



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

BEATRIZ PEREIRA CUNHA

CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE E ESTRUTURAÇÃO
GENÉTICA DE *CROTALARIA PALLIDA* (FABACEAE)

CAMPINAS

2017

BEATRIZ PEREIRA CUNHA

**CARACTERIZAÇÃO DA VARIABILIDADE E ESTRUTURAÇÃO
GENÉTICA DE *CROTALARIA PALLIDA* (FABACEAE)**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do Título de Mestra em
Genética e Biologia Molecular, na área de
Genética Animal e Evolução.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA BEATRIZ PEREIRA
CUNHA E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
VERA NISAKA SOLFERINI.

Orientador: VERA NISAKA SOLFERINI

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C914c Cunha, Beatriz Pereira, 1988-
Caracterização da variabilidade e estruturação genética de *Crotalaria pallida* (Fabaceae) / Beatriz Pereira Cunha. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Vera Nisaka Solferini.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Filogeografia. 2. Bioinvasão. 3. Variação genética. 4. Fabaceae. I. Solferini, Vera Nisaka, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of the genetic variability and structure of *Crotalaria pallida* (Fabaceae)

Palavras-chave em inglês:

Phyllogeography

Bioinvasion

Genetic variation

Fabaceae

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Vera Nisaka Solferini [Orientador]

Maria Imaculada Zucchi

Rodrigo Cogni

Data de defesa: 22-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 22 de Fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

Profa. Dra. Maria Imaculada Zucchi

Prof. Dr. Rodrigo Cogni

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Angela e José, que sempre me incentivaram e acreditaram em mim, tornando todos os meus sonhos possíveis. À minha irmã Livia, pelo carinho e por me estimular a ser uma pessoa melhor. Aos meus avós, tia e tio por sempre torcerem por mim. A todos os familiares que acreditam que sou capaz de ir cada vez mais longe.

À minha orientadora, Vera, pela oportunidade e confiança. Ao Prof. José Trigo, pela valiosa colaboração, tanto na parte prática, quanto teórica. Ao Diomar Verçosa, por ceder o material coletado em sua Tese de Doutorado. Ao Prof. Dr. Márcio José da Silva pelo sequenciamento das amostras. À Célia, técnica do laboratório e grande companheira de trabalho, por estar sempre disposta a ajudar com “pipetagens” e conselhos.

Ao Gustavo Fonseca, por acreditar no meu potencial e ser parte fundamental da minha formação profissional, além de fonte de inspiração. À Cecilia Amaral, por todo o apoio e por fazer ciência com tanta paixão, contagiando todos a sua volta. A todos os professores que participaram das minhas bancas de qualificação, pré-banca e defesa e contribuíram com sugestões e críticas para melhorar meu trabalho.

Aos amigos que caminharam ao meu lado durante essa jornada e fizeram tudo valer a pena. À Bibi e a Nilvea que me deram muita força e ânimo e, mesmo de longe, me ajudaram mais do que imaginam. Aos amigos do laboratório, Cecilia, Elen, Fer, Gustavo, Jair, Livia, Luiz e Nat, pela paciência, por me ensinarem muito, pela companhia, por tornaram esse período muito mais prazeroso. Admiro muito todos vocês e agradeço por compartilharem comigo conhecimento e muitas histórias marcantes.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse projeto.

RESUMO

A leguminosa *Crotalaria pallida* é considerada uma espécie invasora na região Neotropical e em outras regiões ao redor do mundo. Acredita-se que ela seja nativa da África, porém sua história evolutiva é desconhecida devido à carência de dados sobre sua introdução e de estudos genéticos e filogeográficos com a planta. No presente trabalho buscou-se avaliar a variabilidade e estruturação genética de populações de *C. pallida* e inferir os processos históricos evolutivos que explicam o padrão de distribuição atual da espécie. A origem da espécie na região Neotropical foi discutida com relação às hipóteses de “eventos naturais antigos de dispersão a longa distância” e de “introdução recente mediada pelo homem”. Foram analisadas amostras de 25 pontos de ocorrência distribuídos na região tropical, incluindo onze pontos localizados no Brasil, sete na África, cinco em outros países da América Latina, um na Índia e um na Austrália. Os dados de sequências de duas regiões intergênicas, uma nuclear (ITS) e uma plastidial (rpl32-trnL), foram utilizados em análises de diversidade, filogeográficas e de estrutura populacional. Os padrões de diversidade e estruturação geográfica encontrados para as duas regiões sequenciadas foram semelhantes. Cada marcador apresentou apenas quatro haplótipos com poucos passos mutacionais de diferença entre eles. A região Neotropical (Hd: 0,1139 – ITS e 0,0982 – rpl32-trnL) não apresentou haplótipos exclusivos e, os dois haplótipos de cada marcador encontrados na região são compartilhados com amostras africanas. Todos os indivíduos brasileiros analisados são monomórficos para os marcadores estudados, indicando uma origem comum das populações do país. O baixo polimorfismo encontrado, provavelmente está associado à biologia da espécie e/ou a história demográfica das populações da região de distribuição nativa, além de ser um padrão comumente registrado em espécies invasoras. Os índices de diversidade genética maiores na África (Hd: 0,5111 – ITS e 0,6667 – rpl32-trnL) e a ausência de haplótipos exclusivos nos neotrópicos sugerem que *C. pallida* tem origem africana e foi introduzida recentemente na região Neotropical, o que concorda com a hipótese de introdução mediada pelo homem. A importância da variabilidade genética para o estabelecimento e propagação de uma espécie invasora é um assunto intensamente debatido e o alto potencial invasor de *C. pallida*, a despeito da baixa diversidade genética, contribui na delimitação das características que são de fato relevantes durante o processo de invasão.

ABSTRACT

The herbaceous legume *Crotalaria pallida* is considered an invasive species in the Neotropics and others regions across the world. This species is presumably native from Africa, nevertheless its evolutionary history is unknown due to the lack of information about its introduction and of genetical and phylogeographical studies with the plant. The present study sought to investigate the genetic variability and structuring of *C. pallida* populations and to understand the evolutionary processes that led to the current distribution pattern of the species. The origin of the plant in the Neotropics was discussed contrasting the hypothesis of “early natural events of long distance dispersion” and “recently introduction by humans”. We analyzed samples of 25 sites spread around the Tropical region, comprising: eleven sites in Brazil, seven in Africa, five in others Latin America countries, one in India and one in Australia. The DNA sequence data of two intergenic regions, one nuclear (ITS) and one plastidial (rpl32-trnL), was evaluated through diversity indices, phylogeographical and population structure analyses. The patterns of diversity and geographic structure for the two DNA regions were similar. Each marker exhibited only four haplotypes with a few mutational differences between them. The Neotropical region (Hd: 0,1139 – ITS and 0,0982 – rpl32-trnL) does not hold exclusive haplotypes and the two haplotypes of each marker found in this region are shared with African samples. All Brazilians individuals analyzed are monomorphic for both markers, indicating a common origin of the populations in this country. The low polymorphism is probably associated to organism biology and/or to demographic history of native populations; besides, it is a frequent pattern in invasive species. The higher diversity indices in Africa (Hd: 0,5111 – ITS and 0,6667 – rpl32-trnL) and absence of exclusive haplotypes in the Neotropics suggest that *C. pallida* has an African origin and was recently introduced in the Neotropical region, what supports the hypothesis of introduction by humans. The importance of genetic variability for the establishment and spread of an invasive species is intensely debated and the high invader potential of *C. pallida*, despite its low genetic diversity, contributes to the delimitation of truly relevant characteristics for the invasion process.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Crotalaria pallida</i> localizada à beira de uma estrada em Itaparica, Bahia.....	16
Figura 2. Mapa dos pontos amostrais no Brasil. Em destaque, o mapa mostra as delimitações dos biomas brasileiros.....	18
Figura 3. Plântula gerada após sete dias da germinação.....	19
Figura 4. Fotografia de gel de DNA extraído de oito plântulas após uma semana de germinação.....	20
Figura 5. Distribuição geográfica dos haplótipos de ITS de <i>C. pallida</i> . Todas as populações analisadas apresentaram um único haplótipo, exceto Nigéria que possui um indivíduo heterozigoto, sendo um dos alelos exclusivos do local.....	25
Figura 6. Distribuição geográfica dos haplótipos de rpL32-trnL de <i>C. pallida</i> . Todas as populações analisadas apresentaram um único haplótipo.....	26
Figura 7. Rede de haplótipos de ITS (a) e de rpL32-trnL (b).....	27
Figura 8. Gráficos de <i>mismatch distribution</i> para os dados totais (c,f) e por região (a,b,d,e) de ITS (esquerda) e rpL32-trnL (direita). O histograma representa a distribuição de diferenças par a par observada nas sequências obtidas e a linha sólida representa a distribuição esperada em caso de expansão populacional.....	28
Figura 9. Análise multilocus EBSF indicando expansão populacional recente. Em linha tracejada estão representados os intervalos de confiança (95% HPD).....	29
Figura 10. Inferência filogenética bayesiana para as sequências de ITS. Estão representados os tempos de divergência dos nós com probabilidade posterior maior que 0,9 (■) e em parênteses o 95% HPD. As áreas onde cada haplótipo são encontrados estão entre parênteses, a frente dos mesmos. AU: Austrália; AF: África; I: Índia; N: Neotropical.....	29
Figura 11. Inferência filogenética bayesiana para as sequências de rpL32-trnL. ■: PP>0,9. Entre parênteses estão as áreas onde cada haplótipo é encontrado. AU: Austrália; AF: África; I: Índia; N: Neotropical.....	30
Anexo 1. Localização dos países de onde foram obtidas amostras de <i>Crotalaria pallida</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pontos de ocorrência das amostras de <i>C. pallida</i> analisadas e o tipo de material disponível para cada ponto.....	17
Tabela 2. Número de acesso das sementes doadas pelo <i>National Germplasm Resources Laboratory</i>	19
Tabela 3. Iniciadores nucleares testados.....	20
Tabela 4. Iniciadores plastidiais testados.....	21
Tabela 5. Qualidade de amplificação e número de sítios polimórficos incluindo indel em cada marcador testado. Resultados baseados em 26 indivíduos de Ibiporã (5), Itacimirim (5), Miranda (5), Pindamonhangaba (5) e Rep. Democrática do Congo A (6). Em destaque, os marcadores selecionados para o presente estudo. (+) satisfatória; (-) insatisfatória.....	22
Tabela 6. Caracterização das sequências de ITS e rpl32-trnL geradas.....	23
Tabela 7. Índices de diversidade e testes de neutralidade totais e por região para cada marcador. N: número amostral, S: número de sítios polimórficos incluindo indel, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, π : diversidade nucleotídica, s.d: desvio padrão, D: índice de Tajima, FS: índice de Fu, r: índice de Harpending. Valores com $p < 0,05$ são significativos estão em negrito.....	24
Tabela 8. Haplótipos encontrados em cada população.....	24
Tabela 9. Análise de variância molecular hierarquizada (AMOVA) das sequências de ITS e de rpl32-trnL organizadas em dois grupos: Neotropical e África. Todos os valores com $p < 0,05$. GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; CV: componentes da variância; PV: porcentagem de variação.....	26

SUMÁRIO

Introdução.....	11
Objetivos.....	14
Material e Métodos.....	15
Resultados.....	23
Discussão.....	30
Conclusões.....	35
Referências Bibliográficas.....	36
Anexo.....	46

Introdução

Nos últimos séculos, as espécies invasoras afetaram substancialmente o funcionamento e caracterização dos ecossistemas ao redor do mundo (eg. Elton, 1958; Lodge, 1993; Mooney & Cleland, 2001; Sakai *et al.*, 2001; Vilà *et al.*, 2010). Invasões biológicas são consideradas a segunda maior causa de perda da biodiversidade atual, depois da destruição dos habitats (Vitousek *et al.*, 1997). Invasões ocorrem quando organismos atingem novos limites geográficos, por meio de ações humanas, e seus descendentes propagam e persistem causando impactos ecológicos e/ou econômicos (Lockwood *et al.*, 2007). A agricultura, aquicultura, recreação, transporte, entre outras atividades humanas promovem, de forma intencional ou acidental, o rompimento de barreiras naturais à dispersão de diversas espécies (Kolar & Lodge, 2001), alterando as comunidades naturais do mundo a uma taxa sem precedentes (Mack *et al.*, 2000). Esta alteração ocorre devido à modificação da ciclagem de nutrientes (eg. Gaertner *et al.*, 2014), impacto no regime hidrológico (eg. Le Maitre, 2004), aumento da intensidade e frequência de queimadas (eg. Schlesinger *et al.*, 2013), entre outros fatores. As respostas da espécie invasora às pressões do novo ambiente e as novas interações interespecíficas podem alterar a história evolutiva das espécies nativas pela competição, mudança de nicho, hibridização, predação e, em última análise, pode levar a extinção (Mooney & Cleland, 2001).

