sequences of ribosomal DNA in Winteraceae. *Am. J. Bot.* 80: 1042-1055.
- Swofford D L (2003) PAUP*: phylogenetic analysis usIng parsimony (*and other methods), Version 4.0b10. Sunderland: SInauer Associates.
- Takhtajan A (1997) Diversity and classification of flowering plants. New York. Columbia University Press.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Phylogenet. Evol.* 24: 1596-1599.
- Terrab A, Ortiz M A, Talavera M, Ariza M J, Moriana M C, Garrcía-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 (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. *Mol. Phylogenet. Evol.* 53:13-22.
- Torggler M G F, Contel E P B, Torggler S P (1995) Isoenzimas – Variabilidade Genética em Plantas. Sociedade Brasileira de Genética - Série Monográfica, Ribeirão Preto.

- Tremetsberger K, Stuessy T F, Guo Y P, Baeza C M, Weiss H, Samuel R M (2003a) *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP) variation within and among populations of *Hypochaeris acaulis* (*Asteraceae*) of Andean southern South America. *Taxon* 52:237–245.
- Tremetsberger K, Stuessy T F, Samuel R M, Baeza C M, Fay M F (2003b) Genetics of colonization in *Hypochaeris tenuifolia* (*Asteraceae*, *Lactuceae*) on Volcán Lonquimay, Chile. *Mol. Ecol.* 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. *Bot. J. Linn. Soc.* 146:79–95.
- Tremetsberger K, Weiss-Schneeweiss H, Stuessy T, Samuel R, Kadlec G, Ortiz M A, Talavera S (2005) Nuclear ribosomal DNA and karyotypes indicate a NW African origin of South American *Hypochaeris* (*Asteraceae*, *Cichorieae*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 36:102-116
- Tremetsberger K, Stuessy T F, Kadlec G, Urtubey E, Baeza C M, Beck S G, Valdebenito H Á, Ruas C F, Matzenbacher N I (2006) AFLP phylogeny of South American species of *Hypochaeris* (*Asteraceae*, *Lactuceae*). *Syst. Bot.* 31:610–626.
- Tremetsberger K, Urtubey E, Terrab A, Baeza C M, Ortiz M A, Talavera M, König C, Tensch E M, Kohl G, Talavera S, Stuessy T F (2009) Pleistocene refugia and polytopic replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and Subantarctic plant *Hypochaeris incana* (*Asteraceae*, *Cichorieae*). *Mol. Ecol.* 18:3668-3682.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21):4.407-4.414.
- Wallace L E (2002) Examining the effects of fragmentation on genetic variation in *Platanthera leucophaea* (*Orchidaceae*): inferences from allozyme and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant. Species Biol.* 17: 37-49.
- Weiss H, Stuessy T F, Grau J, Baeza CM (2003) Chromosome reports from South American *Hypochaeris* (*Asteraceae*). *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 90:53-63.
- Weiss-Schneeweiss H, Stuessy T F, Siljak-Yakovlev S, Baeza C M, Parker J (2003) Karyotype evolution in South American species of *Hypochaeris* (*Asteraceae*, *Lactuceae*). *Plant. Syst. Evol.* 241: 171–184.

- Weiss-Schneeweiss H, Stuessy T F, Tremetsberger K, Urtubey E, Valdebenito H A, Beck S G, Baeza CM (2007) Chromosome numbers and karyotypes of South American species and populations of *Hypochaeris* (*Asteraceae*). *Bot. J. Linn. Soc.* 153:49-60.
- Weiss-Schneeweiss H, Tremetsberger K, Schneeweiss G M, Parker J S, Stuessy T F (2008) Karyotype Diversifications and Evolution in Diploid and Polyploid South American *Hypochaeris* (*Asteraceae*) Inferred from rDNA Localization and Genetic Fingerprint Data. *Ann. Botany.* 101: 909-918.
- Wells T C E (1976) *Hypochaeris maculata* L. (*Achyrophorus maculatus* (L.) Scop.). *J. Ecol.* 64: 757–774
Wright S (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics.* 16: 97-159.
- Wright S (1969) Evolution and genetics of populations: The theory of gene frequencies. University Chicago Press, Chicago.
Yeoh Y, Kang S S, Chung M G (1996) Evaluation of the natural monement populations of *Camellia japonica* (*Theaceaceae*) in Korea based on allozyme studies. *BBAS.* 37: 141-146.
- Yeh F C (2000) Population genetics. In: Forest conservation genetics: principles and practice. A.Young, D. Boshier & T.Boyle (eds.). pp. 21-37. Collingwood: CSIRO Publishing.
- Yeh F C, Yang R, Boyle, T J, Xiyan J M (2000) Pop Gene 32. Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis, v. 1.32. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
- Zanettini N H P, Cavalli SS (2003) Variabilidade genética em função do modo de reprodução. In: *Genética e Evolução Vegetal*. Freitas L B, Bered F (org.). Porto Alegre: Ed. UFRGS. p.177-188.