O processo de invasão envolve uma série de etapas sequenciais que contém uma ou mais barreiras que devem ser superadas para a transição para a próxima fase (Chapple *et al.*, 2012). Primeiramente a espécie deve sobreviver ao transporte (Fase 1) e então ser introduzida em um novo ambiente (Fase 2). Nas etapas de estabelecimento (Fase 3) e propagação (Fase 4) a espécie não nativa deve ser capaz de se reproduzir, dispersar e estabelecer uma população autossustentável (Chapple *et al.*, 2012). As barreiras encontradas em cada fase estão diretamente relacionadas a diferentes processos genéticos, como efeito fundador, deriva genética, fluxo gênico e seleção natural (Mäder *et al.*, 2016). As espécies invasoras são aquelas que conseguiram percorrer com sucesso o seu caminho através de cada estágio e/ou barreira e propagaram (Chapple *et al.*, 2012). Quando uma população introduzida se torna amplamente distribuída e abundante, ela passa a ter o potencial de causar algum tipo de dano ecológico ou econômico (Lockwood *et al.*, 2007). Por essa razão um foco central dos estudos de invasão biológica é identificar as características ou fatores que possam prever o destino final de espécies introduzidas (Pysšek & Richardson, 2007; Barrett, 2015; Bock *et al.*, 2015).

No geral, as espécies invasoras apresentam grande tolerância a variáveis abióticas, alta capacidade de dispersão, reprodução eficiente, alta capacidade competitiva e escassez ou ausência de inimigos naturais nos locais em que foram introduzidas (Kleunen *et al.*, 2015). Contudo, ainda não está claro se essas ou outras características são capazes de prever o sucesso de invasão (Bock *et al.*, 2015). A real importância da variabilidade genética para o estabelecimento e propagação de uma espécie na área invadida, por exemplo, é um assunto intensamente debatido (Reed & Frankham, 2003; Frankham, 2004; Roman & Darling, 2007; Bock *et al.*, 2015; Dlugosch *et al.*, 2015; Michaelides *et al.*, 2016; Trucchi *et al.*, 2016). Na disciplina de genética da invasão, um atributo amplamente reconhecido é que as populações fundadoras irão sofrer eventos demográficos de *bottleneck* com algum grau de intensidade após a introdução e, ocasionalmente, tais populações poderão apresentar reduzido tamanho efetivo, o que amplia os efeitos da deriva genética e reduz ainda mais a diversidade genética (Dlugosch *et al.*, 2015). De fato, uma avaliação dos dados de diversidade genética de 80 espécies de animais, plantas e fungos, confirmou uma redução na riqueza de alelos e na heterozigosidade de populações invasoras quando comparadas com as populações nativas (Dlugosch & Parker, 2008). O sucesso das invasões, a despeito de tal redução, sugere que a natureza da variabilidade é mais importante que a quantidade de diversidade genética introduzida para o progresso de uma invasão, já que a variação total não está necessariamente atrelada à variação adaptativa (Dlugosch *et al.*, 2015). Uma baixa diversidade genética de populações introduzidas também pode ser explicada pelas características das populações de origem. Se a população da área de distribuição nativa, fonte dos indivíduos introduzidos na nova região, apresenta uma reduzida variabilidade, subsequentemente as populações invasoras também irão exibir uma baixa variação (Edelaar *et al.*, 2015).

Neste cenário de baixa diversidade e forte deriva genética, o sucesso da invasão é muitas vezes creditado ao grande número de indivíduos introduzidos e ao número de introduções que ocorreram na região, o que é denominado de pressão de propágulo (Lockwood *et al.*, 2007). Quanto maior o tamanho da população introduzida ou número de introduções independentes, maior a probabilidade da espécie se estabelecer no novo local já que a diversidade genética tende a aumentar (Blackburn *et al.*, 2015). Outro fator reconhecido como fundamental para o sucesso da colonização é a presença de uma alta plasticidade fenotípica, a qual torna as espécies introduzidas capazes de responder as condições encontradas no novo ambiente (Baker, 1965; Davidson *et al.*, 2011). Esta capacidade pode estar intimamente relacionada à história evolutiva das populações nativas da espécie. A

ocorrência frequente de distúrbios ambientais na área de distribuição original pode levar a seleção por genótipos com alta plasticidade que seriam pré-adaptados para a colonização de outras regiões (Hufbauer *et al.*, 2012).

Sendo assim, compreender a história evolutiva de espécies invasoras por meio da comparação da variabilidade genética das populações nativas e invasoras pode fornecer pistas sobre o papel da diversidade genética no sucesso da invasão (Edelaar *et al.*, 2015). E estudos filogeográficos podem gerar novas percepções da dinâmica de colonização e propagação desses táxons (Sakai *et al.*, 2001; Hierro *et al.*, 2005). Marcadores moleculares também são ferramentas valiosas na resolução de questões biogeográficas de muitas espécies supostamente invasoras quando não existem informações suficientes sobre suas histórias de introdução (Gildenhuis *et al.*, 2015). Inferências filogeográficas baseadas em dados moleculares podem indicar, por exemplo, a área de distribuição nativa e diversidade de um determinado táxon (Ndlovu *et al.*, 2013), com implicações para a taxonomia do grupo (Le Roux *et al.*, 2006).

Regiões tropicais especialmente diversas possuem um grande risco potencial de sofrer com um aumento na frequência de invasões, porém o número de estudos com espécies invasoras é baixo para essas áreas (Lowry *et al.* 2013; Rolim *et al.*, 2015; Frehse *et al.*, 2016). A região Neotropical se estende do centro do México ao sul do Brasil e é considerada uma das mais biodiversas do planeta (Rull, 2008). O crescente conhecimento acerca dos processos envolvidos na distribuição das espécies e o desenvolvimento de técnicas no campo da filogeografia e filogenia têm contribuído para uma avaliação mais precisa do padrão atual de diversidade da região Neotropical (Antonelli & Sanmartin, 2011), porém poucos estudos filogeográficos foram realizados com espécies invasoras na região (eg. Facon *et al.*, 2003).

A leguminosa *Crotalaria pallida* é considerada uma espécie invasora na região Neotropical (Fonseca *et al.*, 2006). A espécie apresenta distribuição pantropical e pode ser encontrada em campos arenosos ou argilosos, restingas, áreas de cultivo e, principalmente, em beira de estradas e terrenos baldios (Flores, 2004). Acredita-se que *C. pallida* é nativa da África (Flores *et al.* 2006) e, possivelmente, foi transportada para o Novo Mundo durante o tráfico de escravos no século XVI (Cogni & Futuyma 2009). Sua distribuição natural é obscurecida pelo amplo cultivo da planta para cobertura do solo, como adubo verde e para controle de nematoides em agriculturas, seguida de naturalização da mesma (Polhill, 1982; Lorenzi, 2000). Até o presente momento, apenas um estudo buscou avaliar a variabilidade

genética de *C. pallida* dentro de poucas populações da Índia (Satya *et al.*, 2016) e um estudo demonstrou diferenças de determinados caracteres entre populações brasileiras, o que poderia estar relacionado a diferenciação genética (Cogni *et al.*, 2011).

A história evolutiva que resultou na distribuição atual de *C. pallida* é ainda desconhecida, bem como sua variação genética e estrutura populacional, e estudos filogeográficos podem contribuir para a resolução dessas incertezas e esclarecer a origem da espécie na região Neotropical. No presente estudo, marcadores moleculares foram utilizados para explorar informações sobre a história evolutiva de *C. pallida*, tais como eventos de colonização, expansão e fragmentação das populações. Foi realizada a comparação entre a variabilidade na região invadida e na provável região nativa da espécie para confirmar a hipótese de origem africana. No caso de invasão, espera-se encontrar uma maior diversidade genética na África quando comparada com os neotrópicos. Foram testadas as hipóteses de “eventos naturais antigos de dispersão a longa distância” e de “introdução recente mediada pelo homem” para explicar a origem da espécie na região Neotropical. Em um evento de dispersão a longa distância espera-se observar um único grupo de haplótipos neotropicais estritamente relacionados, juntamente com uma filogenia que ilustra um clado monofilético de amostras neotropicais, que são agrupadas dentro das amostras da África. No caso de introdução mediada pelo homem, muito provavelmente a rede de haplótipos não seria estruturada e a filogenia indicaria que não há estrutura geográfica entre as amostras da região Neotropical e da África, devido a várias introduções de diferentes fontes na área de distribuição natural e/ou ao curto período de tempo em que as populações estão isoladas.

Objetivos

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a variabilidade genética e a distribuição geográfica atual dos haplótipos de populações de *Crotalaria pallida* por meio da análise filogeográfica e de estrutura populacional da espécie. Buscou-se inferir os processos histórico-evolutivos responsáveis pela diversidade e estruturação genética das populações amostradas e estimar o tempo de coalescência entre as populações, correlacionando o tempo de divergência e possíveis eventos geológicos e/ou climáticos aos quais as populações possam ter sido submetidas.

Material e Métodos

Organismo estudado

Crotalaria (Fabaceae: Papilionoideae: Crotalarieae) possui em torno de 700 espécies nos trópicos e subtropicais, principalmente na África e Índia (Polhill 1982; le Roux *et al.*, 2013). Brasil e México são considerados centro de diversidade do gênero no continente americano (Palomino & Vásquez, 1991). Para o Brasil foram descritas 31 espécies nativas e 11 exóticas (Flores, 2004). Dentre as consideradas exóticas está *Crotalaria pallida* que atualmente ocorre em altas densidades na região Neotropical (Cogni & Futuyma, 2009).

Crotalaria pallida é uma herbácea anual que frutifica durante a maior parte de seu ciclo de vida (Figura 1). O florescimento ocorre nos primeiros meses do ano e o período e a intensidade de frutificação são variáveis entre as populações (Verçosa, 2016). A planta realiza autofecundação (Almeida, 1986), mas também é polinizada por abelhas do gênero *Xylocopa* (Jacobi *et al.*, 2005) e não apresenta qualquer mecanismo de dispersão de sementes a longa distância (Cogni *et al.*, 2011). *C. pallida* é diploide e possui 8 pares de cromossomos, assim como a maioria das espécies de *Crotalaria* (Gupta & Gupta, 1978).

Esta espécie não forma monoculturas e coexiste com espécies nativas de *Crotalaria* o que, de acordo com a classificação de Davis e Thompson (2000), seria um indicativo de uma espécie colonizadora não invasora, apesar de seu sucesso variar entre as populações dependendo do comportamento dos polinizadores encontrados no ambiente (Jacobi *et al.*, 2005). Embora não tenha sido realizado nenhum estudo com os efeitos em sistemas naturais, a espécie pode afetar as áreas invadidas de diversas maneiras: pela atração de formigas (Guimarães *et al.*, 2006), intoxicação de animais (Diaz *et al.*, 2003), por aumentar o nível de nitrogênio do solo (Ohdan and Daimon, 1998) e alterar a comunidade de nemátodos (Wang *et al.*, 2004). Usando ferramentas de modelagem de nicho, Fonseca e colaboradores (2006) encontraram uma ampla vulnerabilidade de áreas protegidas do Brasil à invasão de *C. pallida*, sendo que a Mata Atlântica é a mais propensa quando comparada a outros ecossistemas. Ela possui diversas características geralmente associadas a um alto potencial invasor: grande tolerância a variáveis abióticas (encontrada em ambientes alterados e em áreas com diversos climas tropicais), eficiência na reprodução (realiza auto-fecundação e atrai polinizadores) e alta capacidade competitiva (apresenta alelopatia).

As populações de *C. pallida* são afetadas pela presença do herbívoro especialista *Utetheisa ornatrix* (Linnaeus, 1758) nos Neotrópicos, espécie considerada o principal inimigo natural de *Crotalaria* (Cogni, 2010). Este herbívoro possui maior predisposição a se alimentar

de *C. pallida* do que de outras espécies nativas de *Crotalaria* na região Neotropical, o que pode dificultar a propagação dessa leguminosa (Cogni, 2010). O mecanismo responsável por tal padrão pode ser a troca de hospedeiro realizada pelo herbívoro especialista nativo e a falta de resistência efetiva no hospedeiro introduzido (Cogni, 2010).



Figura 1. *Crotalaria pallida* localizada à beira de uma estrada em Itaparica, Bahia.

Amostragem e Germinação de Sementes

Foram analisadas amostras de *Crotalaria pallida* de 25 pontos de ocorrência distribuídos na região tropical (Tabela 1, ANEXO 1). A amostragem no Brasil resultou em onze populações localizadas entre as latitudes 20° e 25° do país e no litoral da Bahia (Figura 2). Folhas de 20 indivíduos por população foram coletadas e desidratadas em sílica gel. Para os 14 demais pontos de ocorrência ao redor do mundo utilizou-se sementes doadas pelo *National Germplasm Resources Laboratory* dos Estados Unidos (Tabela 2). As sementes foram aquecidas em banho-maria a 65°C por 15 minutos para quebrar a dormência e, em seguida, foram germinadas em caixas plásticas transparentes (gerbox) sobre algodão umedecido com 100 ml de água destilada coberto por uma folha de papel filtro. As caixas foram mantidas em estufa durante uma semana, quando as plântulas atingem cerca de 5 cm (Figura 3).

Tabela 1. Pontos de ocorrência das amostras de *C. pallida* analisadas e o tipo de material disponível para cada ponto. BR: Brasil; N: número de indivíduos analisados.

Código	Localidade	N	Material	Data da amostragem
CG	Campo Grande-MS (BR)	8	folhas	Jan/2014
CB	Corumbá-MS (BR)	5	folhas	Jan/2014
IB	Ibiporã-PR (BR)	5	folhas	Jan/2014
IG	Igarapava-SP (BR)	5	folhas	Maio/2014
LN	Itacimirim-BA (BR)	5	folhas	Jan/2015
ITAP	Itaparica-BA (BR)	9	folhas	Jan/2015
IV	Ivinhema-MS (BR)	5	folhas	Jan/2014
MD	Miranda-MS (BR)	5	folhas	Jan/2014
NA	Nova Alvorada-MS (BR)	5	folhas	Jan/2014
PA	Pindamonhangaba-SP (BR)	5	folhas	Maio/2014
SS	São Simão-SP (BR)	5	folhas	Maio/2014
ANG	Angola	9	sementes	Fev/1960
AUS	Austrália	2	sementes	Jan/1950
CR	Costa Rica	2	sementes	Out/1968
CUB	Cuba	2	sementes	Maio/1953
IN	Índia	2	sementes	Abr/1954
NIG	Nigéria	4	sementes	Nov/1949
PE	Peru	1	sementes	Nov/1965
PR	Porto Rico	2	sementes	Jun/1953
DC-A	Rep. Democrática do Congo-A	6	sementes	Abr/1950
DC-B	Rep. Democrática do Congo-B	3	sementes	Dez/1957
DC-C	Rep. Democrática do Congo-C	3	sementes	Abr/1958
TAZ	Tanzânia	6	sementes	Maio/1953
VEZ	Venezuela	2	sementes	Nov/1965
ZIM	Zimbábue	3	sementes	Set/1946
TOTAL		109		

Extração e Amplificação de DNA

O DNA das folhas desidratadas e das plântulas foi extraído usando o método 2× brometo hexadeciltrimetilamonio (CTAB) de Doyle & Doyle (1987) (Figura 4). O produto da extração das folhas foi purificado com o kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) já que o excesso de compostos químicos presentes podem interferir nas reações de amplificação. As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 µl contendo 0,6 unidades de Taq DNA polimerase (Biotools), tampão 1x [75 mM Tris HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄], 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,75 µM de cada iniciador, 0,04mg/mL de albumina de soro bovino (BSA) e 1µL de DNA genômico. Sete regiões nucleares (Tabela 3) e onze regiões plastidiais (Tabela 4) foram testadas com temperaturas de anelamento variando entre 48 e 63°C. A região nuclear ITS e a plastidial

rpL32-trnL, ambas intergênicas, foram escolhidas por apresentarem melhor qualidade de amplificação e maior variabilidade (Tabela 5). Outras regiões plastidiais (trnL-F e trnH-psbA) apresentaram resultados melhores ou semelhantes a região ITS, porém optou-se por avaliar marcadores com tipos de herança diferentes a fim de melhor compreender a história evolutiva da espécie. Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose 1% e em seguida sequenciados usando um sequenciador automatizado (ABI PRISM 3700 DNA Analyzer – Applied Biosystems) no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Unicamp (CBMEG). As amostras foram sequenciadas no sentido *forward* e *reverse*. As sequências consenso foram alinhadas com o algoritmo Muscle (Edgar, 2004) no programa Geneious Pro 5.6.7 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) e editadas manualmente. Os sítios heterozigotos das sequências de ITS foram codificados de acordo com o código IUPAC de ambiguidade e a reconstrução de haplótipos foi feita com o algoritmo Phase (Stephens *et al.* 2001) no programa DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009).



Figura 2. Mapa dos pontos amostrais no Brasil. Em destaque, o mapa mostra as delimitações dos biomas brasileiros.

Tabela 2. Número de acesso das sementes doadas pelo *National Germplasm Resources Laboratory*.

Nº de acesso	País de origem	Continente
PI 263529	Angola	África
PI 184801	Nigéria	África
PI 189272	Rep. Democrática do Congo	África
PI 244591	Rep. Democrática do Congo	África
PI 247482	Rep. Democrática do Congo	África
PI 208370	Tanzânia	África
PI 156532	Zimbábue	África
PI 338590	Costa Rica	América Central
PI 209030	Cuba	América Central
PI 209114	Porto Rico	América Central
PI 308513	Peru	América do Sul
PI 308557	Venezuela	América do Sul
PI 186304	Austrália	Oceania
PI 215642	Índia	Ásia

**Figura 3.** Plântula gerada após sete dias da germinação.

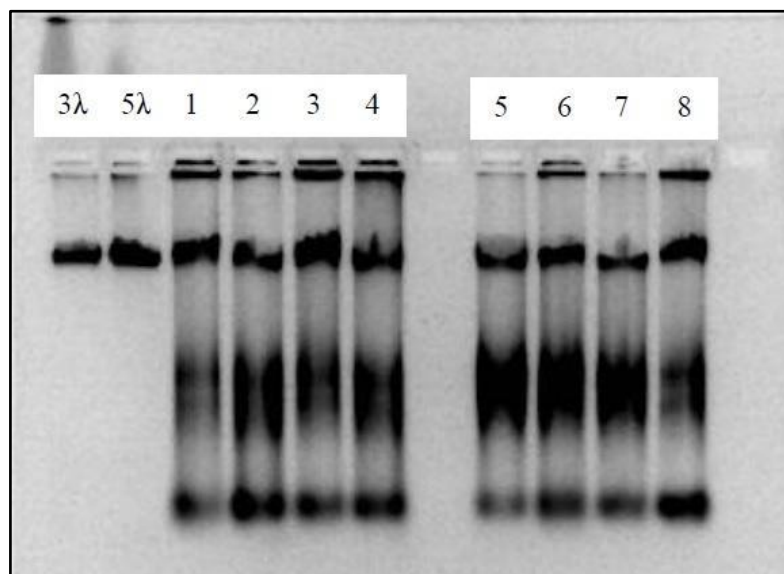


Figura 4. Fotografia de gel de DNA extraído de oito plântulas após uma semana de germinação.

Tabela 3. Iniciadores nucleares testados.

Região	Primer	Sequência	Referência
ITS	ITS 17SE	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG	White <i>et al.</i> , 1990 e Sun <i>et al.</i> , 1994
	ITS 26SE	TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	
Gscp	Gscp687	GATGCTCACTACAAGGCTTG	Emshwiller & Doyle, 1999
	Gscp994	AATGTGCTCTTTGTGGCGAAG	
tRALS	tRALS F	GGTCTGCGAGCTGTTTTTGGAGAAG	Choi <i>et al.</i> , 2006
	tRALS R	GCAATTCCTCCTCAGCTAAAAGTG	
Agt1	Agt1-F	GATTTCCGHATGGATGANTGGGG	Li <i>et al.</i> , 2008
	Agt1-R	CCAYTCCTCCTTCTGHGTGCAGTT	
At103	At103-F	CTTCAAGCCMAAGTTCATCTTCTA	Li <i>et al.</i> , 2008
	At103-R	TTGGCAATCATTGAGGTACATNGTMACATA	
Eif3E	Eif3E-F	TTTGAATGTGGCAACTAYTCTRGTGCTGC	Li <i>et al.</i> , 2008
	Eif3E-R	ACCTCTTCACACTCYTTCATCTT	
AroB	AroB-F	GCATTCTACCAARCWCARTGTGT	Li <i>et al.</i> , 2008
	AroB-R	GCTTTGTTTTTCACATGAWCKCTTDTAGCA	

Tabela 4. Iniciadores plastidiais testados.

Região	Primer	Sequência	Referência
trnL-F	trnL-c	CGAAATCGGTAGACGCTACG	Taberlet <i>et al.</i> 1991
	trnL-f	ATTTGAACTGGTGACACGAG	
trnH-psbA	psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang <i>et al.</i> 1997 Tate & Simpson 2003
	trnH(GUG)	CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC	
trnS(GCU)- trnG(UCC)	trnG(UUC)	GTAGCGGGAATCGAACCCGCATC	Shaw <i>et al.</i> 2005
	trnS(GCU)	AGATAGGGATTCTGAACCCCTCG	
rpl32-trnL	trnL(UAG)	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	Shaw <i>et al.</i> 2007
	rpL32-F	CAGTTCCAAAAAACGTACTTC	
trnQ-5'-rps16	trnQ(UUG)	GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC	Shaw <i>et al.</i> 2007
	rpS16x1	GTTGCTTTYTACCACATCGTTT	
3'trnV-ndhC	trnV(UAC)x2	GTCTACGGTTCGARTCCGTA	Shaw <i>et al.</i> 2007
	ndhC	ATTATTAGAAATGYCCARAAAATATCATATTC	
psbD-trnT	PSBD	CTCCGTARCCAGTCATCCATA	Shaw <i>et al.</i> 2007
	trnT(GGU)-R	CCCTTTTAACCTCAGTGGTAG	
ndhF-rpl32	ndhF	GAAAGGTATKATCCAYGMATATT	Shaw <i>et al.</i> 2007
	rpL32-R	CCAATATCCCTTYTTTTCCTCAA	
matK	3F_KIM	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	Ki-Joong Kim (Le Roux <i>et al.</i> , 2013)
	1R_KIM	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	
rbcLa	rbcL-a F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	Kress & Erickson, 2007
	rbcL-a R	CTTCTGCTACAAATAAGAATCGATCTC	

Análise de dados

As diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) foram calculadas utilizando o programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010) considerando cada indel como um único passo mutacional. Os cálculos da heterozigosidade observada e esperada foram feitos de acordo com Nei (1978). A rede de haplótipos para cada região sequenciada foi inferida com o algoritmo *TCS Networks* sem tolerância à reticulação (Clement *et al.*, 2002) implementado no programa PopArt 1.7 beta (<http://popart.otago.ac.nz>). A codificação binária de indels presentes na região rpl32-trnL foi incluída na matriz. A estruturação geográfica foi avaliada a partir da análise de variância molecular hierárquica (AMOVA), realizada com o programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010). As sequências foram organizadas em dois grupos geográficos, a região Neotropical e o continente Africano, considerado como provável distribuição nativa da espécie (Flores *et al.* 2006). As amostras da Índia e da Austrália não foram utilizadas na análise de estruturação.

Tabela 5. Qualidade de amplificação e número de sítios polimórficos incluindo indel em cada marcador testado. Resultados baseados em 26 indivíduos de Ibiporã (5), Itacimirim (5), Miranda (5), Pindamonhangaba (5) e Rep. Democrática do Congo A (6). Em destaque, os marcadores selecionados para o presente estudo. (+) satisfatória; (-) insatisfatória.

Região	Qualidade de Amplificação	Nº sítios polimórficos
Nucleares		
ITS	+	2
Gscp	+	0
tRALS	+	-
Agt1	-	-
At103	-	-
Eif3E	-	-
AroB	-	-
Plastidiais		
trnL-F	+	3
trnH-psbA	+	2
trnS-trnG	-	-
rpL32-trnL	+	5
trnQ-rps16	+	1
trnV-ndHC	-	-
psbD-trnT	-	-
ndhF-rpL32	+	-
matK	+	0
rbcLa	-	-

Para investigar eventos demográficos foram realizados testes de neutralidade (Tajima, 1989; Fu, 1997) e análises de *mismatch distribution* (Rogers & Harpending, 1992) também com o programa Arlequin 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer, 2010). A dinâmica demográfica foi explorada com a análise multilocus de *Extended Bayesian Skyline Plots* – EBSP (Heled & Drummond, 2008) realizada com o programa BEAST 1.8.1 (Drummond *et al.* 2012). Os indels são considerados importantes caracteres informativos principalmente em regiões do cloroplasto (Egan & Crandall, 2008) por essa razão optou-se por incluí-los nas análises como passos mutacionais únicos. Como o BEAST desconsidera a existência de gaps no cálculo de probabilidades posteriores, os gaps foram codificados com o programa SeqState (Müller, 2005) de acordo com o esquema Simple Indel Coding (Simmons & Ochoterena, 2000) e incluídos como uma partição independente de dados, sob o modelo estocástico de Dollo (Le Quesne, 1974; Farris, 1977). O modelo de substituição mais adequado (HKY para ambas as regiões) foi determinado no programa Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) pelo método de máxima verossimilhança. Na ausência de registro fóssil para *Crotalaria*, a inferência foi

calibrada usando uma distribuição normal a priori das taxas de substituição para ITS, como descrito por Pisa e colaboradores (2015). Foi utilizada uma média de $4,125 \times 10^{-3}$ (substituições/sítio/milhão de anos) e desvio padrão de $1,81 \times 10^{-3}$, que abrange toda a gama de taxas de substituição de uma ampla variabilidade de espécies herbáceas (Kay *et al.*, 2006). As ponderações dos operadores e o valor inicial para o tamanho populacional médio foram ajustados de acordo com as recomendações do tutorial do BEAST. Foram realizadas 500 milhões de iterações, com amostragem a cada 5000 gerações. A convergência dos resultados foi verificada com o programa Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond 2009).

A inferência filogenética foi realizada separadamente para as regiões ITS e rpl32-trnL com o programa BEAST 1.8.1 (Bouckaert, 2014). As árvores foram enraizadas usando sequências de um indivíduo de *Crotalaria breviflora*. Também foi incluída como grupo externo uma sequência de ITS de *C. vitellina* (Genbank: KR013000). Os modelos de substituição foram os mesmos utilizados para a análise de EBSP e para ambos os dados foi considerado um relógio molecular estrito. Os tempos de divergência entre as linhagens foram estimados com a mesma distribuição normal das taxas de ITS utilizada anteriormente. As árvores foram obtidas após duas corridas independentes de 200 milhões de iterações e amostragem a cada 4000 gerações. No programa Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond 2009) verificou-se a convergência dos dados (ESS > 200). As primeiras 5000 árvores foram descartadas no TreeAnnotator e o resultado final foi visualizado no FigTree 1.4.2 (disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Resultados

Os alinhamentos das regiões ITS e rpl32-trnL geraram sequências de 513pb e 346pb, respectivamente (Tabela 6). A região ITS apresentou seis sítios com substituições e apenas um indivíduo analisado (NIG_276A) foi heterozigoto com um par de bases diferente entre os alelos. As sequências do marcador plastidial possuem três sítios com substituições e dois indels de 5pb e 34pb cada.

Tabela 6. Caracterização das sequências de ITS e rpl32-trnL geradas.

	Amplitude	Sítios invariáveis	Sítios com substituições	Indels	Composição nucleotídica (%)			
					A	T	C	G
ITS	513	507	6	-	19,3	20,7	27,7	32,4
rpl32-trnL	346	307	3	2	38,8	47,6	5	8,6

Tabela 7. Índices de diversidade e testes de neutralidade totais (incluindo amostras da Austrália e Índia) e por região para cada marcador. N: número amostral, S: número de sítios polimórficos incluindo indel, H: número de haplótipos, Hd: diversidade haplotípica, π : diversidade nucleotídica, s.d: desvio padrão, D: índice de Tajima, FS: índice de Fu, r: índice de Harpending. Valores com $p < 0,05$ são significativos estão em negrito.

		N	S	H	Hd (s.d.)	π (s.d.)	D	FS	r
	Neotropical	100	2	2	0,1139 (0,0418)	0,0379 (0,0498)	-0.6305	0.7568	0.8111
ITS	África	14	3	3	0,5111 (0,1643)	0,1518 (0,1294)	-0.5067	0.2998	0.2084
	TOTAL	116	6	4	0,3063 (0,0438)	0,1175 (0,0986)	-0.7081	0.7556	0.5474
	Neotropical	59	1	2	0,0982 (0,0514)	0,0245 (0,0475)	-0.7008	-0.5686	0.6554
rpL32-trnL	África	7	3	3	0,6667 (0,1598)	0,3095 (0,2536)	0.0503	0.4064	0.3107
	TOTAL	68	3	4	0,2397 (0,0647)	0,0755 (0,0882)	-13.591	-18.055	0.3491

Tabela 8. Haplótipos encontrados em cada ponto amostral.

Localidade	Grupo	Haplótipos ITS	Haplótipos rpL32-trnL
Campo Grande-MS (BR)	Neotropical	Hap_3	Hap_1
Corumbá-MS (BR)	Neotropical	Hap_3	Hap_1
Ibiporã-PR (BR)	Neotropical	Hap_3	Hap_1
Igarapava-SP (BR)	Neotropical	Hap_3	Hap_1
Itacimirim-BA (BR)	Neotropical	Hap_3	Hap_1
Itaparica-BA (BR)	Neotropical	Hap_3	Hap_1
Ivinhema-MS (BR)	Neotropical	Hap_3	Hap_1
Miranda-MS (BR)	Neotropical	Hap_3	Hap_1
Nova Alvorada-MS (BR)	Neotropical	Hap_3	Hap_1
Pindamonhangaba-SP (BR)	Neotropical	Hap_3	Hap_1
São Simão-SP (BR)	Neotropical	Hap_3	Hap_1
Angola	África	Hap_1	Hap_2
Austrália	-	Hap_2	Hap_4
Costa Rica	Neotropical	Hap_1	Hap_2
Cuba	Neotropical	Hap_3	Hap_1
Índia	-	Hap_3	Hap_1
Nigéria	África	Hap_1 e Hap_4	Hap_3
Peru	Neotropical	Hap_1	Hap_2
Porto Rico	Neotropical	Hap_3	Hap_1
Rep. Democrática do Congo-A	África	Hap_1	Hap_2
Rep. Democrática do Congo-B	África	Hap_1	Hap_2
Rep. Democrática do Congo-C	África	Hap_3	Hap_1
Tanzânia	África	Hap_3	Hap_1
Venezuela	Neotropical	Hap_1	Hap_2
Zimbábue	África	Hap_1	Hap_2

As diversidades haplotípica e nucleotídica total e na região Neotropical de ambos os marcadores não ultrapassaram 0,31 e 0,12, respectivamente (Tabela 7). Os marcadores analisados apresentaram um baixo polimorfismo e a heterozigosidade encontrada no marcador nuclear está abaixo do que era esperado ($H_{\text{observada}}=0,02$; $H_{\text{esperada}}=0,27$). Os índices de diversidade calculados e o número de haplótipos são maiores na África quando comparados com a região Neotropical, apesar do número de indivíduos analisados da última ter sido consideravelmente maior. A distribuição e variabilidade de ITS e rpL32-trnL apresentaram padrões semelhantes. A despeito da ampla distribuição geográfica das amostras, encontraram-se apenas quatro haplótipos de cada marcador com poucos passos mutacionais de diferença (Figuras 5, 6 e 7 Tabela 8). Dois haplótipos são compartilhados entre o continente africano e Neotrópicos, um é exclusivo da Nigéria e outro exclusivo da Austrália. No Brasil foi encontrado um único haplótipo de cada marcador (Hap_3 de ITS e Hap_1 de rpL32-trnL) compartilhados com a Tanzânia, Rep. Democrática do Congo, Índia, Porto Rico e Cuba. Na rede de rpL32-trnL, parece haver um haplótipo central que deu origem aos outros, porém o fato de o maior número de indivíduos analisados serem provenientes do Brasil pode estar viesando a análise.

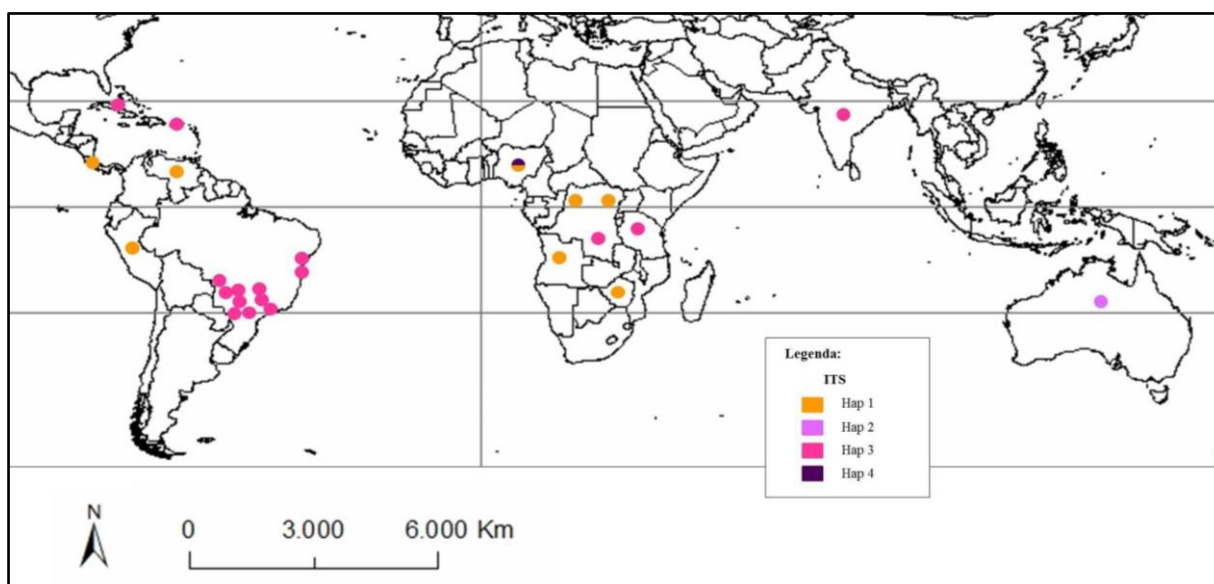


Figura 5. Distribuição geográfica dos haplótipos de ITS de *C. pallida*. Todos os pontos amostrados apresentaram um único haplótipo, exceto Nigéria que possui um indivíduo heterozigoto, sendo um dos alelos exclusivos do local.

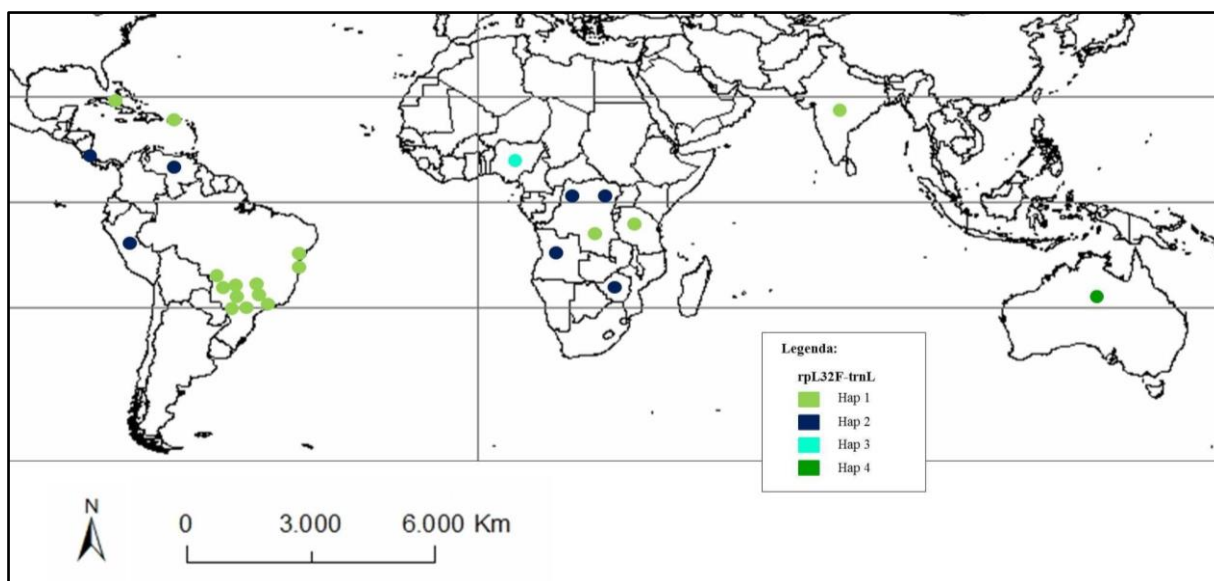


Figura 6. Distribuição geográfica dos haplótipos de rpL32-trnL de *C. pallida*. Todos os pontos amostrados apresentaram um único haplótipo.

A Análise de Variância Molecular hierarquizada (Tabela 9) realizada separadamente para cada marcador indica que mais de 60% da variação encontra-se entre os grupos (Grupo 1: região Neotropical; Grupo 2: África), 21,58% (ITS) e 38,66% (rpL32-trnL) entre as populações dentro dos grupos e menos de 1% dentro das populações. A diferença entre os grupos é efeito da presença de haplótipos exclusivos da Nigéria (Hap_4 de ITS e Hap_3 de rpL32-trnL). Há pouca variação dentro e entre populações já que todas são monomórficas e os haplótipos são pouco diversos. A maior parte da variação dentro dos grupos encontra-se no grupo formado pelas amostras africanas.

Tabela 9. Análise de variância molecular hierarquizada (AMOVA) das sequências de ITS e de rpL32-trnL organizadas em dois grupos: Neotropical e África. Todos os valores com $p < 0,05$. GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; CV: componentes da variância; PV: porcentagem de variação.

Fonte de variação	ITS				rpL32-trnL			
	GL	SQ	CV	PV	GL	SQ	CV	PV
Entre Grupos	1	10,047	0,53153	77,6	1	2,498	0,18692	61,34
Interpopulacional (Dentro de Grupos)	19	14,88	0,14785	21,58	20	6,551	0,11782	38,66
Intrapopulacional	89	0,5	0,00562	0,82	40	0,00	0,00	0,00
TOTAL	109	25,427	0,685	100	61	9,048	0,30473	100

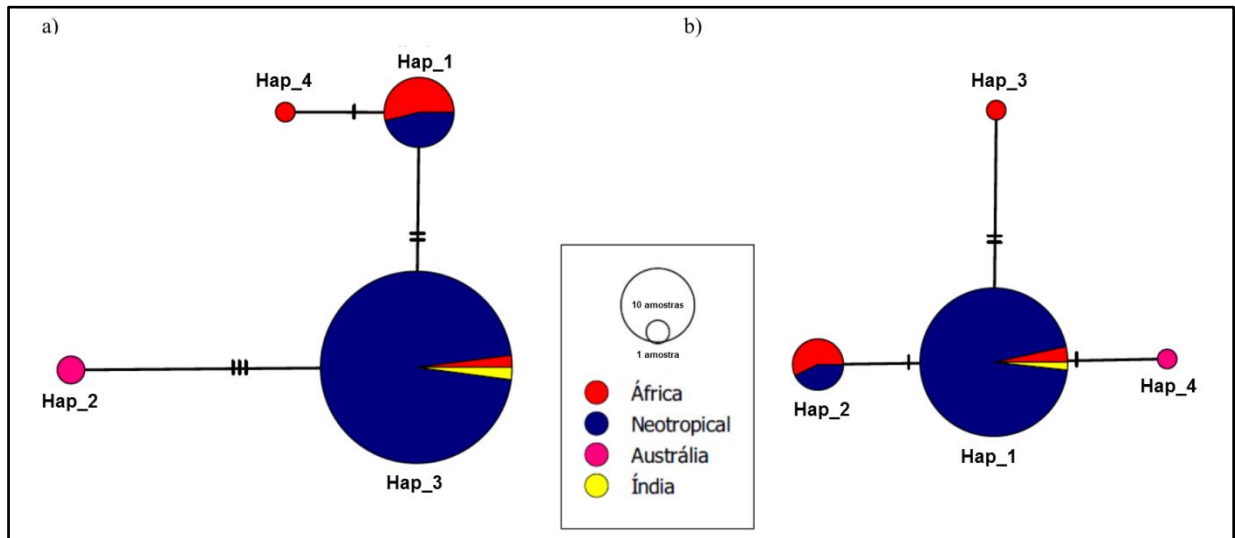


Figura 7. Rede de haplótipos de ITS (a) e de rpL32-trnL (b).

O valor do índice D de Tajima para os dados totais do marcador plastidial foi negativo o que é indício de expansão populacional (Tabela 7). Contudo, este foi o único valor significativo ($p < 0,05$) entre os testes de neutralidade calculados (índice de Fu e de Harpending). O índice D de Tajima avalia o excesso de substituições presentes em uma única amostra, enquanto o índice de Fu usa informações sobre a distribuição dos haplótipos e o índice de Harpending utiliza dados da distribuição das diferenças das sequências (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). As análises de *mismatch distribution* (Figura 8b,c,e) indicam estabilidade populacional na África e nos dados totais de ITS, já que os histogramas observados não correspondem ao esperado para um cenário de expansão populacional. Os histogramas dos dados totais de rpL32-trnL e de ambos os marcadores para a região Neotropical concordam com uma expansão populacional (Figura 8a,d,f). A variação demográfica detectada pela análise multilocus *Extended Bayesian Skyline Plot* (Figura 9) ultrapassou o intervalo de confiança e sugere a ocorrência de um aumento populacional a partir de 10 mil anos, no Holoceno. Entretanto, observou-se no programa Tracer que a probabilidade de ter ocorrido uma mudança demográfica é semelhante à probabilidade do tamanho populacional ter se mantido constante.

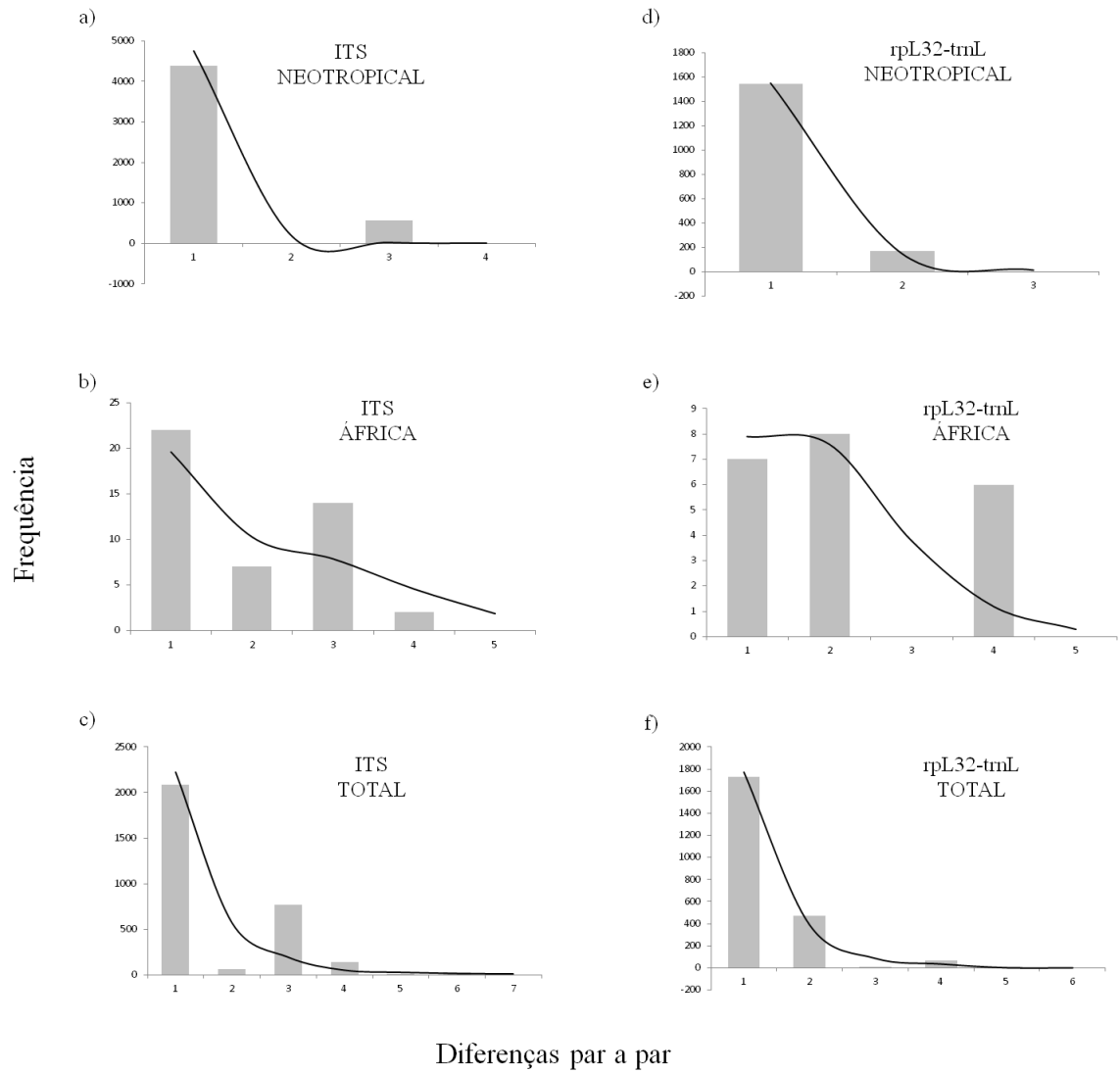


Figura 8. Gráficos de *mismatch distribution* para os dados totais (c,f) e por região (a,b,d,e) de ITS (esquerda) e rpL32-trnL (direita). O histograma representa a distribuição de diferenças par a par observada nas sequências obtidas e a linha sólida representa a distribuição esperada em caso de expansão populacional.

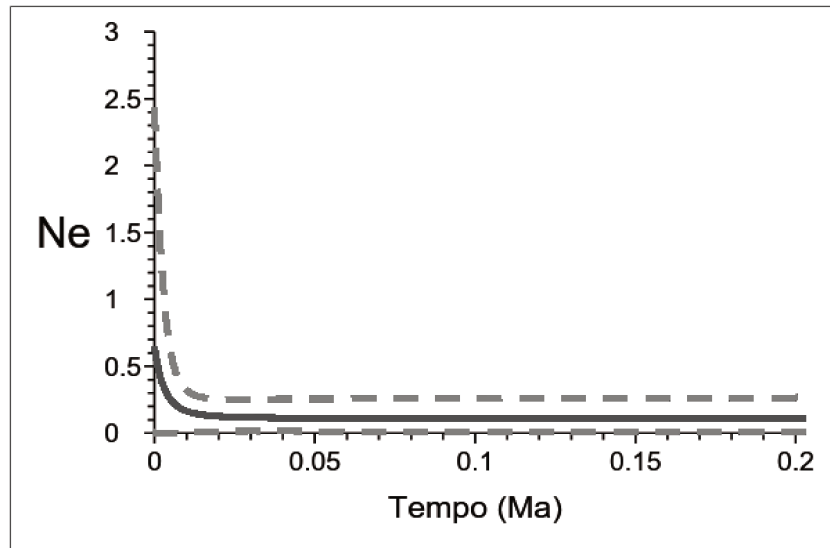


Figura 9. Análise multilocus EBSF indicando expansão populacional recente. Em linha tracejada estão representados os intervalos de confiança (95% HPD).

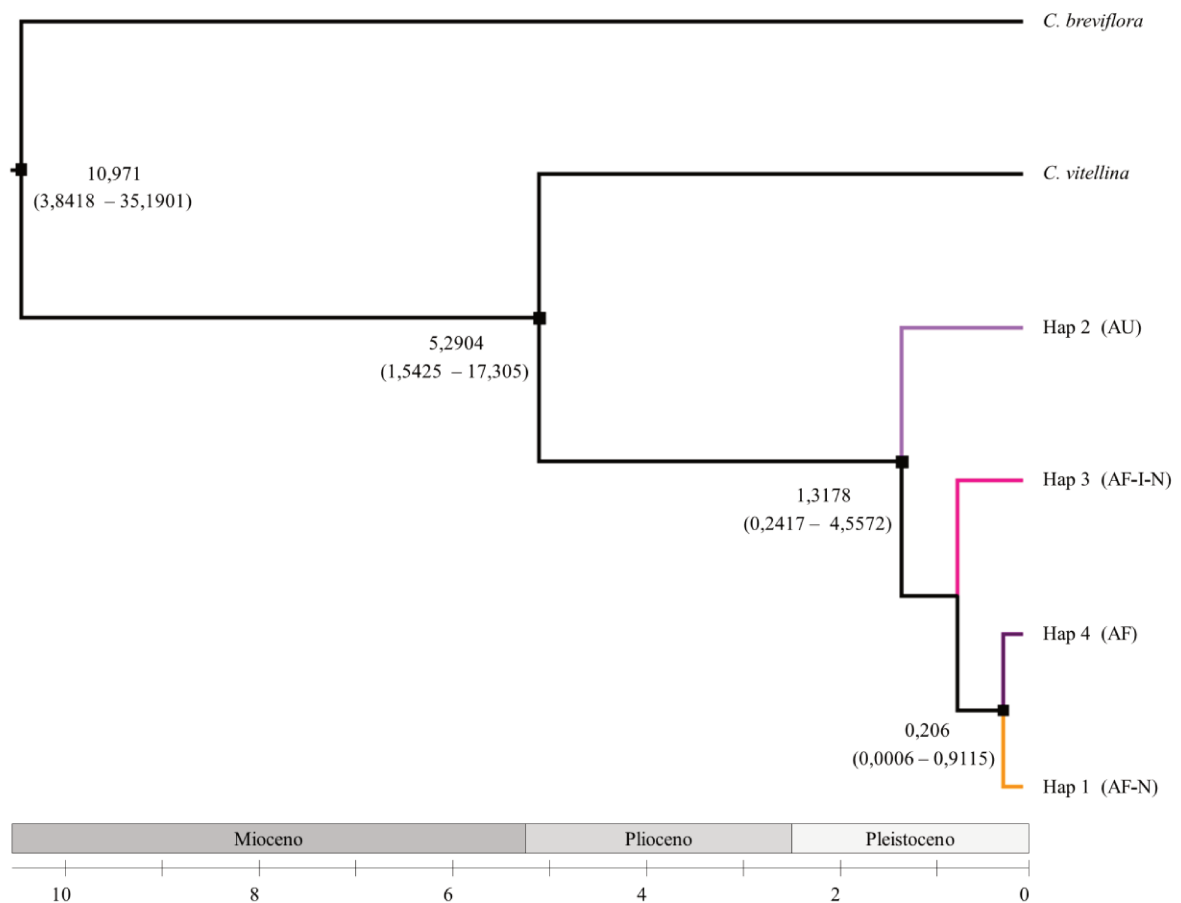


Figura 10. Inferência filogenética bayesiana para as sequências de ITS. Estão representados os tempos de divergência dos nós com probabilidade posterior maior que 0,9 (■) e em parênteses o 95% HPD. As áreas onde cada haplótipo são encontrados estão entre parênteses, a frente dos mesmos. AU: Austrália; AF: África; I: Índia; N: Neotropical.

As inferências filogenéticas dos marcadores nuclear (Figura 10) e plastidial (Figura 11) resultaram em topologias aparentemente diferentes apresentando nós com baixa probabilidade posterior. A divergência entre *C. pallida* e *C. vitellina* foi datada a cerca de 5,2904 milhões de anos com um amplo intervalo 95% de *Highest Posterior Density* (95% HPD 1,5425-17,305). A diversificação da espécie é mais recente ocorrendo entre o Plioceno e o Pleistoceno. Todos os intervalos de 95% HPD para os tempos de divergência dos haplótipos se sobrepõem.

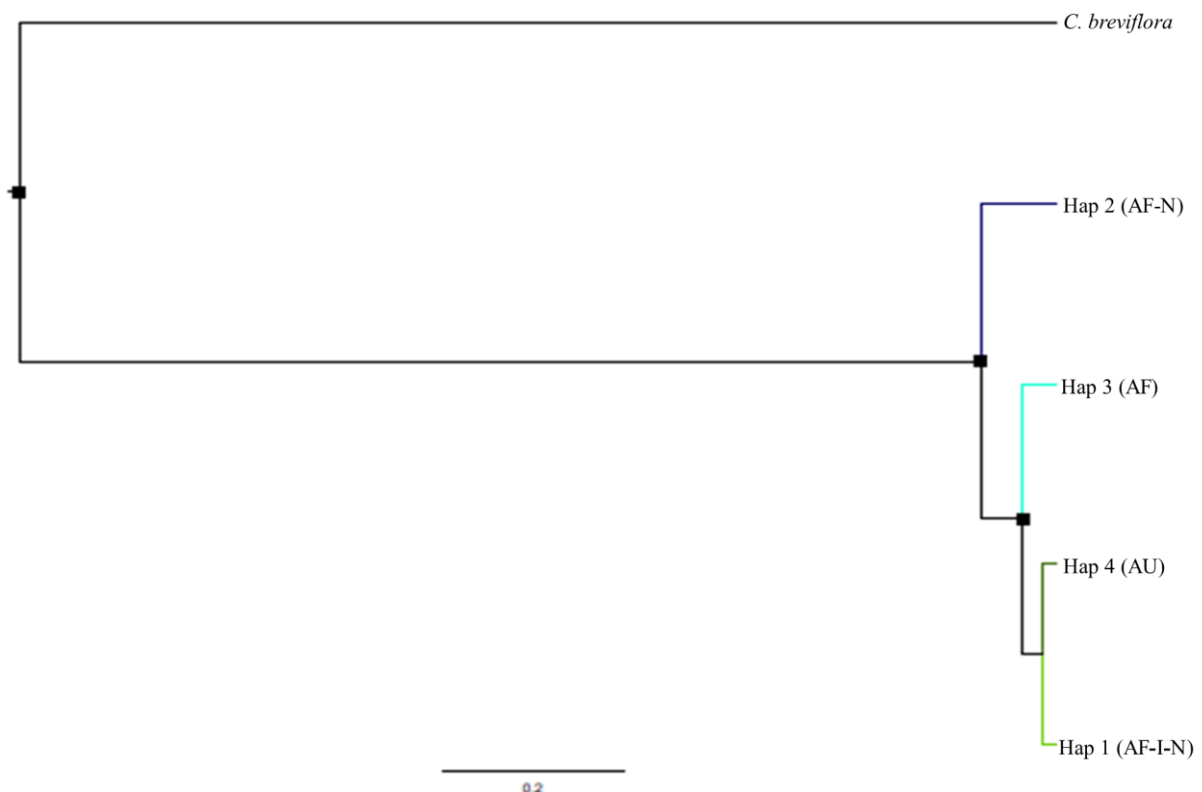


Figura 11. Inferência filogenética bayesiana para as sequências de rpL32-trnL. ■: PP>0,9. Entre parênteses estão as áreas onde cada haplótipo é encontrado. AU: Austrália; AF: África; I: Índia; N: Neotropical.

Discussão

Diversidade e Estruturação Genética

Espécies amplamente distribuídas tendem a apresentar grande estruturação (eg. Cennamo *et al.*, 2013) e diversidade genética (eg. Pisa *et al.*, 2015). Além disso, Cogni *et al.* (2011) demonstraram que alguns caracteres de *C. pallida* (alcalóides e nectário extrafloral) variam em escala regional, o que poderia estar relacionado à diferenciação genética entre as populações. Contudo, a variabilidade genética encontrada nos dados do presente trabalho está

bem abaixo do que era esperado. Resultado semelhante também foi registrado para *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae), árvore distribuída em toda África equatorial e nos neotrópicos: os haplótipos de ITS (N = 5) e do marcador plastidial (N = 2) exibiram poucos passos mutacionais de diferenças, e são compartilhados pelas populações de ambos os continentes (Dick *et al.*, 2007). Alguns estudos com espécies invasoras também descreveram baixos índices de diversidade genética em marcadores nucleares e plastídias (eg. Hagenblad *et al.*, 2015; Shaik *et al.*, 2015). Um dos poucos estudos realizados até o presente momento com o objetivo de avaliar o polimorfismo genético de uma espécie de *Crotalaria* também verificou uma baixa diversidade genética dentro e entre populações de *C. longipes* Wight & Arn. (Jayanthi & Mandal, 2001).

Plantas que não apresentam qualquer mecanismo de dispersão de sementes a longa distância, como é o caso de *C. pallida* (Cogni *et al.*, 2011), podem desenvolver diferenciação genética em escala geográfica local ou regional em poucas gerações (Heywood, 1991; Linhart & Grant, 1996). Entretanto, os dados atuais demonstraram ausência de variação dentro das populações e de estruturação entre elas. A análise de variância molecular hierárquica indicou estruturação entre os grupos, mas o resultado pode ter sido enviesado pelo baixo número de haplótipos e por apenas dois deles não serem compartilhados entre os grupos. A amostragem local restrita pode impedir que a estruturação fosse detectada, mas as diferenças entre todos os haplótipos foram muito pequenas.

Apenas um estudo analisou a variabilidade intraespecífica de *C. pallida* e detectou alta heterozigiosidade e diversidade nos marcadores SCoT (start codon targeted) em indivíduos de quatro populações da Índia (Satya *et al.*, 2016). Possivelmente os marcadores utilizados no presente trabalho não são os mais indicados para analisar a história evolutiva da espécie, porém vários marcadores foram testados e todos apresentaram variabilidade reduzida. Ndlovu e colaboradores (2013) encontraram doze haplótipos do marcador plastidial rpL32-trnL em *Acacia pycnantha* Benth (Fabaceae), uma espécie de árvore original do sul da Austrália e invasora no oeste do país e na África do Sul, portanto registraram maior variabilidade considerando uma região geográfica mais restrita no mesmo marcador plastidial utilizado neste trabalho. O marcador ITS é amplamente utilizado em estudos filogeográficos de plantas e, comparando a diversidade haplotípica registrada para esta região em outras espécies herbáceas com a encontrada para *C. pallida*, nota-se uma diferença marcante. A diversidade haplotípica de *Senecio madagascariensis* (0,763; Mäder *et al.*, 2016), *Phalaenopsis amabilis* (0,857; Tsai *et al.*, 2015) e *Passiflora actinia* (0,944; Teixeira *et al.*, 2016), por exemplo, são

consideravelmente maiores que a de *C. pallida* (0,306). É importante destacar também que os marcadores utilizados evoluem de maneira neutra e apresentam tipos de herança diferentes e ainda assim exibiram padrões de distribuição e variabilidade semelhantes.

Supõe-se frequentemente que as diferenças na variabilidade entre as espécies são decorrência principalmente do tamanho populacional, com populações que sofreram *bottleneck* com menor variabilidade do que as de tamanho estável. Porém tal redução não é o único fator responsável pela baixa diversidade genética (Amos & Harwood, 1998). A reduzida variação genética da espécie pode ser explicada por aspectos biológicos do organismo estudado. Espécies herbáceas tendem a apresentar menores valores de diversidade genética e porcentagens de polimorfismo (Hamrick & Godt, 1996), o que é ainda mais intensificado em plantas que realizam auto-fecundação (Hamrick & Godt, 1996; Cole, 2003). O processo recorrente de colonização e extinção que ocorre em metapopulações é outro fator que, combinado com a ocorrência de auto-fecundação, é capaz de reduzir o número efetivo populacional e a variabilidade genética (Ingvarsson, 2002). Verçosa (2016) estudou 20 populações brasileiras de *C. pallida* e detectou que quatro dessas populações não puderam ser encontradas após cinco meses da primeira coleta. A extinção dessas populações e a presença da espécie em habitats frequentemente alterados podem sugerir a ocorrência de uma dinâmica de metapopulações.

O curto tempo de isolamento entre as populações é um fator capaz de explicar a ausência de estruturação. A falta de estruturação geográfica pode ser encontrada, por exemplo, em espécies com dispersão recente mediada pelo homem devido a múltiplas introduções de diferentes fontes da região de origem, como descrito para a liana *Cardiospermum grandiflorum* Sz. (Sapindaceae; Gildenhuis *et al.*, 2015).

Tempo de diversificação e história demográfica

A diversificação de *C. pallida* foi datada do Pleistoceno, porém com um grande intervalo de confiança entre o meio do Plioceno ao fim do Pleistoceno. Nesses períodos o clima da Terra sofreu oscilações frequentes levando a uma série de glaciações. Nos trópicos o clima tornou-se mais frio e seco, o que levou ao aumento dos desertos e savanas e redução das florestas úmidas (Hewitt, 2000).

A incerteza em relação à estimativa dos parâmetros e a controvérsia entre os resultados não permite a acurada inferência de qualquer evento demográfico. A análise de *mismatch distribution* avalia a distribuição das frequências das diferenças entre as sequências. Assim, os

histogramas unimodais observados eram esperados de acordo com os dados obtidos, porque há apenas dois ou quatro haplótipos com poucos pares de base diferentes entre eles. A expansão detectada pela análise de EBSP também é duvidosa já que foram detectadas chances iguais de ocorrer uma ou nenhuma mudança no tamanho populacional. Apesar de essas análises indicarem expansão populacional, o excesso de homozigotos, a reduzida variabilidade genética e a ausência de estrutura são sinais de ocorrência de um *bottleneck*, um evento esperado em populações introduzidas em uma nova área.

Origem e distribuição

A forma mais segura de se verificar a distribuição nativa e introduzida de uma espécie é checar registros na literatura. Nos Estados Unidos há registro da introdução de *C. pallida* em 1909 trazida do leste da África para adubação verde (McKee & Enlow, 1931). Embora não haja nenhum registro da introdução da espécie nos neotrópicos, ela também é utilizada para adubação verde em diversos países da região e é considerada uma das mais importantes ervas daninha do Brasil (Lorenzi, 2000).

As redes de haplótipos e as árvores filogenéticas sugerem que não há estrutura geográfica entre as amostras da região Neotropical e da África. Tal resultado era esperado de acordo com a hipótese de introdução recente mediada pelo homem. Esse cenário concorda com a hipótese de aumento de suscetibilidade a qual prediz que uma espécie introduzida não seria coadaptada aos herbívoros da região não nativa da planta, o que explica a alta taxa de predação de sementes sofrida por *C. pallida* no Brasil e em outros países da região Neotropical (Verçosa, 2016).

Nossos resultados não permitiram uma inferência precisa da distribuição nativa da espécie e de sua origem na região Neotropical, contudo, é possível fazer certas inferências. Quando as espécies têm baixa diversidade genética, evidências sugerem que o ambiente materno pode ter efeitos profundos sobre o sucesso da prole e a plasticidade fenotípica dentro da geração pode desempenhar um papel significativo em algumas invasões de plantas como inferido para *Cyperus esculentus* L. (Cyperaceae) e *Aegilops triuncialis* L. (Poaceae) (Dyer *et al.*, 2010) bem como para a herbácea invasora *Impatiens glandulifera* Royle (Balsaminaceae; Hagenblad *et al.*, 2015). Longos períodos de fragmentação e isolamento da população nativa podem tornar os indivíduos menos suscetíveis aos efeitos negativos de pequenas populações e, portanto, maior a probabilidade de ocorrer uma invasão bem sucedida (Trucchi *et al.*, 2016). Durante a introdução em uma nova região as populações tendem a sofrer *bottleneck* e

apresentar consequente redução da diversidade em relação à região de distribuição nativa (eg. Edelaar *et al.*, 2015). Comparando a região Neotropical com a África, os índices de diversidade são maiores na última apesar do número menor de indivíduos analisados para a região, sugerindo a África como área de distribuição nativa da espécie, como previsto anteriormente. Possivelmente, o aumento da amostragem na África resgataria uma diversidade ainda maior, porém a espécie pode apresentar baixos níveis de diversidade mesmo na distribuição nativa decorrente de flutuações populacionais sofridas ao longo do tempo e da biologia da espécie.

A ausência de estruturação genética é um resultado comum em espécies introduzidas recentemente (Gildenhuis *et al.*, 2015), pois apesar do fluxo gênico ser reduzido ou até mesmo ausente entre as populações geograficamente distantes, o curto tempo de isolamento não foi o suficiente para ocorrer a fixação de alelos (Jogesh *et al.*, 2015). *C. pallida* é capaz de se dispersar a apenas poucos metros da planta mãe o que sugere a presença de poucos migrantes entre as populações distantes e pode ser um forte indício de introdução mediada pelo homem. Porém, há diversos registros de dispersão a longa distância através da água ou do vento na família Fabaceae (Renner, 2004) e a presença de sementes duráveis e resistentes em *C. pallida* poderia permitir tal dispersão.

A data da introdução da espécie na região Neotropical é incerta, mas há fortes indícios de um evento recente e, portanto, não se exclui a hipótese de Cogni & Futuyma (2009) de que *C. pallida* foi trazida da África na época do tráfico negreiro. O número exato de introduções também é duvidoso. A homogeneidade genética de todas as populações brasileiras sugere uma origem comum no país através de uma introdução única ou introduções múltiplas originadas da mesma população ou de populações geneticamente semelhantes. O mesmo foi sugerido para a herbácea *Jacobaea vulgaris* (Asteraceae) introduzida na Austrália, Nova Zelândia e América do Norte por não haver diferenciação entre as populações não nativas (Doorduyn *et al.*, 2010).

Ainda que existam vários indícios da introdução recente de *C. pallida* nos neotrópicos originada da África, possivelmente mediada pelo homem, estudos com novos marcadores com maior variabilidade, utilizando amostras de uma distribuição ainda mais ampla da planta se fazem necessários para confirmar tais afirmações. Amostras dos Estados Unidos, por exemplo, onde se sabe a data certa da introdução podem auxiliar nesta tarefa, bem como uma amostragem mais vasta da provável distribuição nativa a fim de checar a maior diversidade genética na área.

Uma importante consequência do presente estudo é que ele corrobora a ideia de que a diversidade genética inicial não necessariamente limita o sucesso da invasão em plantas que realizam autofecundação. Apesar de contraintuitivo, tal característica é encontrada com cada vez mais frequência na literatura (eg. Harrison & Mondor, 2011; Hagenblad *et al.*, 2015; Trucchi *et al.*, 2016). Futuros experimentos comparando o desempenho dos indivíduos de populações nativas e populações introduzidas poderiam desvendar quais os traços com papel fundamental para o sucesso da invasão de *C. pallida*, uma espécie com uma aparente baixa diversidade genética total, o que não está diretamente relacionado à variabilidade adaptativa. As características comuns de espécies com alto potencial invasor ainda não são claramente conhecidas e a compreensão completa da história filogeográfica das espécies pode acrescentar novas e importantes informações para essa área de estudo tão relevante nos dias atuais.

Conclusões

- *Crotalaria pallida* possui uma baixa diversidade genética provavelmente associada à biologia da espécie e/ou a história demográfica das populações da região de distribuição nativa.
- Os dados são controversos quanto à ocorrência de um evento de expansão ou de *bottleneck*.
- Os dados sugerem que *C. pallida* tem origem africana e foi introduzida recentemente na região Neotropical, o que concorda com a hipótese de introdução mediada pelo homem.
- A ausência de diferenciação entre e dentro das populações do Brasil sugerem uma origem comum das mesmas.
- O alto potencial invasor de *C. pallida*, a despeito da baixa diversidade genética, contribui na delimitação das características que são de fato relevantes durante o processo de invasão.

Referências Bibliográficas

- Almeida, E.C. 1986. Biologia floral e mecanismo de reprodução em *Crotalaria mucronata*. Revista Ceres, 33: 529–540.
- Amos, W.; Harwood, J. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 353: 177–186.
- Antonelli, A.; Sanmartín, I. 2011. Why are there so many plant species in the Neotropics? Taxon, 60: 403–414.
- Baker, H. 1965. Characteristics and modes of origin of weeds. In: The Genetics of Colonizing Species (eds Baker H, Stebbins G), pp. 147–168. Academic Press, New York, USA.
- Barrett, S.C.H. 2015. Foundations of invasion genetics: the Baker and Stebbins legacy. Molecular Ecology, 24: 1927–1941.
- Blackburn, T.M.; Lockwood, J.L.; Cassey, P. 2015. The influence of numbers on invasion success. Molecular Ecology, 24: 1942–1953.
- Bock, D.G.; Caseys, C.; Cousens, R.D.; Hahn, M.A.; Heredia, S.M.; Hübner, S.; Turner, K.G.; Whitney, K.D.; Rieseberg, L.H. 2015. What we still don't know about invasion genetics. Molecular Ecology, 24: 2277–2297.
- Bouckaert, R.; Heled, J.; Kühnert, D.; Vaughan, T.; Wu, C.; Xie, D.; Suchard, M.; Rambaut, A.; Drummond, A. 2014. BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. PLOS Computational Biology, 10: e1003537.
- Cennamo, P.; Del Guacchio, E.; Paino, L.; De Castro, O.; Menale, B.; Vazquez-Torres, M.; Caputo, P. 2013. Genetic structure of *Ipomoea imperati* (Convolvulaceae) in the Mediterranean region and implications for its conservation. Phytotaxa, 141: 40–54.
- Chapple, D.G.; Simmonds, S.M.; Wong, B.B.M. 2012. Can behavioral and personality traits influence the success of unintentional species introductions? Trends in Ecology and Evolution, 27: 57–64.
- Choi, H.K.; Luckow, M.A.; Doyle, J.; Cook, D.R. 2006. Development of nuclear gene-derived molecular markers linked to legume genetic maps. Molecular Genetics and Genomics, 276: 56–70.
- Clement, M.; Snell, Q.; Walke, P.; Posada, D.; Crandall, K. 2002. TCS: estimating gene genealogies. Proceedings of the 16th International Parallel and Distributed Processing Symposium, 2: 184.
- Cogni, R. 2010. Resistance to plant invasion? A native specialist herbivore shows preference for and higher fitness on an introduced host. Biotropica, 42: 188–193.

- Cogni, R.; Futuyma, D.J. 2009. Local adaptation in a plant herbivore interaction depends on the spatial scale. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97: 494–502.
- Cogni, R.; Trigo, J.R.; Futuyma, D.J. 2011. Varying herbivore population structure correlates with lack of local adaptation in a geographic variable plant-herbivore interaction. *PLoS One*, 6:e29220.
- Cole, C.T. 2003. Genetic Variation in Rare and Common Plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34: 213–237.
- Davidson, A.M.; Jennions, M.; Nicotra, A.B. 2011. Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis. *Ecology Letters*, 14: 419–431.
- Davis, M.A.; Thompson, K. 2000. Eight ways to be a colonizer; two ways to be an invader: a proposed nomenclature scheme for invasion ecology. *Bulletin of the Ecological Society of America*, 81: 226–230.
- Diaz, G.J.; Roldan, L.P.; Cortes, A. 2003. Intoxication of *Crotalaria pallida* seeds to growing broiler chicks. *Veterinary and Human Toxicology*, 45: 187–189.
- Dick, C.W.; Bermingham, E.; Lemes, M.R.; Gribel, R. 2007. Extreme long-distance dispersal of the lowland tropical rainforest tree *Ceiba pentandra* L. (Malvaceae) in Africa and the Neotropics. *Molecular Ecology*, 16: 3039–3049.
- Dlugosch, K.M.; Anderson, S.R.; Braasch, J.; Cang, F.A.; Gillette, H.D. 2015. The devil is in the details: genetic variation in introduced populations and its contributions to invasion. *Molecular Ecology*, 24: 2095–2111.
- Dlugosch, K.M.; Parker, I.M. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, 17: 431–449.
- Doorduyn, L.J.; van den Hof, K.; Vrieling, K.; Joshi, J. 2010. The lack of genetic bottleneck in invasive Tansy ragwort populations suggests multiple source populations. *Basic and Applied Ecology*, 11: 244–250.
- Doyle, J.; Doyle, J. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13–15.
- Drummond, A.J.; Suchard, M.; Xie, D.; Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 1969–1973.
- Dyer, A.R.; Brown, C.S.; Espeland, E.K.; McKay, J.K.; Meimberg, H.; Rice, K.J. 2010. The role of adaptive trans-generational plasticity in biological invasions of plants. *Evolutionary Applications*, 3: 79–192.

- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792–97.
- Edelaar, P.; Roques, S.; Hobson, E.A.; Da Silva, A.G.; Avery, M.L.; Russello, M.A.; Senar, J.C.; Wright, T.F.; Carrete, M.; Tella, J.L. 2015. Shared genetic diversity across the global invasive range of the monk parakeet suggests a common restricted geographic origin and the possibility of convergent selection. *Molecular Ecology*, 24: 2164–2176.
- Egan, A.N.; Crandall, K.A. 2008. Incorporating gaps as phylogenetic characters across eight DNA regions: Ramifications for North American Psoraleae (Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 532–546.
- Elton, C.S. 1958. *The Ecology of Invasions by Animals and Plants*. Methuen, London, UK.
- Emshwiller, E.; Doyle, J.J. 1999. Chloroplast-expressed glutamine synthetase (ncpGS): potential utility for phylogenetic studies with an example from *Oxalis* (Oxalidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12: 310–319.
- Excoffier, L.; Lischer, H. 2010. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564–567.
- Facon, B.; Pointier, J.-P.; Glaubrecht, M.; Poux, C.; Jarne, P.; David, P. 2003. A molecular phylogeography approach to biological invasions of the New World by parthenogenetic Thiarid snails. *Molecular Ecology*, 12: 3027–3039.
- Farris, J.S. 1977. Phylogenetic analysis under Dollo's law. *Systematic Zoology*, 26: 77–88.
- Flores, A.S. 2004. Taxonomia, números cromossômicos e química de espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionideae) no Brasil. Dissertação de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.
- Flores, A.S.; Corrêa, A.M.; Forni-Martins, E.R.; Tozzi, A.M.G.A. 2006. Chromosome numbers in Brazilian species of *Crotalaria* (Leguminosae, Papilionoideae) and their taxonomic significance. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151: 271–277.
- Fonseca, R.L.; Guimarães Jr., P.R.; Morbiolo, S.R.; Scachetti-Pereira, R.; Peterson, A.T. 2006. Predicting invasive potential of smooth crotalaria (*Crotalaria pallida*) in Brazilian national parks based on African records. *Weed Science Society of America*, 54: 458–463.
- Frankham, R. 2004. Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity*, 94: 385–385.

- Frehse, F.A.; Braga, R.R.; Nocera, G.A.; Vitule, J.R.S. 2016. Non-native species and invasion biology in a megadiverse country: scientometric analysis and ecological interactions in Brazil. *Biological Invasions*, DOI 10.1007/s10530-016-1260-9.
- Fu, Y. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.
- Gaertner, M.; Biggs, R.; Te Beest, M.; Hui, C.; Molofsky, J.; Richardson, D.M. 2014. Invasive plants as drivers of regime shifts: identifying high-priority invaders that alter feedback relationships. *Diversity and Distributions*, 20: 733–744.
- Gildenhuis, E.; Ellis, A.G.; Carroll, S.P.; Le Roux, J.J. 2015. Combining natal range distributions and phylogeny to resolve biogeographic uncertainties in balloon vines (*Cardiospermum*, Sapindaceae). *Diversity and Distributions*, 21: 163–174.
- Guimarães Jr., P.R.; Raimundo, R.L.G.; Bottcher, C.; Silva, R.R.; Trigo, J.R. 2006. Extrafloral nectaries as a deterrent mechanism against seed predators in the chemically protected weed *Crotalaria pallida* (Leguminosae). *Austral Ecology*, 31: 776–782.
- Gupta, R.; Gupta, P.K. 1978. Karyotypic Studies in the Genus *Crotalaria* Linn. *Cytologia*, 43: 357–369.
- Hagenblad, J.; Hülskötter, J.; Acharya, K.P.; Brunet, J.; Chabrierie, O.; Cousins, S.A.O.; Dar, P.A.; Diekmann, M.; De Frenne, P.; Hermy, M.; Jamoneau, A.; Kolb, A.; Lemke, I.; Plue, J.; Reshi, Z.A.; Graae, B.J. 2015. Low genetic diversity despite multiple introductions of the invasive plant species *Impatiens glandulifera* in Europe. *BMC Genetics*, 16: 103.
- Hamrick, J.L.; Godt M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 351: 1291–1298.
- Harrison J.S.; Mondor, E.B. 2011. Evidence for an invasive aphid “superclone”: extremely low genetic diversity in oleander aphid (*Aphis nerii*) populations in the Southern United States. *PLoS ONE*, 6: e17524.
- Heled, J.; Drummond, A.J. 2008. Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 289.
- Heywood, J.S. 1991. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22: 335–355.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907–913.

- Hierro, J.L.; Maron, J.L.; Callaway, R.M. 2005. A biogeographical approach to plant invasions: the importance of studying exotics in their introduced and native range. *Journal of Ecology*, 93: 5–15.
- Hufbauer, R.A.; Facon, B.; Ravigné, V.; Turgeon, J.; Foucaud, J.; Lee, C.E.; Rey, O.; Estoup, A. 2012. Anthropogenically induced adaptation to invade (AIAI): contemporary adaptation to human-altered habitats within the native range can promote invasions. *Evolutionary Applications*, 5: 89–101.
- Ingvarsson, P. 2002. Metapopulation perspective on genetic diversity and differentiation in partially self-fertilizing plants. *Evolution*, 56: 2368–2373.
- Jacobi, C.M. 2005. Pollination Biology of the Exotic Rattleweed *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae) in NE Brazil. *Biotropica*, 37: 357–363.
- Jayanthi, M.; Mandal, P.K. 2001. Low genetic polymorphism in natural populations of *Crotalaria longipes*. *Biologia Plantarum*, 44: 455–457.
- Jogesh, T.; Peery, R.; Downie, S.R.; Berenbaum, M.R. 2015. Patterns of Genetic Diversity in the Globally Invasive Species Wild Parsnip (*Pastinaca sativa*). *Invasive Plant Science and Management*, 8: 415–429.
- Kay, K.M.; Whittall, J.B.; Hodges, S.A. 2006. A survey of nuclear ribosomal internal transcribed spacer substitution rates across angiosperms: an approximate molecular clock with life history effects. *BMC Evolutionary Biology*, 6: 36.
- Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; Thierer, T.; Ashton, B.; Mentjies, P.; Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28: 1647–1649.
- Kleunen, M.; Dawson, W.; Maurel, N. 2015. Characteristics of successful alien plants. *Molecular Ecology*, 24: 1954–1968.
- Kolar, C.S.; Lodge, D.M. 2001. Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 199–204.
- Kress, W.J.; Erickson, D.L. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *psbA-trnH* spacer region. *PLoS One*, 2: e508.

- Le Maitre, D.C. 2004. Predicting invasive species impacts on hydrological processes: the consequences of plant physiology for landscape processes. *Weed Technology*, 18: 1408–1410.
- Le Quesne, W.J. 1974. The uniquely evolved character concept and its cladistic application. *Systematic Zoology*, 23: 513–517.
- Le Roux, J.J.; Wiczorek, A.M.; Ramadan, M.M.; Tran, C.T. 2006. Resolving the native provenance of invasive fireweed (*Senecio madagascariensis* Poir.) in the Hawaiian Islands as inferred from phylogenetic analysis. *Diversity and Distributions*, 12: 694–702.
- Le Roux, M.M.; Boatwright, J.S.; van Wyk, B.E. 2013. A global infrageneric classification system for the genus *Crotalaria* (Leguminosae) based on molecular and morphological evidence. *Taxon*, 62: 957–971.
- Li, M.; Wunder, J.; Bissoli, G.; Scarponi, E.; Gazzani, S.; Barbaro, E.; Saedler, H.; Varotto, C. 2008. Development of COS genes as universally amplifiable markers for phylogenetic reconstructions of closely related plant species. *Cladistics*, 24: 727–745.
- Librado, P.; Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.
- Linhart, Y.B.; Grant, M.C. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27: 237–277.
- Lockwood, J.; Hoopes, M.; Marchetti, M. 2007. *Invasion Ecology*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Lodge, D.M. 1993. Biological Invasions: Lessons for Ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 8: 133–137.
- Lorenzi, H. 2000. *Plantas daninhas do Brasil: Terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas* (3ª Ed). Plantarum, Nova Odessa, Brasil.
- Lowry, E.; Rollinson, E.J.; Laybourn, A.J.; Scott, T.E.; Aiello-Lammens, M.E.; Gray, S.M.; Mickley, J.; Gurevitch, J. 2013. Biological invasions: a field synopsis, systematic review, and database of the literature. *Ecology and Evolution*, 3: 182–196.
- Mack, R.; Simberloff, D.; Lonsdale, W.M.; Evans, H.; Clout, M.; Bazzaz, F.A. 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecological Applications*, 10: 689–710.

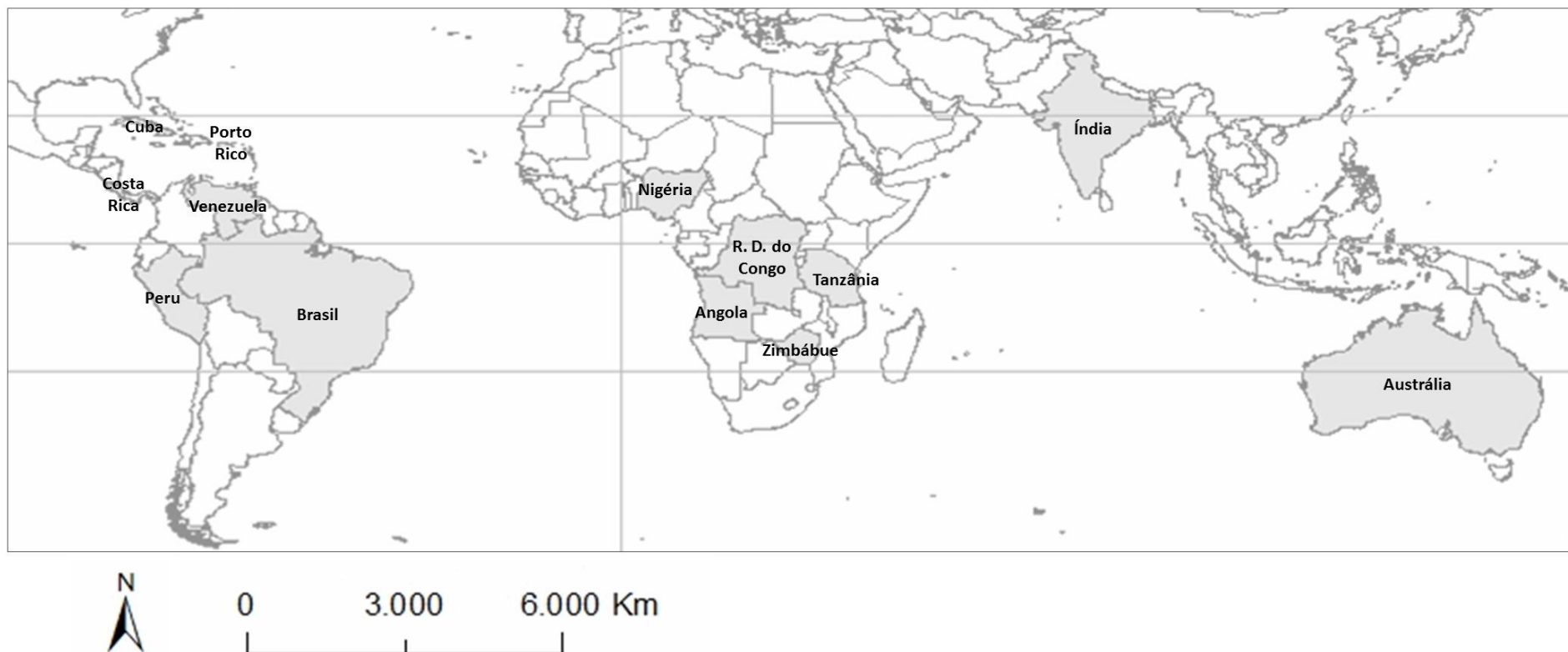
- Mäder, G.; Castro, L.; Bonatto, S.L.; de Freitas, L.B. 2016. Multiple introductions and gene flow in subtropical South American populations of the fireweed, *Senecio madagascariensis* (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 39: 135–144.
- McKee, R.; Enlow, O.K. 1931. *Crotalaria*, a new legume for the south. USDA Circular 137. Washington, DC.
- Michaelides, S.N.; While, G.M.; Zajac, N.; Aubret, F.; Calsbeek, B.; Sacchi, R.; Zuffi, M.A.L.; Uller, T. 2016. Loss of genetic diversity and increased embryonic mortality in non-native lizard populations. *Molecular Ecology*, 25: 4113–4125.
- Mooney, H.A.; Cleland, E.E. 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 5446–5451.
- Müller, K. 2005. SeqState: Primer Design and Sequence Statistics for Phylogenetic DNA Datasets. *Applied Bioinformatics*, 4: 65–69.
- Ndlovu, J.; Richardson, D.M.; Wilson, J.R.U.; O’Leary, M.; Le Roux, J.J. 2013. Elucidating the native sources of an invasive tree species, *Acacia pycnantha*, reveals unexpected native range diversity and structure. *Annals of Botany*, 111: 895–904.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590.
- Ohdan, H.; Daimon, H. 1998. Evaluation of amount of nitrogen fixed in *Crotalaria* spp. and nitrogen turnover to the succeeding wheat. *Japanese Journal of Crop Science*, 67:193–199.
- Palomino, G.; Vázquez, R. 1991. Cytogenetic Studies in Mexican Populations of Species of *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionideae). *Cytologia*, 56: 343–351.
- Pisa, S.; Vanderpoorten, A.; Patiño, J.; Werner, O.; González-Mancebo, J.M.; Ros, R.M. 2015. How to define nativeness in vagile organisms: lessons from the cosmopolitan moss *Bryum argenteum* on the island of Tenerife (Canary Islands). *Plant Biology*, 17: 1057–1065.
- Polhill, R.M. 1982. *Crotalaria* in Africa and Madagascar. A. A. Balkema, Rotterdam.
- Pysšek, P.; Richardson, D.M. 2007. Traits associated with invasiveness in alien plants: where do we stand? pp. 97–125. *In*: Nentwig, W. (Ed.). *Biological Invasions*. Springer, Heidelberg.
- Rambaut, A.; Drummond, A.J. 2009. Tracer v1.5. Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

- Ramos-Onsins, S.E.; Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2092–2100.
- Reed, D.H.; Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17: 230–237.
- Renner, S. 2004. Plant dispersal across the tropical Atlantic by wind and sea currents. *International Journal of Plant Sciences*, 165: 23–33.
- Rogers, A.; Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Rolim, R.G.; de Ferreira, P.M.A.; Schneider, A.A.; Overbeck, G.E. 2015. How much do we know about distribution and ecology of naturalized and invasive alien plant species? A case study from subtropical southern Brazil. *Biological Invasions*, 17: 1497–1518.
- Roman, J.; Darling, J.A. 2007. Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22: 454–464.
- Rull, V. 2008. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology*, 17: 2722–2729.
- Sakai, A.K.; Allendorf, F.W.; Holt, J.S.; Lodge, D.M.; Molofsky, J.; With, K.A.; Baughman, S.; Cabin, R.J.; Cohen, J.E.; Ellstrand, N.C.; McCauley, D.E.; O’Neil, P.; Parker, I.M.; Thompson, J.N.; Weller, S.G. 2001. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32: 305–332.
- Sang, T.; Crawford, D.; Stuessy, T. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, 84: 1120–1136.
- Satya, P.; Banerjee, R.; Karan, M.; Mukhopadhyay, E.; Chaudhary, B.; Bera, A.; Maruthi, R.T.; Sarkar, S.K. 2016. Insight into genetic relation and diversity of cultivated and semi-domesticated under-utilized *Crotalaria* species gained using start codon targeted (SCoT) markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 66: 24–32.
- Schlesinger, C.; White, S.; Muldoon, S. 2013. Spatial pattern and severity of fire in areas with and without buffel grass (*Cenchrus ciliaris*) and effects on native vegetation in central Australia. *Austral Ecology*, 38: 831–840.
- Shaik, R.S.; Gopurenko, D.; Urwin, N.A.R.; Burrows, G.E.; Lepshi, B.J.; Weston, L.A. 2015. Population genetics of invasive *Citrullus lanatus*, *Citrullus colocynthis* and *Cucumis myriocarpus* (Cucurbitaceae) in Australia: inferences based on chloroplast and nuclear gene sequencing. *Biological Invasions*, 17: 2475–2490.

- Shaw, J.; Lickey, E.B.; Beck, J.T.; Farmer, S.B.; Liu, W.; Miller, J.; Siripun, K.C.; Winder, C.T.; Schilling, E.E.; Small, R.L. 2005. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92: 142–166.
- Shaw, J.; Lickey, E.B.; Schilling, E.E.; Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The Tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94: 275–288.
- Simmons, M.P.; Ochoterena, H. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology*, 49: 369–381.
- Stephens, M.; Smith, N.; Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68: 978–989.
- Sun, Y.; Skinner, D.Z.; Liang, G.H.; Hubert, S.H. 1994. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theory and Applied Genetics*, 89: 26–32.
- Taberlet, P.; Gielly, L.; Pautou, G.; Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17: 1105–1109.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725–272.
- Tate, J.; Simpson, B. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany*, 28: 723–737.
- Teixeira, M.C.; Mäder, G.; Silva-Arias, G.A.; Bonatto, S.L.; Freitas, L.B. 2016. Effects of past climate on *Passiflora actinia* (Passifloraceae) populations and insights into future species management in the Brazilian Atlantic forest. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 180: 348–364.
- Trucchi, E.; Facon, B.; Gratton, P.; Mori, E.; Stenseth, N.C.; Jentoft, S. 2016. Long live the alien: is high genetic diversity a pivotal aspect of crested porcupine (*Hystrix ristata*) long-lasting and successful invasion? *Molecular Ecology*, 25: 3527–3539.

- Tsai, C.C; Chou, C.H; Wang, H.V; Ko, Y.Z.; Chiang, T.Y. 2015. Biogeography of the *Phalaenopsis amabilis* species complex inferred from nuclear and plastid DNAs. *BMC Plant Biology*, 15: 202.
- Verçosa, D. 2016. Variação geográfica e temporal de defesas em *Crotalaria pallida* (Fabaceae: Papilionoideae: Crotalarieae). Tese de Doutorado em Biologia Vegetal. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.
- Vilà, M.; Basnou, C.; Pysvek, P.; Josefsson, M.; Genovesi, P.; Gollasch, S.; Nentwig, W.; Olenin, S.; Roques, A.; Roy, D.; Hulme, P.E.; DAISIE partners. 2010. How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8: 135–144.
- Vitousek, P.M.; D'Antonio, C.M.; Loope, L.L.; Westbrooks, R. 1997. Biological invasions as global environmental change. *American Scientist*, 84: 468–478.
- Wang, K.H.; Mcsorley, R.; Marshall, A.J.; Gallaher, R.N. 2004. Nematode community changes associated with decomposition of *Crotalaria juncea* amendment in litterbags. *Applied Soil Ecology*, 27: 31–45.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In*: Innis, M.; Gelfand, D.; Sninsky, J.; White, T. (Eds.). *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego.

ANEXO 1



Anexo 1. Localização dos países de onde foram obtidas amostras de *Crotalaria pallida*.

Profa. Dra. Rachel Meneguello
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação
Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Caracterização da variabilidade e estruturação genética de *Crotalaria pallida* (Fabaceae)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 11 de Janeiro de 2017

Assinatura : Beatriz Pereira Cunha
Nome do(a) autor(a): **Beatriz Pereira Cunha**
RG n.º 43.480.986-X

Assinatura : Vera Nisaka Solferini
Nome do(a) orientador(a): **Vera Nisaka Solferini**
RG n.º 4.763.396



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado, intitulada "***Caracterização da variabilidade e estruturação genética de Crotalaria pallida (Fabaceae)***", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Beatriz Pereira Cunha
Nome do(a) aluno(a): Beatriz Pereira Cunha

Assinatura: Vera Nisaka Solferini
Nome do(a) orientador(a): Vera Nisaka Solferini

Data: 11 de Janeiro de 2017